



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**İNSAN HEPATOSSELÜLER KARSİNOM HÜCRE HATTINDA
(HEPG2) LİPOTOKSİK VE MİTOTOKSİK STRESTE
MİTOKONDRIYON YANITI**

DOKTORA TEZİ

YAPRAK YALÇIN (M.Sc.)

ANKARA-2019



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**İNSAN HEPATOSELÜLER KARSİNOM HÜCRE HATTINDA
(HEPG2) LİPOTOKSİK VE MİTOTOKSİK STRESTE
MİTOKONDRIYON YANITI**

DOKTORA TEZİ

YAPRAK YALÇIN (M.Sc.)

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. FATMA BELGİN ATAÇ

ANKARA-2019

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde Yaprak Yalçın tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/12/2019

Tez Adı: İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücre Hattında (HepG2) Lipotoksik ve Mitotoksik Streste Mitokondriyon Yanıtı

Tez Jüri Üyeleri (Unvan, Adı-Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. F. Belgin Ataç



Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu



Prof. Dr. Şefik Güran



Prof. Dr. Erkan Yurtcu



Doç. Dr. Hasibe Verdi



ONAY



Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

Enstitü Müdürü

Tarih: 19/12/19.



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

Tarih: 23/11/2019

Öğrencinin Adı, Soyadı: Yaprak Yalçın

Öğrencinin Numarası: 21310088

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji AD.

Programı: Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

Tez Başlığı: İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücre Hattında (HepG2) Lipotoksik ve Mitotoksik Streste Mitokondriyon Yanıtı

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 78 sayfalık kısmına ilişkin, 23/11/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 11'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Yaprak Yalçın

Onay

23/11/2019

Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

TEŞEKKÜR

Tüm eğitim hayatım boyunca benden ilgisini, bilgisini, tecrübesini sakınmayıp, hatalarımda bile sabrını ve sakinliğini koruyan, desteğini her zaman arkamda hissettiğim değerli danışmanım ve hocam Prof. Dr. Fatma Belgin Ataç'a;

Gerek ders dönemi gerekse tez aşamasında desteğini ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Erkan Yurtcu'ya;

En başından beri hep yanımda olan, her başım sıkıştığında yanına koştuğum ve her seferinde desteğini ve ilgisini gördüğüm sevgili ablam, hocam Doç. Dr. Hasibe Verdi'ye;

Önce laboratuvar partnerim olup, sonra en yakın arkadaşım olan, zor zamanlarımda en büyük destekçisi, canım kardeşim H. Pınar Baysan Çebi (M.Sc.)'ye;

Laboratuvarda elim, ayağım, her şeyim olan canım destekçilerim Yüksel Suer ve Serap Sezer'e;

Doktorada beraber ders alarak tanışma şansına eriştiğim, bilgilerini, tecrübelerini, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve vizyonlarıyla bana ışık tutan sevgili Prof. Dr. Sibel Kınık, Prof. Dr. Neslihan Başçıl Tütüncü ve Doç. Dr. Seda Babakurban'a;

Her zaman bana moral ve destek veren, güvenen, yanımda olan canım annem ve babama;

Varlığını her zaman arkamda hissettiğim, bana benden çok inanan ve güvenen sevgili eşim K. Alper Yalçın'a ve hayatımın anlamı olan sevgili kızım Alya Mey Yalçın'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sizler olmasanız bu tez asla olamazdı.

ÖZET

Yaprak Yalçın

‘İnsan Hepatoselüler Karsinom Hücre Hattında (HepG2) Lipotoksik Ve Mitotoksik Streste Mitokondriyon Yanıtı’

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

Beslenmede doymuş yağ asiti alımı arttıkça obezite, tip 2 diyabet (T2DM) ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığının (NAYKH) görülme sıklığı da artmaktadır. Bu hastalıkların patogenezindeki ortak nokta ise artan serbest yağ asidi miktarının karaciğer, iskelet kası, kalp ve pankreas gibi non-adipoz dokularda birikmeye başlamasıdır. Lipotoksisite olarak tanımlanan bu durum, artan lipid birikimi ile organel fonksiyon bozukluğuna, hücre hasarına, metabolik bozukluklara, kronik inflamasyona, hücresel fonksiyon kayıplarına ve non-adipoz doku ölümüne sebep olmaktadır. Lipotoksisiteye bağlı mitokondriyonda stres meydana geldiğinde lipid peroksidasyonu, ROS artışı ve buna bağlı olarak hücre ölümü tetiklenmektedir. Diyetle ve serumda en fazla bulunan doymuş serbest yağ asidi Palmitik Asit (PA) olup; 16 karbonlu uzun zincirli bir yağ asididir. Altında yatan mekanizma tam olarak bilinemesi de yağ asitlerinin trigliseride (TG) dönüşümü sitotoksisiteye neden olmaktadır. PA’nın TG’ye dönüşümü daha az olduğundan daha fazla toksik özellik göstermektedir. Bir diğer stres kaynağı ise karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon (CCCP)’dir. CCCP hücrelerde mitotoksisiteye sebep olan bir ajan olup mitofaji çalışmalarında yaygın kullanılan kimyasaldır.

Tüm bu verilerin ışığında çalışmamızda insan HepG2 hücre hattında ayrı ayrı lipotoksik ve protonofor stresi uygulanarak mitokondriyonun verdiği stres yanıtı farklılığının araştırılması hedeflenmiştir. Böylece farklı uyaranlara karşı mitokondriyonun verdiği otofaji mitofaji yanıtlarında görev alan proteinler hakkında

daha detaylı bilgi edinilmesi hedeflenmiştir. Ek olarak uygulanan stresin süresi ve çeşitliliğinin de yanıt farklılığındaki etkisi araştırılmıştır.

Bunun için mitokondriyonla ilişkili stres ve mitofaji genlerinden CHOP, HSP10, HSP60 ve Parkin ve otofajide adaptör/ reseptör görevi yapan Optineurin, HACE1, TBK1, p62 ve LC3-II genlerinin ifadenmesine bakılmıştır.

Sonuç olarak hücrel stres yanıtının PA uygulanan grupta daha erken başlayıp, azaldığı; CCCP uygulanan grupta ise, daha geç başlayıp daha uzun sürdüğü görülmüştür. PA uygulanan grupta en etkili saatin 12. saat olurken CCCP grubunda 24. saat olduğu görülmüş olup, özellikle mitokondriyal streste görev alan CHOP geninin ve mitofajide görev alan Parkin, OPTN, HACE1, TBK1, P62 ve LC3-II genlerinin ifadenmelerinin arttığı görülmüştür.

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Araştırma Kurulu (proje no: DA 16/32) tarafından onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: Mitokondriyon, Palmitik Asit, CCCP, Parkin, Optineurin

ABSTRACT

Yaprak Yalçın

‘Mitochondrial Response to Lipotoxic and Mitotoxic Stress in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line (HepG2) ’

Baskent University Institute of Health Sciences, Medical Biology PhD Thesis, 2019

As dietary saturated fatty acid intake increases, the prevalence of obesity, type 2 diabetes (T2DM) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) increases. The common point in the pathogenesis of these diseases is that the increased amount of free fatty acids begins to accumulate in non-adipose tissues such as liver, skeletal muscle, heart and pancreas. This condition, defined as lipotoxicity, causes organelle dysfunction, cell damage, metabolic disorders, chronic inflammation, loss of cellular function and death of non-adipose tissue with increasing lipid accumulation. When stress occurs in the mitochondria due to lipotoxicity, lipid peroxidation, ROS increase, and consequently cell death are triggered. Palmitic Acid (PA) is the most saturated free fatty acid found in diet and serum. It is a long chain fatty acid with 16 carbons. Although the underlying mechanism is not fully known, the conversion of fatty acids to triglycerides (TG) causes cytotoxicity. Since the conversion of PA to TG is less, it shows more toxic properties. Another source of stress is carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). CCCP is an agent that causes mitotoxicity in cells and is widely used in mitophagy studies.

In the light of all these data, the aim of this study was to investigate the difference in the stress response of mitochondria by applying lipotoxic and protonophore stress separately in human HepG2 cell line. Thus, it is aimed to obtain more detailed information about the proteins involved in the responses of mitochondria to autophagy, mitophagy against different stimuli. In addition, the effect of duration and variety of stress applied on response difference was investigated.

For this purpose, expression of CHOP, HSP10, HSP60, Parkin, which are mitochondria-related stress and mithophagy genes, and Optineurin, HACE1, TBK1, p62 and LC3-II genes that act as adapters/ receptors in autophagy were examined.

As a result, cellular stress response started and decreased earlier in the PA group; In the CCCP group, it was observed that it started later and lasted longer. In the PA group, the most effective time was 12 hours, whereas in the CCCP group it was 24 hours, especially the expression of CHOP gene in mitochondrial stress and Parkin, OPTN, HACE1, TBK1, P62 and LC3-II genes in mitochondrial stress were increased.

This study was approved by Baskent University Medical and Health Sciences Research Council (Project no: DA 16/32) and supported by Baskent University Research Fund.

Key words: Mitochondrial, Palmitic Acid, CCCP, Parkin, Optineurin

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mitokondriyon.....	3
2.1.1. Mitokondriyon yapı ve özellikleri	4
2.2. Mitokondriyal Kalite Kontrol.....	6
2.2.1. Ubikülin proteazom sistemi (UPS).....	9
2.2.2. Mitokondriyondan köken alan veziküller (MKAV)	12
2.2.3. Mitokondriyon ile ilişkili yıkım (MİY)	14
2.2.4. Mitokondriyal fisyon ve füzyon	15
2.2.4.1. Mitokondriyal fisyon	17
2.2.4.2. Mitokondriyal füzyon	19
2.3. Otofaji.....	20
2.4. Mitofaji	23
2.4.1. PTEN-indüklediği kinaz 1 (‘ <i>PTEN-induced putative kinase 1</i> ’) (PINK1)- parkin bağımlı mitofaji	24
2.4.2. Reseptör aracılı mitofaji.....	27
2.5. Mitofaji ve otofajide görev alan adaptör proteinler	29
2.5.1. p62/SQSTM1 yapı ve özellikleri	31
2.5.2. Optineurin yapı ve özellikleri	33

2.6. Lipotoksisite	38
2.6.1. Palmitik asit (PA)	39
2.7. Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon ‘ <i>carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone</i> ’ (CCCP)	40
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	42
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	43
3.1.1 Hücre kültürü	43
3.1.2. Cell proliferation kit I (MTT) [3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium bromid]	44
3.1.3. RNA izolasyonu	44
3.1.4. cDNA(komplementer DNA) sentezi.....	45
3.1.5. cDNA kontrol PZR	45
3.1.6. Agaroz jel elektroforezi.....	45
3.1.7. Eş zamanlı PZR (qRT-PZR)	46
3.2. Yöntemler	47
3.2.1. Hücrelerin çözülmesi	47
3.2.2. Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması	47
3.2.3. Palmitik asit (PA) hazırlanması	48
3.2.4. Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) (CCCP) hazırlanması	48
3.2.5. Hücre canlılığı ve sitotoksisite testi	49
3.2.6. Hücre kültürü materyalinden total RNA izolasyonu	49
3.2.7. RNA saflığının ve miktarının tayini.....	51
3.2.8.Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	51
3.2.9. cDNA kontrol PZR	53
3.2.10. Gen ifadenmesinin saptanması	53
4. BULGULAR.....	54

4.1. HepG2 Hücrelerinin Mikroskopik İnceleme Bulguları	54
4.2. Palmitik Asit ve CCCP'nin HepG2 Hücrelerinde Zamana Bağlı Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi İle Değerlendirme Bulguları	54
4.3. Palmitik Asit ve CCCP Uygulaması Yapılmış HepG2 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Sonuçları	59
4.4. cDNA Kontrol PZR.....	61
4.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) Sonuçları.....	61
4.6. İstatistiksel Analiz	72
4. TARTIŞMA	73
6. SONUÇLAR.....	80
7. KAYNAKLAR	82

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1 Otofaji adaptörleri ve reseptörleri.....	29
Tablo 2 İfadelemesi yapılacak olan genler.....	42
Tablo 3 İş akış planı	43
Tablo 4 Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)	51
Tablo 5 Komplementer DNA (cDNA) karışımı.....	52
Tablo 6 Kontrol PZR protokol	53
Tablo 7 10mM PA uygulaması MTT testi istatistiksel analiz (* $p < 0,001$).....	57
Tablo 8 10 μ M CCCP uygulaması MTT testi istatistiksel analiz (* $p < 0,001$)	58
Tablo 9 ve CCCP uygulamalarının RNA izolasyonu saflık ve konsantrasyon sonuçları	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 Mitokondriyon yapısı (9)	3
Şekil 2 Mitokondriyona protein taşınması (10)	5
Şekil 3 Mitokondriyal kalite kontrolde görevli proteazlar	8
Şekil 4 Ubikütin reaksiyonları (16)	9
Şekil 5 Ubikütin proteazom sistemi (17)	10
Şekil 6 Ubikütinlenme tipleri (15)	11
Şekil 7 Mitokondriyondan köken alan veziküller (24)	12
Şekil 8 Mitokondriyondan köken alan veziküllerin taşınması (26)	13
Şekil 9 Mitokondriyonla ilişkili degradasyon yıkım yolu şematik gösterimi (32)	15
Şekil 10 Mitokondriyonun yaşam döngüsü (36)	16
Şekil 11 Mitokondriyal Fizyon ve Füzyon (36)	17
Şekil 12 ER-mitokondriyon etkileşimi ve fisyon (41)	18
Şekil 13 Mitokondriyal Füzyon (38)	20
Şekil 14 Otofajinin aşamaları (36)	22
Şekil 15 Otofajinin tipleri (48)	23
Şekil 16 PINK1 ve Parkin proteinlerinin bölgelerinin gösterimi (53)	25
Şekil 17 PINK1/Parkin bağımlı mitofaji (52)	26
Şekil 18 Parkin/PINK1 bağımlı mitofaji (58)	26
Şekil 19 Reseptör aracılı (Parkin-bağımsız) mitofaji yolları (58)	27
Şekil 20 Reseptör aracılı mitofaji (64)	28
Şekil 21 Otofaji reseptörleri (68)	31
Şekil 22 p62 domain yapısı ve etkileşim gösterdiği partnerler (69)	32
Şekil 23 p62 otofaji reseptörü (72)	32
Şekil 24 Optineurin yapısı (78)	34

Şekil 25 Ubikütün bağımlı seçici otofaji süreci (74)	35
Şekil 26 Optineurin ve TBK1'in domain yapıları. A ile gösterilmiş olan OPTN, B ile gösterilmiş olan TBK1'dir (71).....	36
Şekil 27 Optineurin TBK etkileşimi (71).....	37
Şekil 28 Optineurin ve HACE1 etkileşimi (83)	37
Şekil 29 Palmitik asidin etkili olduğu yolların bir kısmı (88).....	40
Şekil 30 HepG2 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü (Olympus IX73, 20X büyütme)	54
Şekil 31 1mM PA uygulamasının MTT testi analizleri	55
Şekil 32 10µM CCCP uygulamasının MTT testi analizleri	56
Şekil 33 RNA izolasyonu sonucu %1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü	60
Şekil 34 cDNA kontrol PZR (insan β aktin PZR) örnekleri	61
Şekil 35 CHOP geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	63
Şekil 36 CHOP geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	63
Şekil 37 HSP10/HSPE1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	64
Şekil 38 HSP10/HSPE1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	64
Şekil 39 HSP60/HSPD1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	65
Şekil 40 HSP60/HSPD1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	65
Şekil 41 HACE1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	66
Şekil 42 HACE1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	66
Şekil 43 OPTN geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	67

Şekil 44 OPTN geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	67
Şekil 45 TBK1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	68
Şekil 46 TBK1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	68
Şekil 47 SQSTZM1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	69
Şekil 48 SQSTZM1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	69
Şekil 49 LC3-II/ MAPLC3B geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	70
Şekil 50 LC3-II/ MAPLC3B geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	70
Şekil 51 Parkin/ PARK2 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	71
Şekil 52 Parkin/ PARK2 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı.....	71

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AB	Adaptör bağlanma
ALS	Amiotropik Lateral Skleroz
AMPK	AMP-aktive olmuş protein kinaz
ANT	Adenin nükleotit translokaz
ATG	Otofaji ile ilişkili proteinler
ATP	Adenozin Tri Fosfat
bç	baz çifti
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3-like
BSA	Bovin serum albumin
C	Karboksi
C431	Sistein 431. Pozisyon
Ca ⁺²	Kalsiyum
CALCOCO2/NDP52	Calcium binding and coiled-coil domain 2
CCCP	Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon
cDNA	Komplementer DNA
DAG	Diaçil gliserol
DMSO	Dimetil sülfoksit
DRPs	Dynamin-ilişkili proteinler
DUB	Deubikütinasyon
ER	Endoplazmik Retikulum

ERİY	Endoplazmik Retikulum ile ilişkili degradasyon
ET	Elektron tomografisi
ETZ	Elektron Taşıma Zinciri
FBS	Fetal dana serumu
Fis1	Fisyon proteini 1
FKBP8	FK506-binding protein 8
H ⁺	Proton
HACE1 ligaz 1	HECT domain ve ankirin tekrarları içeren E3 ubikuitin protein
HepG2	İnsan Hepataselüler karsinom hücre hattı
HSC70	Isı şoku kökenli 70 kDa'luk protein
HSP	Isı şoku ailesi (Heat Shock Protein)
Htt	Huntingtin
IR	İnsülin direnci
K	Lizin
KFERQ	Lizin, fenilalanin, glutamat, arjnin, glutamin
KIR	Keap etkileşim bölgesi
LAMP-2A	Lizozomla ilişkili membran protein 2A
LC3	Light chain 3
LIR	LC3 etkileşim bölgesi
MAPL	Mitochondrial-anchored protein ligase
MDZ	Mitokondriyal dış zar

Mff	Mitokondriyal fisyon faktör
Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
MIA	Mitokondriyal import and assembly
MIM	Mitochondrial intertase of the outhar membrane
Mid49	Mitokondriyal dinamik proteinleri 49 kDa
Mid51	Mitokondriyal dinamik proteinleri 51 kDa
MİY	Mitokondriyon ile ilişkili yıkım
MİZ	Mitokondriyal iç zar
MKAV	Mitokondriyondan köken alan veziküller
MMP	Mitokondriyal membran potansiyeli
MPP	Mitokondriyal processing peptidaz
mPTP	Mitokondriyalpermeabilizasyon poru
Mt(DNA)	Mitokondriyal DNA
MTS	Mitokondriyal hedef dizileri
NASH	Non-alkolik steotohepatit
NAYKH	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NBR1	Neighbour of BRCA1 gene 1
NDP52	Nükleer nokta proteini 52
NFKB	Nükleer faktör kappa beta
NTG	Normal tansiyonlu glokom
Opa1	Optik Atrofi 1

OPTN	Optineurin
ORJPH	Otozomal Resesif Juvenil Parkinson Hastalığı
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
PA	Palmitik asit
PAM	Presequence translocase-associated motor
PARK2	Parkin
PARL	Rhomboid-benzeri serin proteaz
PB1	Phox ve bem1
PBS	Fosfat tuz tamponu
PI3K	Sınıf III fosfotidilinositol 3- kinaz
PINK1	PTEN-indüklediği kinaz 1
qRT-PZR	Eş zamanlı PZR
RBR	RING-between-RING
RIP protein	Transferrin reseptör, adenovirüs E3-14.7K, reseptör etkileşimli
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT	Revers transkriptaz
SAM	Sorting and assembly machinery
SDD	Sarmal iskele dimerizasyon domaini
SREBs	Sterol regulatory element binding proteins
Stx-17	Syntaxin-17
SYA	Serbest yağ asidi

T2DM	Tip 2 Diyabet
TAE	Tris asetik asit EDTA
TAX1/T6BP	Tax1 (human T cell leukemia virus type 1) binding protein 1
TB	Traf 6 bağlama domaini
TBK1	TRAF ile ilişkili NFκ-B aktivatörü (TANK) -bağlayıcı kinaz 1
TG	Trigliserid
TIM	İç zar translokazı
TKA	Tri karboksilik asit
TM	Transmembran dizisi
TOLLIP	Toll interacting protein
TOM	Dış zar Translokazı
UBA	Ubikuitin bağlanma domaini
UBD	Ubikuitin bağlanma domaini
UBL	Ubikuitin benzeri
UCP	Uncoupling proteinler
ULD	Ubikuitin benzeri domain
ULK1	Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz
UPS	Ubikuitin proteazom sistemi
VPS	Vacuolar proteins sorting
ZAB	Zarlar arası boşluk

1. GİRİŞ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) hepatik steatoz ve non-alkolik steatohepatit (NASH) olmak üzere iki spektrumdan oluşmaktadır. Alkol alımı, viral, genetik veya otoimmün bir etken olmaksızın fibröz, siroz veya hepatoselüler karsinom gelişebilmektedir. Artan görülme sıklığına (son veriler görülme sıklığının %25'e çıktığına işaret etmektedir) bağlı olarak mortalite ve morbidite hızındaki yükseliş nedeniyle de günümüzde önemli bir sağlık sorunu olarak yer almaktadır. Patogenezi aydınlatmaya yönelik tüm çalışmalara rağmen halen moleküler düzeyde mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Güncel bilgilerimiz iki virüs hipotezini ortaya koymaktadır. İnsülin direnciyle başlayan ilk virüsta karaciğerde serbest yağ asidi (SYA) akışı artar. Ancak oksitlenmeyen veya salgılanamayan SYA hepato-steatozunu oluşturur. Söz konusu bu oluşum ikinci virüsün alt yapısını oluşturarak, karaciğerde mitokondriyon işlev bozukluğu, Endoplazmik Retikulum (ER) stres ve adipokineze yatkınlığa neden olur (1,2).

Literatürde lipotoksisite artışını daha çok ER stresi ile ilişkilendirmişlerdir ancak mitokondriyal stres ve mitokondriyal kalite kontrol ile ilgili bilgilerin sınırlı olduğu görülmüştür. Lipotoksisite mitokondriyonda, lipidlerin beta oksidasyon kapasitesinin aşılmasına sebep olmaktadır. Tamamlanmamış SYA oksidasyonunun ve zararlı SYA türevli ara maddeleri de reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına, mitokondriyal fragmentasyon, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve hücre ölümüne yol açmaktadır (3).

Artan kalori alımı ve azalan fiziksel aktiviteye bağlı olarak gelişen obezite ve insülin direnci ile ektopik lipit birikimi gerçekleşmektedir. İnsülin direnci ve hiperinsülinemi ise denovo lipogenez ve trigliserid sentezini tetikler. Artan proinflamatuvar sitokinler ve stellat hücre aktivasyonuna bağlı olarak kollajen birikimi ve fibrozis gelişir. Yapılan çalışmalar lizozomal düzensizliğin ER stresine bağlı olarak hücre ölümünü geliştirdiğine işaret etmektedir. Oysaki güncel bilgilerimiz söz konusu hücre ölüm mekanizmalarında yalnızca ER stresinin değil, mitokondriyal stresin de etkili olabileceğine işaret etmektedir. Çünkü, işlevselliği bozulan mitokondriyon; hepatik

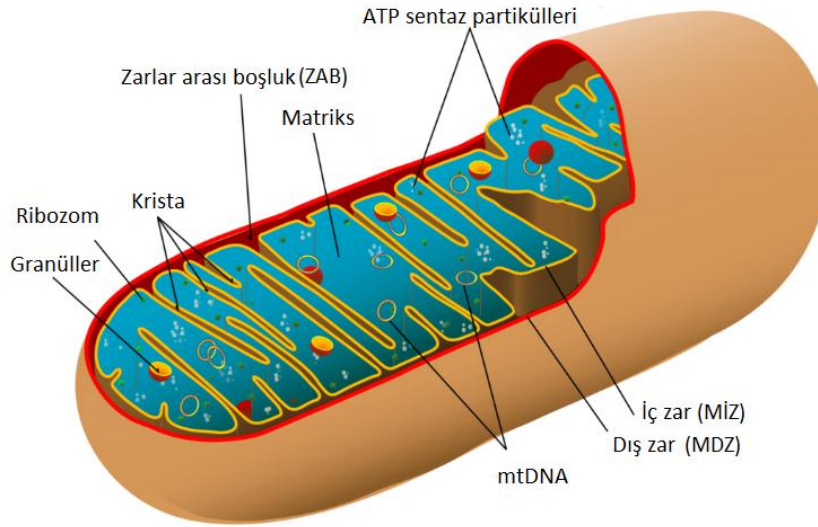
lipid hemeostazı, artan ROS oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu ve buna bağlı olarak hücre ölümünü tetikleyerek NAYKH patogenezinde rol almaktadır. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak NAYKH'de oluşan mitokondriyal parakristalin inklüzyonları da hastalığın patogenezinde mitokondriyonun aktif rol oynadığının bir belirticidir (2).

Mitokondriyon morfolojisi, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS), adenzin tri-fosfat (ATP) üretimi, programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesi, kalsiyum homeostazı ve ROS üretilmesi ve kontrolünü içeren fonksiyonlarıyla büyük ölçüde bağlantılıdır. Dengeli füzyon ve fisyon, metabolik talepleri karşılamak ve hasarlı organellerin uzaklaştırılmasını sağlamak için mitokondriyonu şekillendirir. Mitokondriyon dinamikleri, morfolojideki korozyona cevaben maruz kaldıkları dramatik değişikliklere bağlıdır. Obezite, kanser, kardiyovasküler ve nöromusküler hastalıklarda hücre işlev bozukluğuyla birlikte mitokondriyal fragmentasyon da gözlenmektedir (4).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondriyon

Mitokondriyon, bütün ökaryotik hücrelerde bulunan, dinamik semiotonom bir organel olup hücre içi fizyolojide önemli rol oynamaktadır (5). Endosimbiyotik teoriye göre α -prokaryotik köken alıp pre-ökaryotik hücreler tarafından etrafı sarılarak oluşan kimerik yapı; moleküler oksijeni kullanabilir hale gelmiştir (6). Çift zarlı bir yapısı olup endosimbiyotik kökenlidir. Hücresel ATP üretiminin büyük bir kısmı burada üretildiğinden ‘hücrenin enerji merkezi’ olarak kabul edilmesine ek olarak hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) ve demir homeostazı, aminoasit ve lipid metabolizması, redoks sinyalizasyonu, programlı hücre ölümü, mitokondriyal kalıtım, doğuştan gelen (innat) immünitenin regülasyonunda görev almaktadır (7,8).



Şekil 1 Mitokondriyon yapısı (9)

2.1.1. Mitokondriyon yapı ve özellikleri

Mitokondriyon; mitokondriyal dış zar (MDZ), zarlar arası boşluk (ZAB), mitokondriyal iç zar (MİZ) ve matriks olmak üzere dört temel bölümden oluşmaktadır.

MDZ; özelleşmiş transport proteinlerden oluşur. Küçük moleküller için geçirgendir ve ZAB bu moleküllerin geçişine engel olmaz. Bu zar KREBS döngüsünde katalizör rolü oynayan monoamine oksidaz, sitokrom-c reduktaz enzimleri yanısıra fosfolipid ve fosforik asit sentezi için gerekli birçok enzime sahiptir.

MİZ; kendi içinde invajinasyonlar yaparak krista yapısını oluşturur ve seçici geçirgenlik gösterir. Elektron transport zinciri (ETZ) enzimleri ve OXPHOS'a ait enzimler burada yerleşmiştir. Ayrıca ATP, ADP ve P₁, piruvat, süksinat, malat, sitrat ve α -ketoglutarat gibi özel maddeler için taşıma sistemine sahiptir.

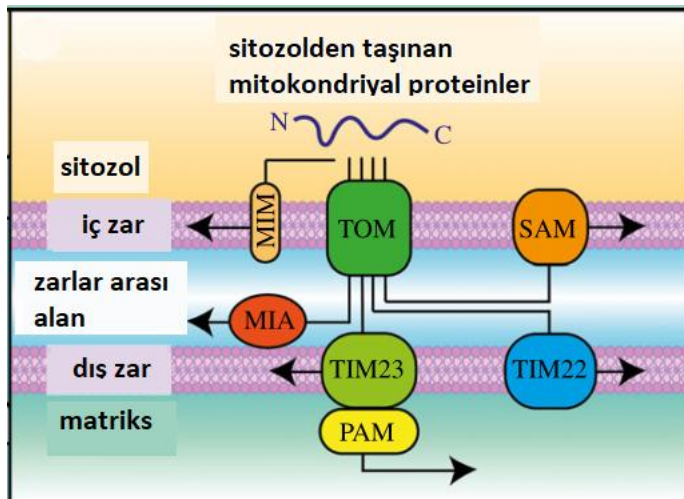
Matriks; jel kıvamında olup içinde erimiş birçok enzim bulunur. Bu enzimler, iç membranda yerleşmiş oksidatif enzimlerle işbirliği yaparak besinlerin CO₂ ve H₂O'ya çevrilmesine sonuçta ATP adı verilen yüksek enerjili bir maddenin oluşumunu gerçekleştirir. İç membrana bağlı olan matrikste trikarboksilik asit döngüsü (TKA) ve yağ asitlerinin β -oksidasyonunda görev yapan enzimler rol oynarlar. Matrikste mitokondriyonun kendi halkasal DNA'sı (mtDNA) bulunur ve mitokondriyonun çoğalmasında görev almaktadır (Şekil 1) (5,10,11).

Mitokondriyonun kendine ait genomu olmasına rağmen, yaklaşık 1500 mitokondriyal proteinden sadece 13 tanesi mtDNA tarafından kodlanır. Sentezlenen bu proteinler ETZ'de OXPHOS solunum kompleksleri I, III, IV ve ATP sentazda kullanılmak üzere görev almaktadırlar. Görev yapan diğer proteinler ise nükleer genom tarafından kodlanır, sitozolde sentezlenir ve '*translocase of the outer membrane*' (TOM) ve '*translocase of the inner membrane*' (TIM) kompleksleri aracılığıyla mitokondriyona taşınırlar (5,12).

Mitokondriyonda görevli öncül proteinlerin üzerinde mitokondriyal import sinyal dizileri bulunmaktadır. Bu diziler N-terminal ucunda, pozitif yüklü amfipatik α -

heliks yapısında olup, genellikle kanaldan geçtikten sonra mitokondriyal proteazlar ve peptidazlar aracılığıyla kesilirler (13,14).

TOM kompleksi çoklu altbirimi olan bir yapıdır ve mitokondriyal proteinlerin geçişi için reseptör ve geçiş kapısı olarak görev almaktadır. Mitokondriyal proteinler kanaldan geçebilmek için katlanmamış yapıda olmalıdır. TOM kanalından geçtikten sonra proteinler, aminoasit dizilerinde kodlu olan görev alacakları yere taşınırlar. Dış zar öncül proteinleri '*sorting and assembly machinery*' (SAM) kompleksine yerleşir. SAM kompleksi bazen TOM kompleksi ile eşleşmiş olarak görev almaktadır. Bazı dış zar proteinleri ise zara yerleşebilmek için TOM kompleksiyle beraber '*mitochondrial intertase of the outhar membrane*' (MIM) kompleksini kullanırlar. Zarlar arası alanda görev alan birçok protein ise '*mitochondrial import and assembly*' (MIA) yolağı adı verilen, protein taşınımı ve oksidatif katlanmanın kombine olduğu yolak aracılığıyla taşınırlar. İç zarda görev alan öncü proteinler ise iç zar translokazı TIM22 ve TIM23 komplekslerini kullanırlar. TIM22 mitokondriyal metabolitlerin ve çok geçişli transmembran proteinlerin geçişini kontrol eder. Matrikse protein taşınımı ise TIM23 kompleksi ve '*presequence translocase-associated motor*' (PAM) aracılığıyla olmaktadır. TIM23 ayrıca iç zara transmembran domaini üzerinden tutunmuş olan proteinlerin geçişinde de kullanılmaktadır (Şekil 2) (11).



Şekil 2 Mitokondriyona protein taşınması (10)

2.2. Mitokondriyal Kalite Kontrol

Mitokondriyonun fonksiyonu ve hücrel metabolizması mitokondriyal proteomun devamlılığına bağlıdır. Mitokondriyal proteom hücrel ihtiyaçlara göre sağlanmakta olup protein taşınımı ve proteinlerin kalite kontrolü sayesinde gerçekleşmektedir. Bu olaylar protein sentezi, trafiği, matrikse alınması, katlanması, protein turnoverını ve homeostazını kapsamaktadır (15).

Mitokondriyona protein transportu gerçekleştiğinde şaperonlardan ayrılan proteinler katlanmaya başlayarak olgun hale geçerler ve birçoğu multimerik kompleksleri meydana getirir. Eş zamanlı olarak da protein kalite kontrol mekanizması çalışmaya başlar. Mitokondriyal kalite kontrol mekanizması moleküler şaperonların ve protein yıkım faktörlerinin özenli çalışmasıyla proteomun bütünlüğünü sağlamaktadır. Mitokondriyal protein homeostazında önemli göreve sahip olan şaperonlar, Isı Şoku Ailesi- 'Heat Shock Protein' (HSP) HSP60, HSP70 ve HSP78 ailesidir (15).

Mitokondriyal protein kalite kontrolü; hasarlanmış mitokondriyonun tespiti, onarımı ve eğer onarılamıyorsa da seçici olarak hücreden elimine edilmesini gerçekleştiren mekanizmadır. Hasarın derecesine göre onarım çeşitli seviyelerde olabilmektedir. Burada evrimsel olarak korunmuş mitokondriyal proteazlar ve şaperonlar mitokondriyonun çeşitli kompartmanlarında bulunurlar ve ubikütün proteazom sistemi (UPS) gibi sitozolik proteolitik sistemler ile birlikte görev alırlar (5).

Kalite kontrolde ATP bağımlı HSP60, HSP70 şaperonları proteinlerin matrikste sınıflandırılması, katlanması ve tasnifini kontrol etmektedir. HSP70 ve HSP90 şaperonları ise; sitozolde görev alarak, yeni sentezlenmiş, katlanmamış polipeptitlerin agregat oluşumunu önlemekte ve mitokondriyona transportunu sağlamaktadır (5).

Mitokondriyal kalite kontrolün proteolitik basamağı ise proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Proteazlar iki gruba ayrılır. Bunlar:

1. ATP bağımlı AAA^+ proteazlar:

ATP-bağımlı proteazlardan ClpXP ve Lon/Pim1 proteazlar matrikste lokalize olup; oksidatif olarak hasarlanmış ve degrade olmuş proteinlerin yıkımından sorumludur. Matriks-AAA (m-AAA) proteazlar aktif kısımları iç zarın matrikse bakan kısmındadır ve inter membran boşluktaki AAA (i-AAA) proteazların ise aktif kısmı zarlar arası alandadır. Bu proteazlar iç zarla ilişkisi olan fonksiyonu bozulmuş proteinlerin ortadan kaldırılmasından sorumludur. AAA⁺ proteazların homooligomerik (Lon/Pim1, i-AAA) ya da heterooligomerik (m-AAA, ClpXP) kompleksleri bulunur ve proteolitik aktiviteleri ATP hidroliziyle gerçekleşmektedir. (Şekil 2.3) (5).

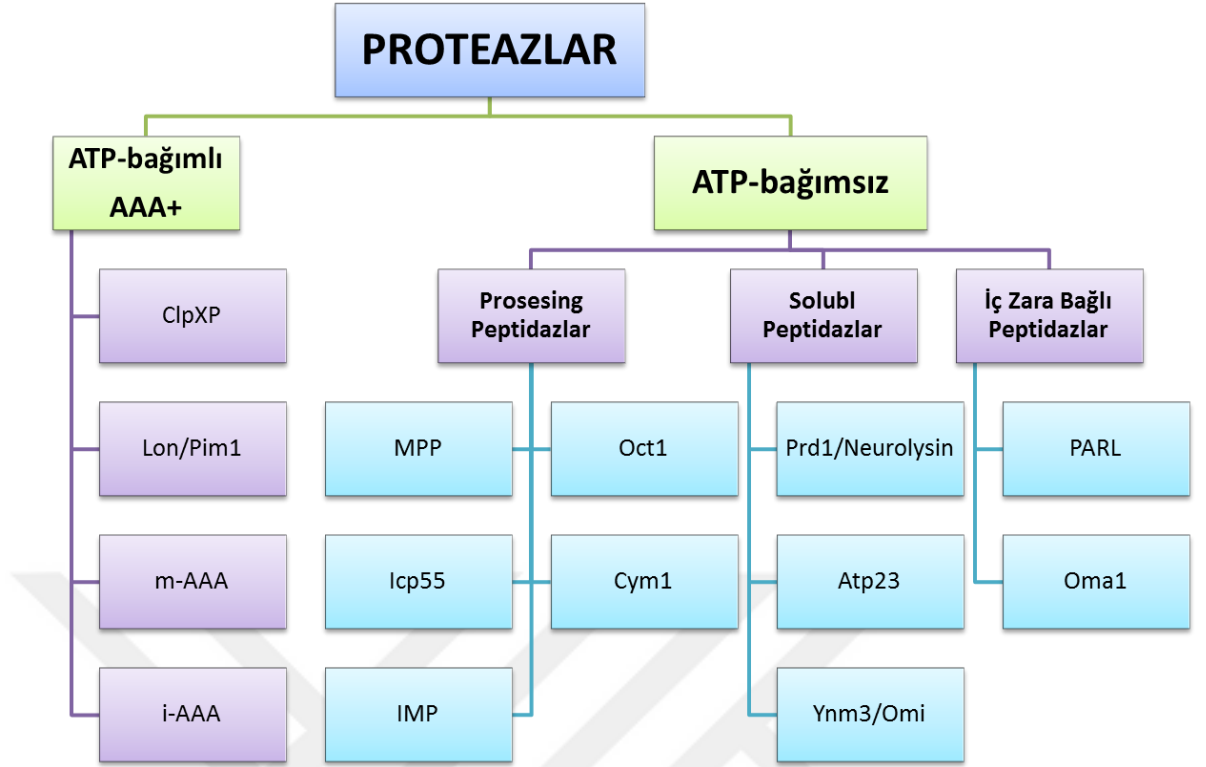
2. ATP bağımsız proteazlar:

Daha heterojen yapıda olan ATP-bağımsız proteazlar ise 3 gruba ayrılır.

2.a. İşlemci- ‘*Processing*’ peptidazlar matrikste ya da iç zarda görev almak üzere hedeflenen proteinlerin mitokondriyal hedef dizilerini- ‘*mitochondrial target sequence*’ (MTS) yıkarak proteinlerin biyogenezini, sınıflandırılmasını ve stabilizasyonunu sağlamaktadır.

2.b. Solubl peptidazlar zarlar arası alanda mitokondriyal kalite kontrolü sağlamaktadır.

2.c. İç zara bağlı peptidazlar ise iç zardaki proteomu kontrol etmekte ve mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesini sağlamaktadır (Şekil 2.3) (5).



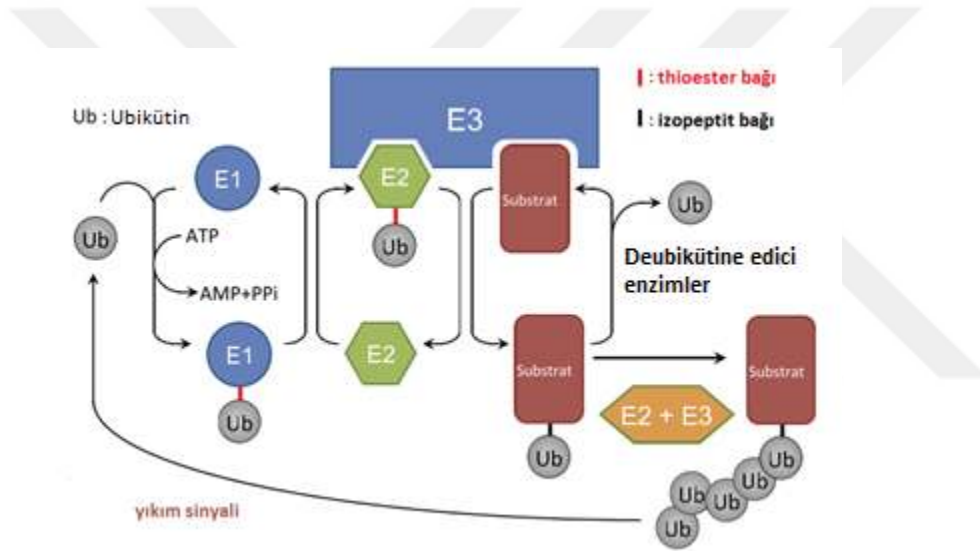
Şekil 3 Mitokondriyal kalite kontrolde görevli proteazlar

Güncel bilgilerimiz dahilinde mitokondriyal kalite kontrolde görev alan beş temel mekanizma tanımlanmıştır. Bunlar:

1. Ubikütün proteazom sistemi
2. Mitokondriyondan köken alan veziküller
3. Mitokondriyonla ilişkili yıkım
4. Fisyon-Füzyon
5. Mitofaji

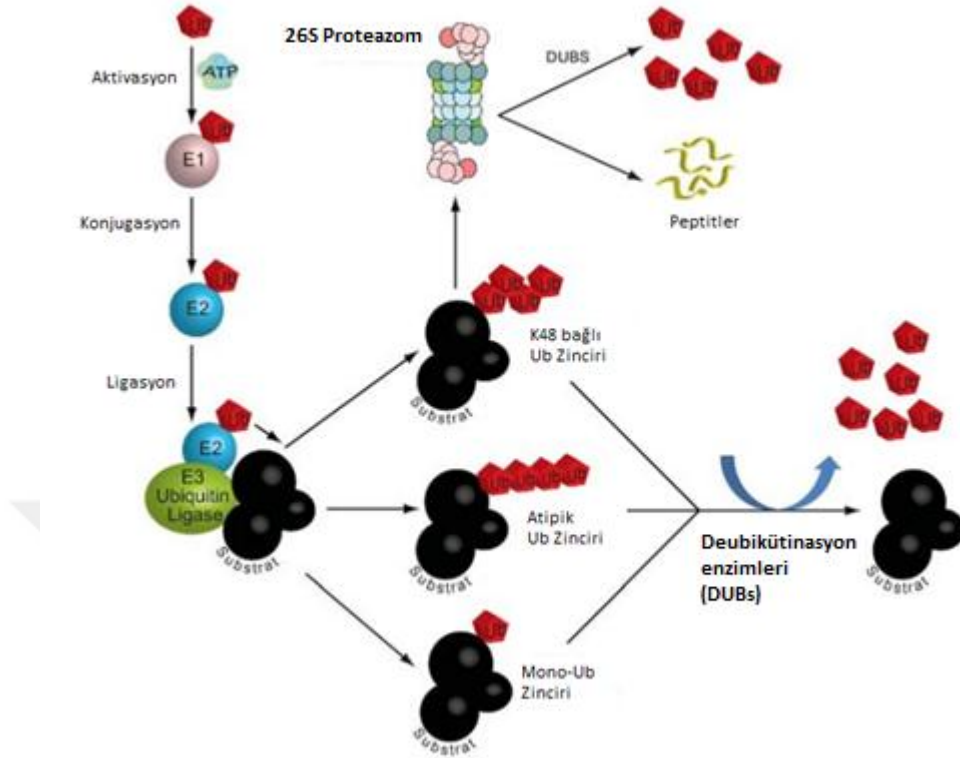
2.2.1. Ubikütün proteazom sistemi (UPS)

Ubikütün proteazom sistemi (UPS) hasarlanmış ya da agreagat oluşturma eğilimi olan proteinlerin seçici olarak yıkılmasından sorumludur. UPS; küçük kısa ömürlü veya hasarlanmış proteinlerin yıkımında işlevseldir. Ubikütün 76 rezidüden oluşan globüler ve oldukça korunmuş bir proteindir. Hedeflenen proteine kovalent olarak bağlanarak ATP bağımlı aktivasyonla yıkımı gerçekleştirir (16). Fonksiyonlarına göre 3 tip ubikütün enzimi vardır. Bunlar E1 ubikütün aktive edici enzim, E2 ubikütün konjuge edici enzim ve E3 ubikütün ligazdır (Şekil 4) (17).



Şekil 4 Ubikütün reaksiyonları (16)

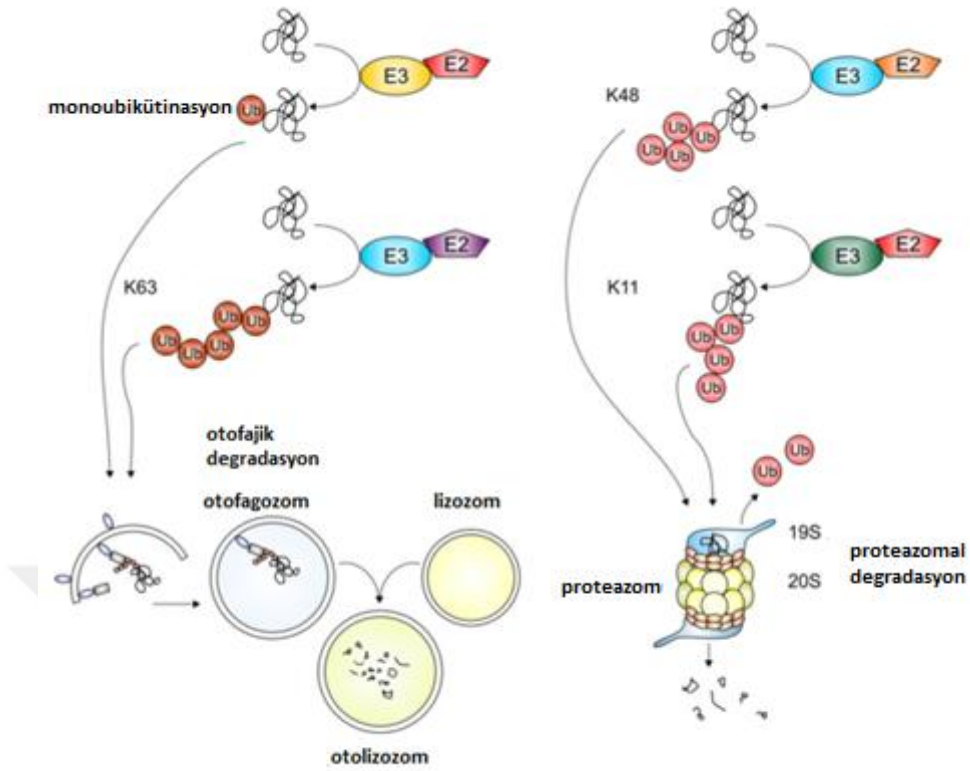
Ubikütünin C-terminal bölgesi ile E1 arasında yüksek enerjili tiyoester bağı bulunur. Ubikütün E1'den E2'nin katalitik sistein rezidülerine transfer olur. Devamında da ubikütün E3'ün substratına transfer olarak izopeptit bağı oluşturmaktadır. İnsan genomunda 600'den fazla E3 ubikütün ligaz kodlanmaktadır. Fonksiyonları ise E2'yi aktive ederek ve substratı hazırlayarak ubikütün transferini katalizlemektir (16).



Şekil 5 Ubikütün proteazom sistemi (17)

Ubikütünlenme reaksiyonu geri dönüşümlü bir süreçtir. Deubikütünasyon enzimleri (DUBs) ubikütünlerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Şekil 5) (16,17).

Ubikütün zincirleri 7 farklı lizin (K) rezidüsüne peptit bağıyla konjuge olabilmektedir. Bunlar K6, K11, K27, K33, K48 ve K63'tür. Substrata tutunan ubikütün zincirinin tipi de hücrenin kaderini belirlemede kritik bir öneme sahiptir. Proteazomal degradasyon için kullanılan kanonikal sinyal 4-6 ubikütün rezidüsünün K11 veya K48. pozisyonundan bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. K63. pozisyonundaki monoubikütünasyon ya da poliubikütünasyon ise otofajik yıkım yoluna yönlendirmektedir. Bu özelliği nedeni ile de ubikütünlenme işlemi yalnızca hatalı/hasarlı proteinlerin yıkımında değil; hasarlı veya sayısı azaltılmak istenen organellerin de seçici olarak imha edilmesine olanak sağlamaktadır (Şekil 6) (18,19).



Şekil 6 Ubikütinlenme tipleri (15)

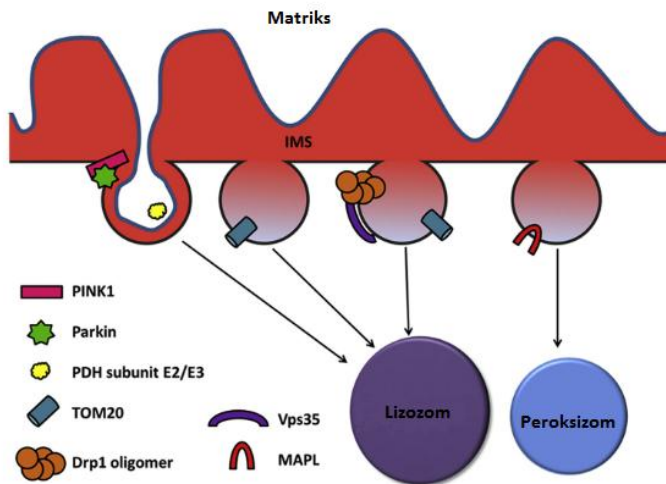
26S proteazom, sitoplazmada ve çekirdekte lokalize multikatalitik proteaz kompleksidir. Poliubikütinlenmiş proteinler genellikle 26S proteazom tarafından yıkılmaktadır. Yapısına bakıldığında esas proteaz işlevinin olduğu 20S'lik fıçı şekilli çekirdek bölgesi, iki adet ubikütinlenmiş substratı tanıyan ve katlanmasını açan 19S'lik düzenleyici şapka benzeri kompleks bölgeden meydana gelmektedir. 20S çekirdek bölgesi iki halka 7 α subünit ve iki halka 7 β subünitten oluşmaktadır. β subünitlerden 3 tanesi ise katalitik olarak aktif özellik göstermektedir. 19S düzenleyici kompleks ise 19 özgün proteinden oluşmaktadır ve bunlardan 6 tanesi AAA ailesi ATPaz'larından oluşmaktadır. 20S çekirdek ve 19S şapka yapısının oluşumu için ATP bağlanması gerekmektedir (20,21).

2.2.2. Mitokondriyondan köken alan veziküller (MKAV)

Mitokondriyal kalite kontrolde görev alan bir diğer mekanizma ise mitokondriyondan köken alan veziküllerdir (MKAV). İlk olarak 2014 yılında McBride ve arkadaşları tanımlamıştır (22). MKAV'lar özellikle kardiyomiyosit hücrelerinde mitokondriyal kalite kontrolde işlevseldir (23). Yapıları 50-150 nm arasında olup elektron mikroskopuyla gözlemlenmektedir (24).

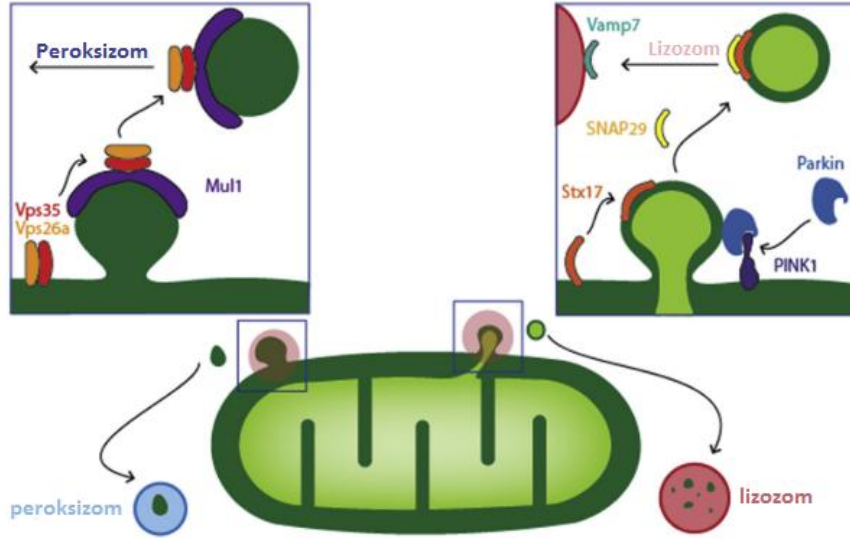
MKAV oluşumu mitokondriyonun ataları olan arkeabakterilerden beri korunmuş bir mekanizmadır. MKAV mitokondriyonda bir hasar meydana geldiğinde ilk savunma mekanizması gibi hareket ederek hasarlanmış olan yapının mitokondriyondan uzaklaştırılmasını sağlamakta ve böylelikle tüm organelin kaybı önlenmektedir (22).

MKAV'ler şekilleri ve kargolarının mitokondriyal belirteçlerine göre tanımlanmakta olup bu belirteçlerle taşınacakları adres belirlenmektedir. Mitokondriyondan tomurcuklanan veziküllerde '*mitochondrial-anchored protein ligase*' (MAPL, Mul1, MULAN, GIDE veya HADES) varsa bu vezikül doğrudan peroksizoma taşınırken; üzerinde TOM20, PINK1, Parkin, Drp1 gibi belirteçlerin ifadelendiği veziküller ise lizozoma taşınmaktadır (Şekil 7) (25,26).



Şekil 7 Mitokondriyondan köken alan veziküller (24)

MAPL bir mitokondriyal ubikütin ve SUMO E3 ligaz olup dış zarında iki transmembran domaini kapsamakta ve C-terminal RING domaini sitozole bakmaktadır. Hücre büyümesi, apoptozun uyarılması ve doğuştan gelen bağışıklıkta antiviral sinyalizasyonun modülasyonunda görevleri vardır. Mitokondriyal kalite kontrolde ise MKAV'lerin oluşumunda görev almaktadır. Ubikütin ve SUMO E3 ligaz aktivitesiyle mitokondriyal ağın yeniden modellenmesi sağlanmaktadır. MAPL aşırı ifadelenmesi ise veziküler yapıların oluşumunu sağlayarak Vps35 ve Vps26a olarak isimlendirilmiş retromer kompleks üyeleri ile birlikte görev alarak peroksizom ile birleşmektedirler (Şekil 7) (27,28).



Şekil 8 Mitokondriyondan köken alan veziküllerin taşınması (26)

Lizozoma taşınan MKAV'lerin özelliklerine bakıldığında ise bunların bazılarında TOM20 belirteci varken; bazılarında TOM20 olmayan ancak matrikse ait proteinler olan veziküller lizozoma taşınmaktadır. Ayrıca bu veziküllerin tomurcuklanma bölgelerinin Parkin proteinince zengin olduğu belirlenmiştir. Bütün bu yapıların syntaxin-17 (Stx17) ve PINK1 proteinlerine bağlı olduğu görülmüş ancak Parkin proteinin E3 ligaz aktivitesinin görev almadığı raporlanmıştır. Bu tipteki MKAV'ler oksidatif stres sonucu meydana gelen yapılardır. Lizozom ile birleşme de SNARE proteinlerine benzer bir mekanizmayla gerçekleşmektedir. SNAP29 ve VAMP7 proteinleri aracılığıyla füzyon gerçekleşmektedir (Şekil 8) (27,29).

2.2.3. Mitokondriyon ile ilişkili yıkım (MİY)

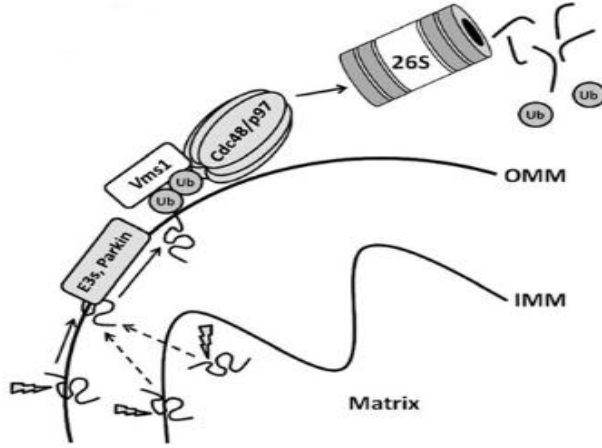
Mitokondriyal kalite kontrolde görev alan bir başka sistem ise Mitokondriyon İlişkili Yıkım (MİY) yolağıdır. MİY ile MDZ proteinlerinin yıkılması gerçekleştirilmektedir (30).

MİY; ER ile ilişkili yıkım (ERİY) yolağının analogu olarak gösterilmektedir. ER lümeninde UPS bulunmamaktadır. Burada ERİY adı verilen bir kalite kontrol sistemi işlevseldir. ER lümeninde bulunan hatalı katlanmış ya da agregat oluşturabilecek proteinler retrotranslokasyonla sitozole taşınarak UPS sistemiyle yıkım gerçekleşir. Yıkılacak olan proteinler sitozole çıkarken çeşitli E3 ubikülin ligazlarla ubikülinlenir ve ER membranından uzaklaşarak 26S proteazom aracılığıyla yıkılırlar (31–33).

ERİY benzeri sistem olan MİY ise mitokondriyal matriks ya da iç zar proteinlerinin dış zara retrotranslokasyonu takiben ubikülinlenerek UPS ile yıkılmasıdır. MİY yolağı mayalardan memelilere kadar korunmuş bir mekanizmadır (33).

Oldukça korunmuş AAA-ATPaz olan Cdc48 (memelilerde VCP) MİA ve ERİY sistemlerinde anahtar role sahiptir. Bunun dışında diğer bir AAA-ATPaz olan Msp1 (memelilerde ATAD1) de alternatif substrat ayırıcı faktör olarak görev almaktadır ve mitokondriyal substratların proteazoma yıkılması için teslim edilmesinden sorumludur. MİA ve ERİY ayrıca Vms1 (memelilerde VMS1) ve Ufd1 (memelilerde UFD1L) adlı substrat-toplayıcı faktörü paylaşmaktadır. Vms1 ve Ufd1 Npl4 (memelilerde NPL4) adlı bir diğer faktöre bağlanmaktadır. Oluşan bu kompleks yapı da Cdc48'e bağlanmaktadır (Şekil 9) (34,35).

Çeşitli E3 ligazlar da, MİY sisteminde görev almaktadır. Bunlar memelilerde Parkin ve MARCH5 olarak adlandırılmış olup; ubikülinlenmede işlevseldir. Mitokondriyonla ilişkili DUB'lar da (memelilerde USP30) MİY'in modülasyonunda da aktiftir (34).



Şekil 9 Mitokondriyonla ilişkili degradasyon yıkım yolu şematik gösterimi (32)

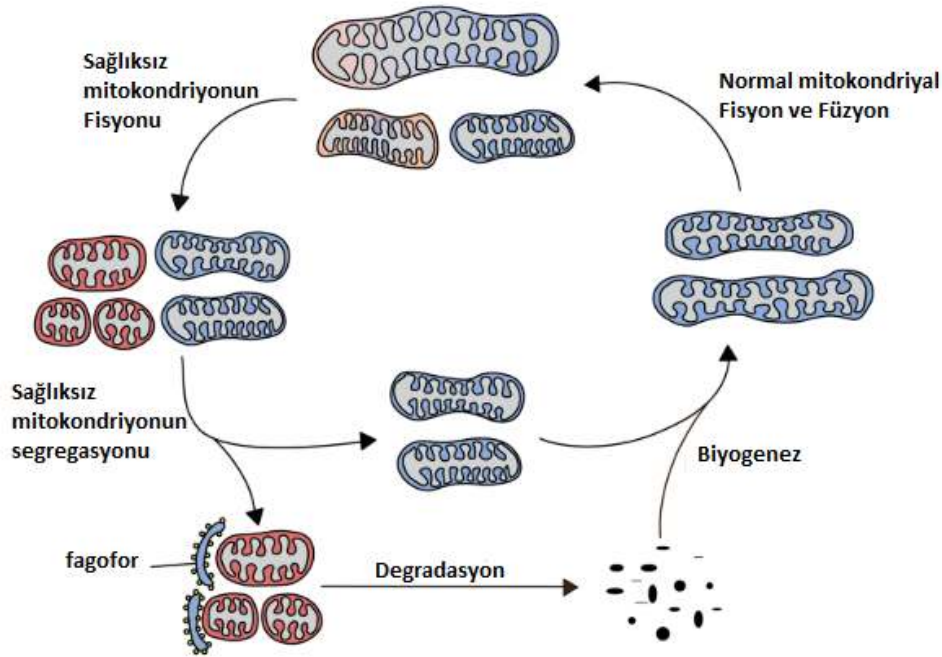
2.2.4. Mitokondriyal fisyon ve füzyon

Mitokondriyon dinamik bir organel olup, kendi yaşamının devamlılığı, hücre büyümesi, bölünme ve farklılaşma süreci gibi değişen koşullara adaptasyonda devamlı olarak fisyon ve füzyona uğramaktadır (36).

Hücre içinde mitokondriyon, morfolojik plastisiteye sahiptir. Özellikle hücrenin metabolik aktivitesine göre yapısını değiştiren mitokondriyon zaman zaman ağ yapısında bulunduğu gibi bazen de tane şeklini almaktadır. Mitokondriyal homeostaz, hücre stabilizasyonu ve sağ kalımı ise; küçük fragmente mitokondriyon ve uzun birbirine bağlı mitokondriyal ağ arasındaki dengenin sağlanması ile gerçekleşmektedir. Fisyon, fonksiyonunu yitirmiş, hatalı protein içeriğine sahip, membran stabilizasyonunu kaybetmiş, mtDNA mutasyonuna ya da hasarına sahip mitokondriyonun segregasyonudur. Füzyon ise farklı mitokondriyal matriks metabolitlerinin, intakt mtDNA'nın ve membran bileşenlerinin birbirine bağlanmasıdır (Şekil 10) (37).

Füzyon ve fisyon arasındaki dinamik geçişler sadece mitokondriyonun fonksiyonunu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücresel beslenme ve hücrenin metabolik durumuna göre de ihtiyaçlarına yanıt oluşturur. Ayrıca, füzyon ve fisyondaki farklı

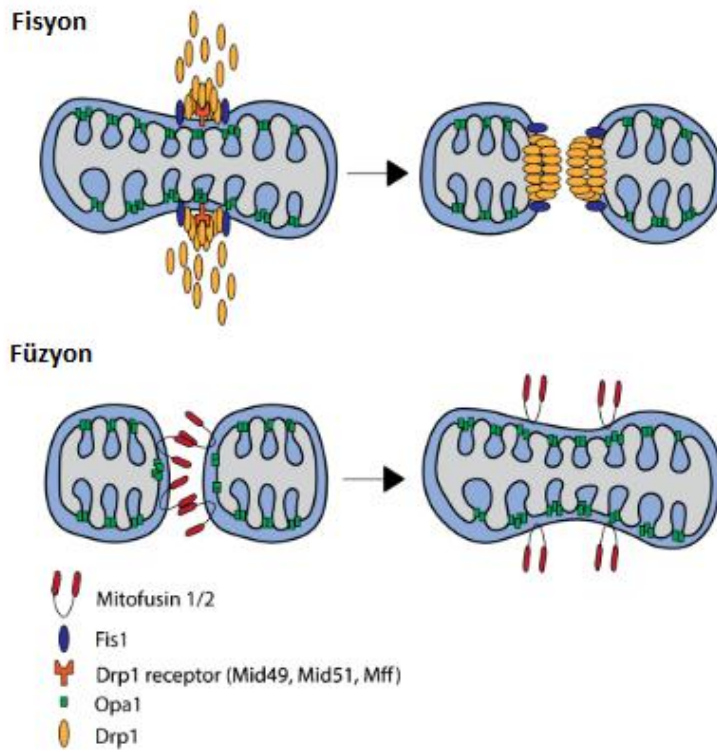
morfolojik durumlar çoklu fizyolojik ve patofizyolojik koşullarla ilişkilidir. Fragmente mitokondriyon sıklıkla mitokondriyal disfonksiyonla bağlantılıdır, çünkü bu morfolojik durum yüksek stres seviyeleri ve hücre ölümü sırasında görülmektedir. Bununla birlikte mitokondriyal fragmentasyon, hücre döngüsünün G2/M fazında da gözlenir ve mitokondriyal mobilite, kalite kontrol ve mtDNA kalıtımı için gereklidir. Kaynaşmış bir mitokondriyal ağ ise matriks bileşen dağılımına ve OXPHOS aktivitesinin uyarılmasına izin vermektedir. Mitokondriyal uzama ayrıca, hücresel açlık ile tetiklenen otofajide fagofora alınmaya karşı koruma sağlar ve temel olarak hücre sağ kalım mekanizmaları ile ilişkilidir. Fisyon ve füzyon olayları dinamin-ilişkili proteinler- '*Dynamin related proteins*' (DRP) ailesi tarafından düzenlenmektedir. DRP'ler kendiliğinden bir araya gelen GTPaz'lardır. Bu enzimler oligomerize olabilirler, konformasyonunu değiştirerek membranın yeniden biçimlenmesi, daralması, parçalanması ve/veya füzyonunu sağlayabilir (38).



Şekil 10 Mitokondriyonun yaşam döngüsü (36)

2.2.4.1. Mitokondriyal fisyon

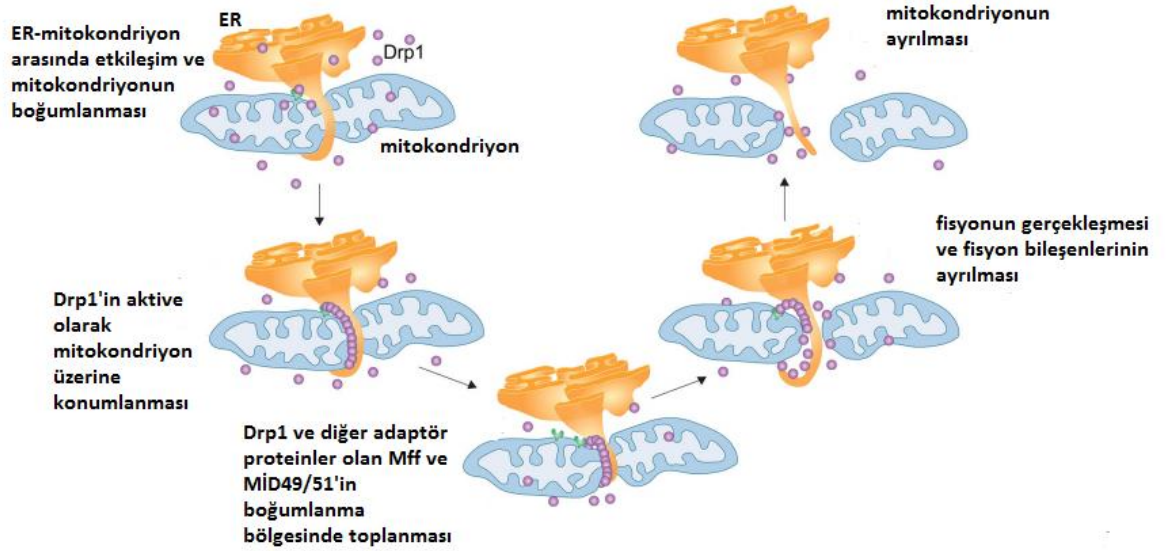
Fisyonu katalizleyen temel medyatör Drp1 olup, sitokinetik olmayan hücre bölünmesinde görev almaktadır. Drp1, sitozolde dağılmış olarak bulunmaktadır. Fosforilasyon/defosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarla aktive olarak aktin ve mikrotübül proteinleri aracılığıyla mitokondriyon dış zarına taşınmaktadır. Drp1 mitokondriyal dış zarda pozisyonunu aldığı anda Drp1 reseptörü adı verilen dört adet mitokondriyona bağlı protein ile etkileşime geçmektedir (Şekil 11). Bunlar; mitokondriyal dinamik proteinleri 49 kDa ve 51 kDa (Mid49 ve Mid51), mitokondriyal fisyon proteini 1 (Fis1) ve mitokondriyal fisyon faktör (Mff)'den meydana gelmektedir. Fis1 18kDa'dan oluşan bir adaptör proteindir ve mitokondriyal dış zara tutunmuş halde bulunmaktadır. Drp1'in görevlendirilmesinde ve fisyon kompleksinin oluşumunda görev almaktadır (37,39,40).



Şekil 11 Mitokondriyal Fizyon ve Füzyon (36)

Mitokondriyal bölünme sırasında Drp1, MDZ üzerinde lokalize olur ve kesilecek olan bölgenin üzerinde yüzük benzeri bir yapı oluşturarak membranın boğumlanmasını sağlar. Bu sırada GTP hidrolizi daralmayı hızlandırır ve kopacak olan bölgeyi belirler (41).

Mitokondriyon ve ER membranları arasında Ca^{+2} transportu, apoptotik sinyalizasyon ve lipid metabolizmasına aracılık eden yakın bir mekansal ilişki vardır. Bu organel ağlarının yakın temasları elektron tomografisi (ET) ile 9-30 nm arasında ölçülmüş olup geniş ve genellikle kümelenmeler halinde görülen, membranlar arasında trafiğin çift yönlü olduğu yerlerdir. Son zamanlarda, yapılan çalışmalarda ER-mitokondriyon arasındaki temasların mitokondriyal fisyonunda da var olduğu gösterilmiştir. ER tübüllerinin sadece mitokondriyonla temas kurmayıp, aynı zamanda etrafına sarılarak mitokondriyonun daralmasına da yol açtığı bildirilmiştir (Şekil 12) (41,42).



Şekil 12 ER-mitokondriyon etkileşimi ve fisyon (41)

2.2.4.2. Mitokondriyal füzyon

Füzyon ise üç farklı GTPaz tarafından katalizlenmektedir. Bunlar Optik Atrofi 1 (Opa1), Mitofusin 1 (Mfn1) ve Mitofusin 2 (Mfn2)'dir. Mfn1 ve Mfn2 mitokondriyal dış zarın birleşmesinden sorumludur. Opa1 ise iç zarın birleşmesinden sorumludur. İç zar ve dış zarın füzyonu temel olarak proteolitik yıkım ve ubikütinasyonla gerçekleştirilmektedir (15,39,40,43).

Mfn2 füzyonda görev almasının dışında ER-Mitokondriyon temas noktası tutunmasında da görev almaktadır. Füzyonda görev alan tüm proteinler birleşecek olan iki mitokondriyonun temas bölgelerinde toplanarak homo/heterotipik kompleks yapıları oluşturarak mitokondriyal füzyonu gerçekleştirir (38).

Mitokondriyal füzyon üç farklı adımla karakterize edilir. Bunlar:

1. İki mitokondriyonun karşılıklı tutunması
2. Membranların kenetlenmesi ve temas yüzeyinin arttırılarak membranlar arası mesafenin azaltılması
3. MDZ'nin GTP hidrolizi sonucu oluşan konformasyonel değişikliklerle birleşmesidir (Şekil 13) (38).

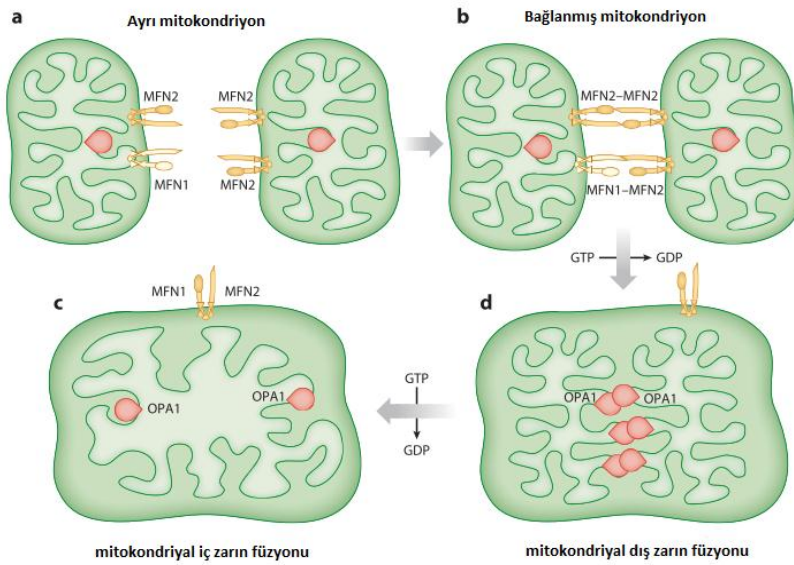
MDZ füzyonu gerçekleştiğinde MİZ füzyonu da gerçekleşir. İç zarın füzyonunda Opa1 ve özel lipid bileşenleri görev alır. Opa1 en az iki bölgesinden proteolitik kesilmeyle daha kısa ve çözülebilir fragmanları meydana getirir. Bu kesilmeler S1 ve S2 bölgelerinden OMA1 ve YME1L proteazları aracılığıyla gerçekleştirilir (38).

Opa1 proteininin füzyondaki görevi dışında fonksiyonları da vardır. Bunlar; ETZ ve membran potansiyelinin devamlılığı, mtDNA'nın devamlılığı, apoptozun kontrolü ve krista organizasyonudur. Opa1 krista yapılarını değiştirerek sitokrom C salınımını sağlamaktır ve apoptozu tetiklemektedir (44).

Mitokondriyon, çeşitli stres faktörlerinin etkisiyle proteinlerinin, lipidlerinin ve mtDNA'nın hasarlanmasına yatkındır ve mitokondriyal füzyon, bu hasarı hafifletmek veya ortadan kaldırmak için organeller arasında mtDNA ve mitokondriyal içeriğin

değişimini sağlar. Böylelikle mitokondriyonun devamlılığının sağlanmasında füzyon önemli bir rol oynar. Fiyon ise fonksiyonunu yitirmiş mitokondriyonu sağlıklı mitokondriyondan ayırır ve hasarlı mitokondriyon da otofaji ile imha edilir (44).

Mitokondriyal füzyon ve fisyon dengesi, sadece mitokondriyal membran potansiyelini değil aynı zamanda redoks durumu, beslenme ve toksisite yükü gibi hücre içi ve hücre dışı parametreleri de kapsar. Mitokondriyon, bu stres faktörleri ve füzyon mekanizması ile uzun ağısı mitokondriyon oluşturarak baş eder. Ancak stresin süresi uzar ve mitokondriyal hasar çok fazla olursa, bu durum ölüm için sinyal oluşturur; mitokondriyal fragmentasyon, MDZ permeabilizasyonu ve sitoplazmaya sitokrom C salınımıyla ölüm gerçekleşir (44).



Şekil 13 Mitokondriyal Füzyon (38)

2.3. Otofaji

Otofaji tüm ökaryotlarda korunmuş, katabolik bir süreç olup; hücre içi yıkım sistemidir. İzole membran (fagofor) yıkılacak olan hücresel bileşenleri, sitozolik protein agregatlarını ve mitokondriyon gibi organelleri otofagozom olarak adlandırılan

çift membranlı yapının içine almaktadır. Ve daha sonra lizozomla birleşerek otolizozomu oluşturarak, yıkım işlemi gerçekleştirir (37,45–48).

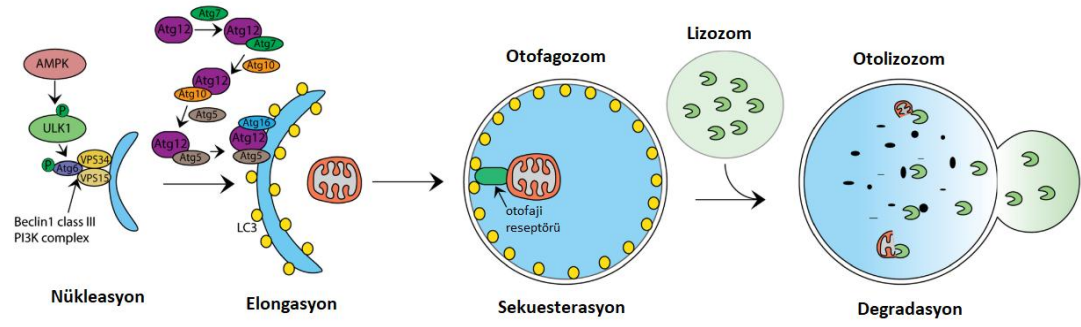
Otofagozom gelişimi dört fazdan oluşmaktadır. Bunlar: (i) nükleasyon, (ii) elongasyon, (iii) sekuesterasyon ve maturasyon (iv) füzyon ve yıkım.

i) İzole mebranın nükleasyonu ilk olarak Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz (ULK1) kompleksinin AMP-aktive olmuş protein kinaz (AMPK) tarafından fosforlanması ile gerçekleşir. Fosforlanma sonucu ULK1 çeşitli otofaji ile ilişkili proteinleri (Atg) otofagozom oluşum bölgesine görevlendirir, Beklin1 (Atg6) fosforlanır ve sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) kompleksi [Beklin 1 ve *vacuolar proteins sorting* 34 ve 35 (VPS34 ve VPS35)] aktive olarak fagoforun nükleasyonu sağlanır.

ii) Elongasyon aşaması ise iki ubiküitin benzeri sistem tarafından gerçekleşir. Bunlardan birincisi Atg5-Atg12 konjugasyon sistemi olup; ilk olarak Atg7 Atg12'i aktive etmekte ve daha sonra hedef proteini Atg5 olan Atg10'a transfer olmaktadır. Atg5-Atg12 daha sonra Atg16 ile dimerik kompleks bir yapı oluşturarak fagofor membranının hedefini oluşturmaktadır. Diğer sistemde ise Light Chain 3 (LC3) bir sistein proteaz olan Atg4 tarafından kesilir, Atg7, Atg3 ve LC3 ile birlikte görev olarak otofagozom membranının uzamasını gerçekleştirmektedir.

iii) Sekuesterasyon ise yıkılacak olan hasarlı bileşiklerin etrafının membranla çevrilmesi aşamasıdır. Burada LC3'ün çeşitli proteinler ve reseptörlerle yıkılacak olan mebran içine alınır.

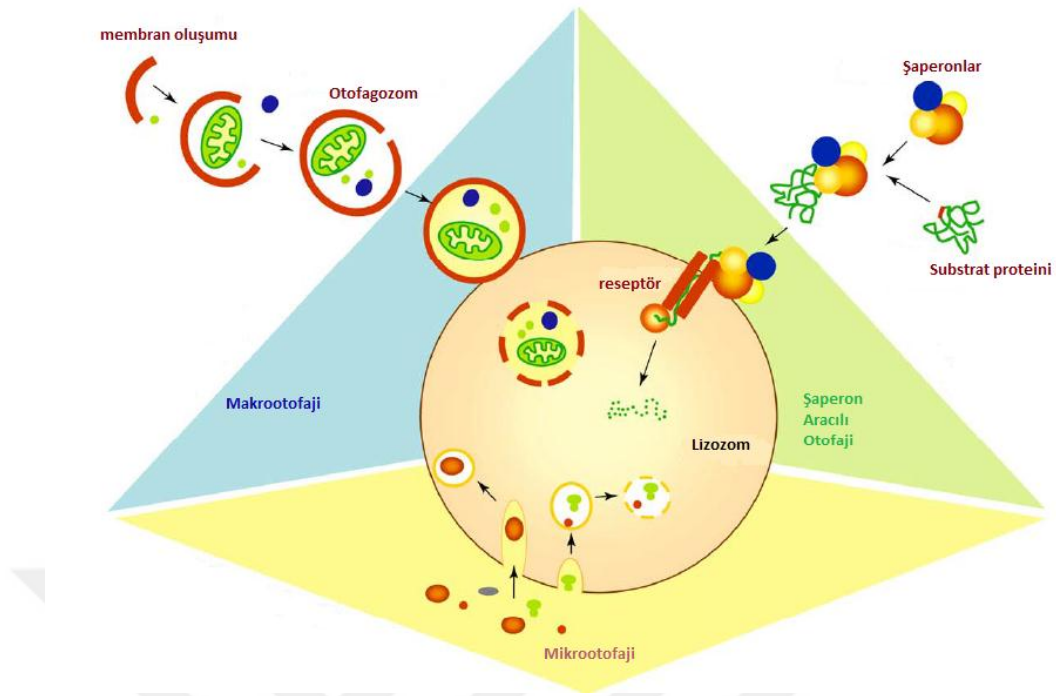
iv) Yıkım aşamasında ise otofagozom lizozom ile birleşir ve içindeki kargo asit hidrolaz enzimleri aracılığıyla yıkılır (Şekil 14) (37).



Şekil 14 Otofajinin aşamaları (36)

Substratın lizozoma getiriliş biçimine göre üç tip otofaji vardır. Bunlar:

1. Makrotofaji: otofaji olarak da isimlendirilmektedir. Yıkılacak olan protein ve organellerin sitoplazma ile beraber fagofora alınıp yıkılması işlemidir. Makrotofaji büyük hücresel bileşenlerin yıkımında görev almaktadır bu sebeple seçici ve seçici olmayan mekanizmayla yıkım gerçekleşmektedir.
2. Mikrotofaji: Yıkılacak olan partiküller ara bir veziküler sisteme ihtiyaç duymadan doğrudan lizozomun içine almasıyla gerçekleştirilmektedir.
3. Şaperon aracılı otofaji: Yıkılacak olan proteinler lizozoma taşınırken bir sitozolik şaperon aracılığıyla taşınırlar. Bu şaperon ısı şoku proteini- '*heat shock cognate*' 70 kDa'luk proteindir (Hsc70). Bu protein, HSP70 ile % 80 homoloji göstermektedir ve sitoplazmik substratların peptid dizilerini tanır. Bir proteinin şaperon aracılı otofaji substratı haline gelmesi için, proteinin N terminal ucunda Lizin, Fenilalanin, Glutamat, Arjinin, Glutamin (KFERQ) motifinin açığa çıkması gerekmektedir. Bu motif Hsc70 şaperonu tarafından tanınmakta ve substratı lizozoma hedeflemektedir. Lizozomal membran proteinini (LAMP-2A) ile etkileşime girerek yıkılacak kargonun lizozoma girişini sağlamaktadır. Sonrasında ise lizozomda yıkım gerçekleşmektedir (Şekil 15) (37,49).



Şekil 15 Otofajinin tipleri (48)

Birçok hasarlanmış organel ve hücresel yapı genel temizlik sistemi olan otofaji ile imha edilmektedir. Ancak hasarlı mitokondriyonun otofajinin daha seçici ve organelle spesifik formu olan mitofaji ya da mitokondriyal otofaji ile de yıkımı gerçekleştirilmektedir (46).

2.4. Mitofaji

Hücresel stres meydana geldiğinde, mitokondriyonun fonksiyonunun devamlılığı ve hayatta kalması için verilen bir diğer yanıt ise mitofajidir. Mitokondriyonun seçici olarak yıkılması Parkin bağımlı ve reseptör aracılı mitofaji olmak üzere iki farklı yolakla gerçekleşebilir (50).

Mitofaji otofajinin seçici bir formu olup hasarlı ya da istenmeyen mitokondriyonun, mitokondriyal makromoleküllerin (lipitler, proteinler ve DNA) çift membranlı otofagozomlar içine alınarak yıkılma sürecidir. Bu yıkım süreci fagoforun tanınması, tutunması ve mitokondriyon etrafını sarak otofagozom oluşturmaları ve lizozomla füzyona uğrayarak yıkılması işlemidir (51).

Mitofaji, mitokondriyal kalite kontrol için önemli bir mekanizmadır. Mitokondriyal kalite kontrol için çok önemli olan mitofaji bozukluğu ise, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserle de ilişkilendirilmektedir. Güncel literatür bilgileri de mitofaji ve mitokondriyal enerji metabolizması arasında bağlantı olduğunu işaret etmektedir (52).

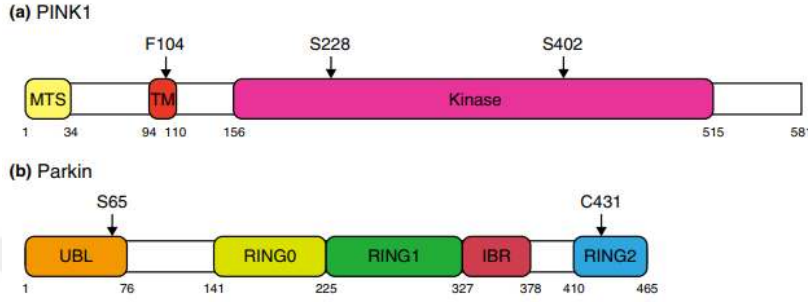
2.4.1. PTEN-indüklediği kinaz 1 (*‘PTEN-induced putative kinase 1’*) (PINK1)-parkin bağımlı mitofaji

Mitofaji mekanizmasının en iyi bilinen yollarından biri PTEN-indüklediği kinaz 1 (PINK1)-Parkin aracılı mitofaji yolağıdır. PINK1 mitokondriyal Ser/Thr kinaz olup, ilk olarak Otozomal Resesif Juvenil Parkinson Hastalığının (ORJP) fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (53,54).

PINK1, N terminal mitokondriyal hedef dizisi- *‘mitochondrial target sequence’* (MTS), transmembran dizisi (TM) ve Ser/Thr kinaz domaini içerir (Şekil 18). PINK1 protein sürekli sentezlenmesine rağmen sağlıklı mitokondriyonda saptanamaz. Sebebi, PINK1’in N terminal MTS domaininin dış zardan iç zara doğru geçerken matriksteki *‘mitokondriyal processing peptidaz’* (MPP)’ler tarafından kesilmesidir. Kesilmenin ardından PINK1’in TM segmentinin, iç zardaki rhomboid-benzeri serin proteaz (PARL) tarafından mitokondriyonla olan bağlantısı bozularak *‘N-end rule’* yolağı ve ubiquitin proteazom sistemi tarafından yıkılır. Sonuç olarak Parkin, sitozolde inaktif olarak kalmaya devam eder ve mitofaji normal hücrelerde baskılanır (Şekil 16) (28,53–55).

Mitokondriyal membran potansiyeli PINK1’in kaderini belirler. PINK1’in dış zardan iç zara geçişi mitokondriyal membran potansiyeli sayesinde olur ve böylece buna bağlı olarak PINK1 kesilir ve yıkılır. Eğer mitokondriyal membran potansiyeli bozulursa PINK1 MPP/PARL aracılı kesimden kurtulur, yıkımdan kaçır ve TOM proteini ile etkileşerek mitokondriyonun dış zarında birikir. Söz konusu bu birikim hasarlı mitokondriyonun sağlıklı olanlarından ayrılmasında bir belirteç görevi üstlenerek Parkinin seçici olarak hasarlı mitokondriyona yönlendirilmesini sağlar. E3

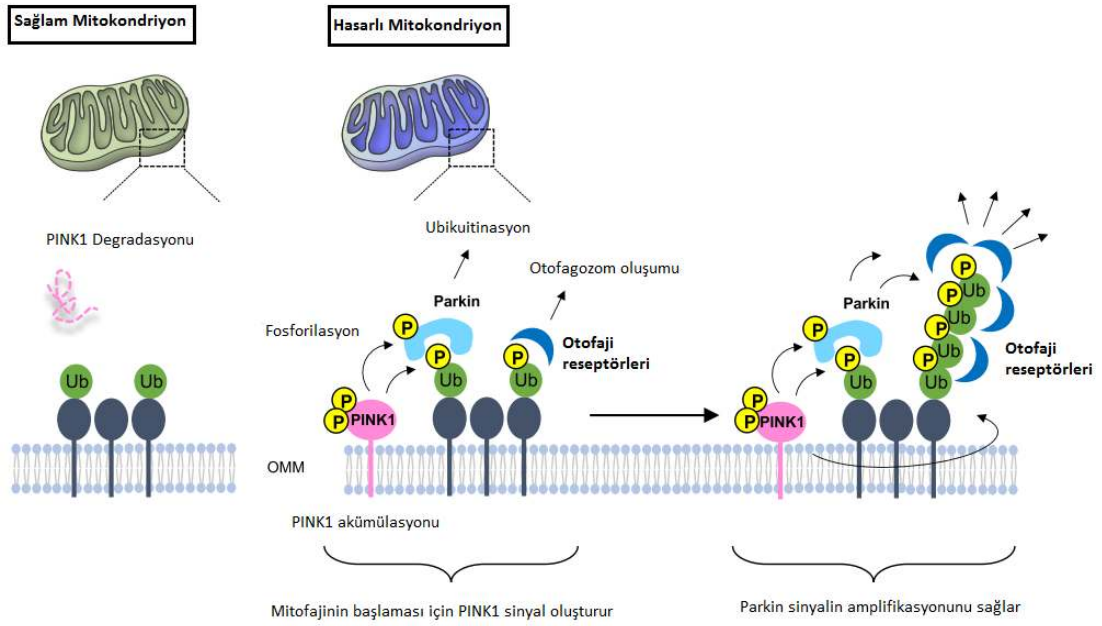
ubikütün ligaz aktivitesi sayesinde Parkin dış zar üzerindeki proteinlerin üzerinde ubikütinlenerek mitokondriyonun otofagozom adı verilen çift membranlı yapının arasına alınmasını sağlayan sinyal kaskadını başlatır (Şekil 2.17). Otofagozomun lizozomla füzyonu ise hasarlı mitokondriyonu ortadan kaldırır (17,28,54,56).



Şekil 16 PINK1 ve Parkin proteinlerinin bölgelerinin gösterimi (53)

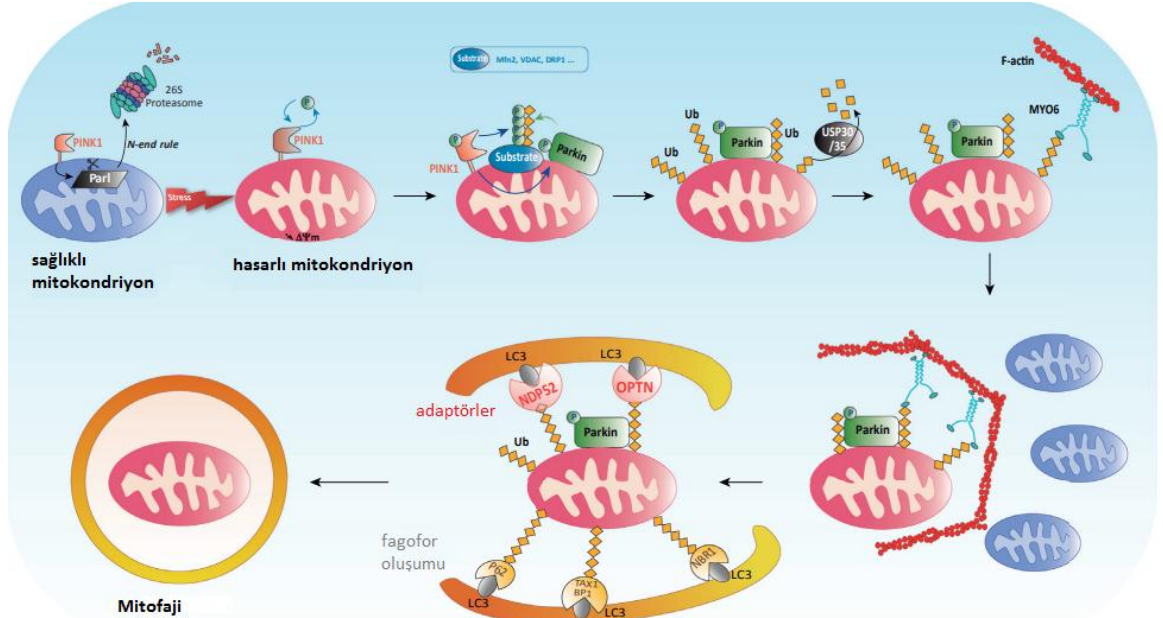
Bir E3 ubikütün ligaz olan Parkin (PARK2) geni de, ORJPH ile ilişkilendirilmiştir. Daha sonraları ise hasarlı mitokondriyonun uzaklaştırılması ve hücre sağ kalım sinyalizasyonu gibi çeşitli hücresel fonksiyonlarda da görev aldığı bildirilmiştir (57).

Parkin N terminal ubikütün-benzeri (UBL) domaini, RING0, RING1, IBR ve RING2 domainleri içerir (Şekil 18). RING1-IBR-RING2 kümesine 'RING-between-RING' (RBR) denir. RBR tip E3 ligaz ailesindendir ve ubikütün-tiyoesteri oluşturma özelliğindedir (54). Ubikütünlenme sürecinde E2 enzimi RING1'e bağlanır ve Ubikütün Parkin'in katalitik sistein 431. (C431) bölgesine transfer olur. Sitozolda Parkin inaktif konformasyondadır. Bu konformasyon Parkinin UBL domaini ve represör element RING1'in E-2 bağlanma bölgesini bloklarken, RING2'nin katalitik C431 bölgesi ise RING0 tarafından bloklanır. Parkinin hasarlı mitokondriyona translokasyonu ise ubikütün ligaz aktivitesi ve PINK1 akümüasyonu ile olur. PINK1, Parkin proteininin UBL domainininden fosforlayarak Parkinin ligaz aktivitesini uyarır ve mitokondriyona yönelmesini sağlar (Şekil 17) (17,28,56).



Şekil 17 PINK1/Parkin bağımlı mitofaji (52)

PINK1 ve Parkin proteinlerinin birlikte aktive olmasıyla mitokondriyon ubikütin zincirleriyle kaplanır. Mitofaji gibi seçici otofaji yolları aracılığıyla da ubikütinlenmiş mitokondriyonun fagofor oluşturularak membran içine alınıp yıkımı sağlanır (Şekil 18) (53,58).



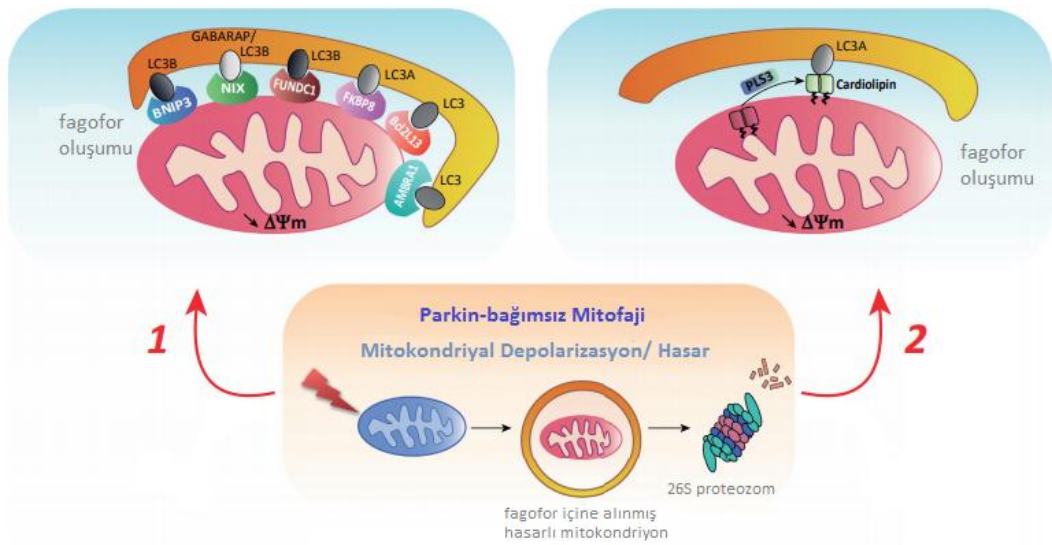
Şekil 18 Parkin/PINK1 bağımlı mitofaji (58)

2.4.2. Reseptör aracılı mitofaji

Parkin'in mitofajideki kritik rolüne rağmen, hasarlı mitokondriyonun yok edilmesi için Parkin'den bağımsız alternatif yollar da bulunmaktadır. Bu yollar birbirini dışlayan yollar olmayıp, gelen uyarıyla aktive olan birden fazla mekanizmanın olduğunu göstermektedir (59,60).

Mitokondriyal toksinler, hipoksik-iskemik/oksidatif yaralanmalar ve mutasyona uğramış genlerin ürünü olan proteinlerin ifadenmesi ile mitofajiyi uyarmaktadır. Bu mitokondriyal 'ye beni' sinyalleri transkripsiyonel olarak regüle olabileceği gibi post-translasyonel modifikasyonlarla da mitofajiyi uyatabilmektedir. Bu sinyallerin hepsi Atg8 homologları tarafından doğrudan/dolaylı olarak tanınabilirler (59).

Normal gelişimsel farklılaşmada mitokondriyonun seçici olarak uzaklaştırılması çeşitli hücre tiplerinde görülmektedir. Bunlara örnek eritrositler verilmektedir. Bu süreç mitokondriyon dış zarında bulunan çeşitli transmembran reseptörler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Mitokondriyonda lokalize, 'BH3-only' ailesi üyesi Nix, bir diğer adı '*BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3- like*' (BNIP3L) eritrositlerin retikülosit maturasyonu sürecinde transkripsiyonel olarak aktiftir. Nix/BNIP3L, LC3B ya da LIR aracılığıyla GATE-16 ile doğrudan etkileşime geçerek fagofor oluşumunu sağlayabilmektedir (Şekil 19) (59,60).

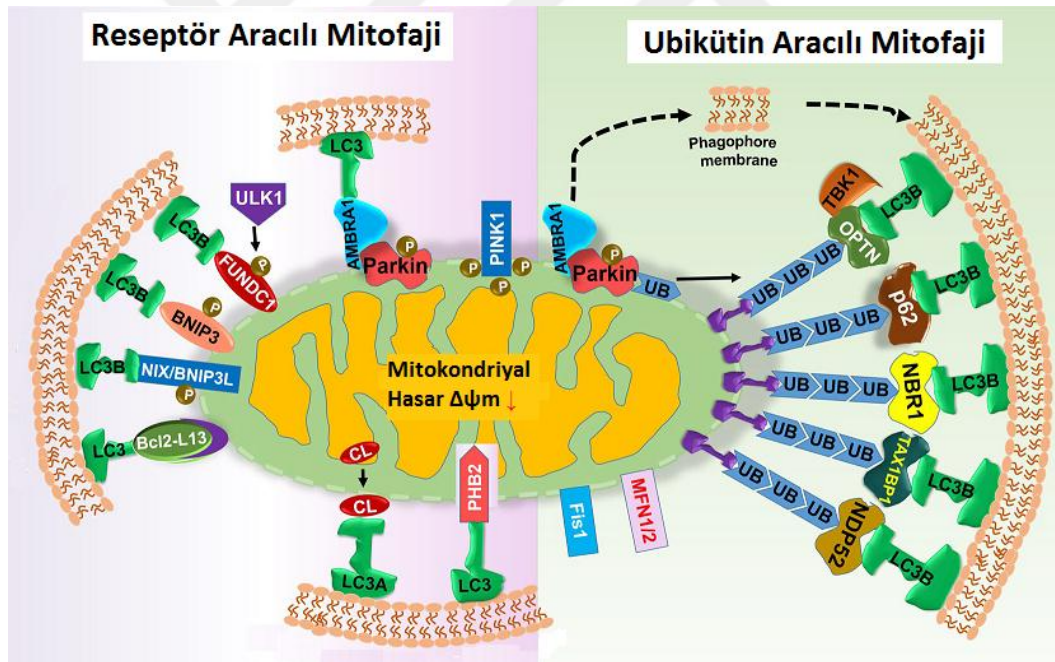


Şekil 19 Reseptör aracılı (Parkin-bağımsız) mitofaji yolları (58)

Bunun dışında birçok LIR domaini içeren mitokondriyal dış zar proteini tanımlanmaktadır. Bunlar arasında 'FK506-binding protein 8' (FKBP8, FKBP38)'de vardır ve mitofaji ile ilişkilendirilmiştir. Antiapoptotik protein olan FKBP8 normalde mitokondriyon dış zarında lokalizedir ve LC3A ile etkileşerek mitofajide görev almaktadır (59–61).

Diğer bir mitokondriyal dış zar proteini olan FUNDC1, hipoksinin indüklediği Parkin bağımsız mitofajide reseptör olarak görev almaktadır (62).

Başka bir selektif mitofaji mekanizması ise, kortikal nöronlarda ve nöroblastoma hücrelerinde görülmektedir. Hücrelere düşük doz rotenon ve 6-hydroxydopamine uygulanmasıyla mitokondriyon iç zarında bulunan cardiolipin fosfolipiti mitokondriyonun dış zarına transloke olmakta ve burada LC3 ile doğrudan etkileşerek mitofajiyi uyarmaktadır (Şekil 20) (59,63–65).



Şekil 20 Reseptör aracılı mitofaji (64)

2.5. Mitofaji ve otofajide görev alan adaptör proteinler

Geçmiş çalışmalar otofajiyi, hücre sel açlık durumlarında sitozolün parçalanarak hayatta kalım için temel aminoasitlere ve besinlere dönüştürülmesini sağlayan selektif olmayan bir süreç olarak tanımlamışlardır. Günümüzde ise; agregat oluşturan proteinler, hasarlanmış mitokondriyon, çok fazla sayıda peroksizom ve patojenler gibi üzerinde yıkım sinyali bulunan seçici kargoların otofagozom membranına alınarak yıkılması süreci olarak tanımlanmaktadır. Yıkılacak olan kargonun tanınması ve otofagozoma taşınmasında ise çeşitli adaptör proteinler görev almaktadır. Güncel çalışmalarla birçok otofaji reseptörü ve adaptörü tanımlanmıştır. Substrat ve kargonun niteliğine göre farklı reseptörler görev alarak kargoya özgün yıkım sağlanmaktadır. Bunlara örnek olarak protein agregatları için aggregafaji, mitokondriyon için mitofaji, ribozom için ribofaji, preoksizom için peksifaji, ER için retikülofaji verilebilir (Tablo 1) (66).

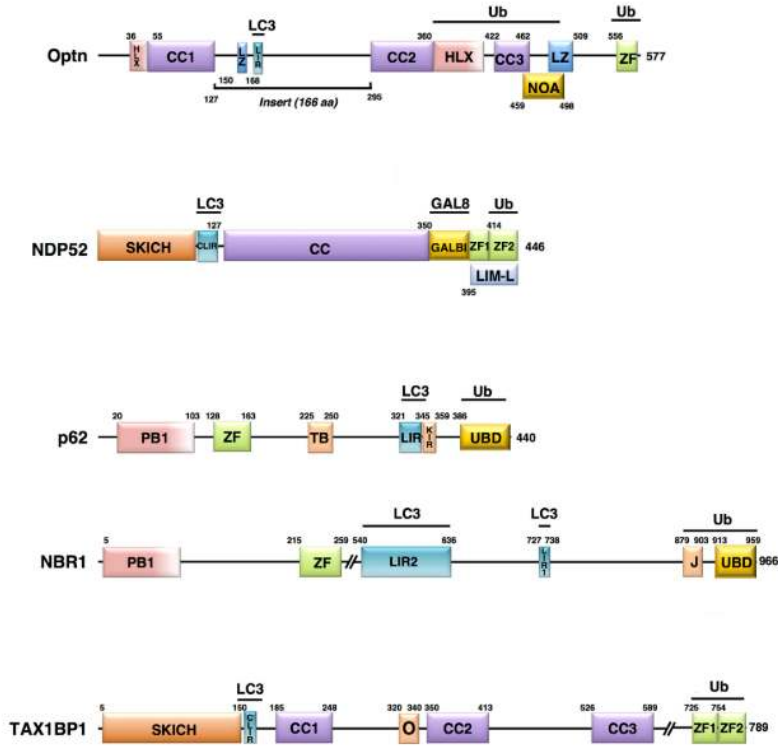
Reseptörler/ Adaptörler	Modifikasyon Enzimleri		Selektif Otofaji Tipi
	Fosforilasyon	Ubikuitinasyon	
p62/SQSTM1	ULK1, TBK1, CK2, p38δ	TRIM21	Aggregafaji Xenofaji Zymofaji
OPTN/Optineurin	TBK1, Plk1	HACE1	Aggregafaji Mitofaji Xenofaji
Ubqln2			Aggregafaji
NBR1	GSK3		Aggregafaji Pexofaji
ALFY			Aggregafaji
NDP52			Mitofaji Xenofaji
Htt/Huntingtin	AKT, IKK, CDK5	WWP1, TRAF6	Aggregafaji

Tablo 1 Otofaji adaptörleri ve reseptörleri

Memelilerde en yaygın otofaji hedefleyen sinyal ubikütindir. Otofaji reseptörlerinin hem ubikütün bağlanma domaini hem de LC3-etkileşim domaini bulunur. Böylece, otofaji reseptörlerinin özgün yapısı ve biyokimyasal aktivitesi seçici otofajide kargonun tanınmasını belirler. Otofaji reseptörleri; protein fosforilasyonu, ubikütinasyonu ve oligomerizasyonu ile düzenlenmektedir. Bu post-translasyonel modifikasyonlar, özgün kargoya ve/veya otofagozomlara reseptörlerin bağlanmasını düzenleyerek otofajinin seçiciliğini ve verimliliğini artırır. Otofaji reseptörleri, adaptör proteinler tarafından da modüle edilebilir. Otofaji adaptörleri otofaji makinesi için iskele görevinde olup; LC3 proteinlerine bağlanabilir ve reseptörlerle olan etkileşimi sayesinde otofajik kargo ve LC3'ün reseptör eğilimini değiştirebilir (66).

Birçok otofaji reseptörü tanımlansa da en iyi bilinenler (Şekil 21):

- p62/SQSTM1
- Optineurin (OPTN)
- ‘Neighbor of BRCA1 gene 1’ (NBR1)
- ‘Calcium binding and coiled-coil domain 2 (CALCOCO2/NDP52)
- ‘Tax1 (human T cell leukemia virus type 1) binding protein 1’ (TAX1BP1/T6BP)
- ‘Toll interacting protein’ (TOLLIP) (67,68).

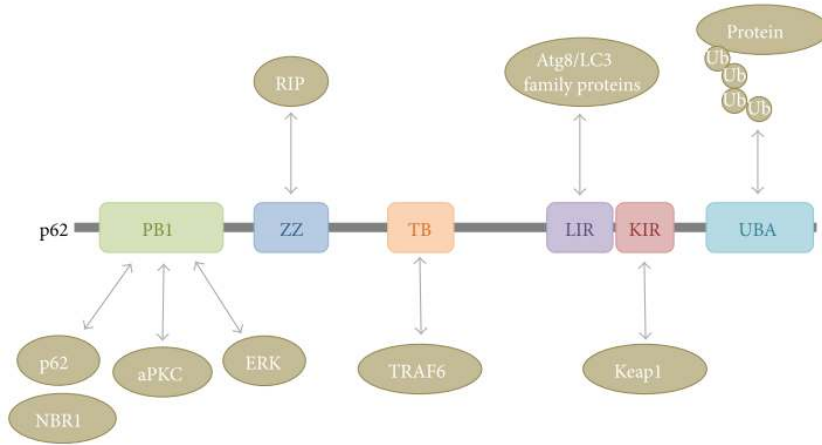


Şekil 21 Otofaji reseptörleri (68)

2.5.1. p62/SQSTM1 yapı ve özellikleri

İlk olarak sinyalizasyon yolağında, hücre büyümesi ve proliferasyonda görevli iskelet proteini olarak tanımlanan P62/SQSTM1, otofaji sürecinde ise ubikütinlenmiş proteinlerin otofagozoma bağlamasında adaptör görevi almaktadır (69).

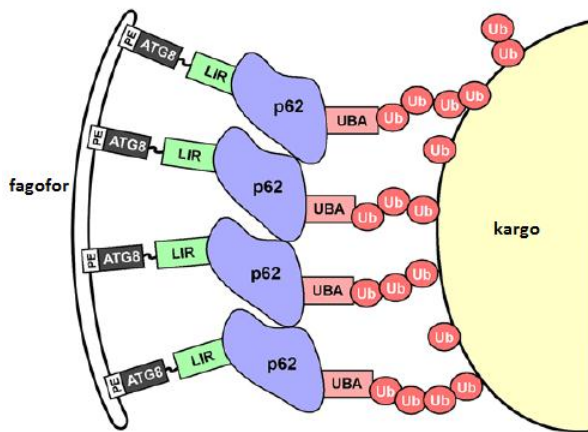
p62; C terminal ubikütin-bağlama domaini (UBA), kısa LC3-etkileşim bölgesi ‘*LC3-interacting region*’ (LIR), diğer adaptör proteinlerle etkileşime girdiği ve kendi kendine yıkıma teşvik eden N terminal Phox ve Bem1 (PB1) domaini, merkezi çinko parmak ZZ domaini, Traf 6 bağlama (TB) domaini ve Keap etkileşim bölgesi ‘*Keap interacting region*’ (KIR)’dan oluşmaktadır (Şekil 22) (70,71).



Şekil 22 p62 domain yapısı ve etkileşim gösterdiği partnerler (69)

P62'nin otofaji reseptörü olması 3 temel etkileşime dayanmaktadır. Bunlar:

1. p62 doğrudan seçilmiş olan kargoyla etkileşmesidir. Bunun için p62 C terminal UBA domainini kullanarak ubikütilenmiş kargoyla etkileşime girer.
2. LC3/ATG8 ile etkileşime girmesidir.
3. p62'nin PB1 domaini üzerinden homopolimerizasyonu ve kargoyla agregat oluşturmastır (Şekil 23) (70,72).



Şekil 23 p62 otofaji reseptörü (72)

p62/SQSTM1'in bir otofaji reseptörü olarak tanımlanması, makrotofajinin seçici bir işlem olarak tanımlanmasını sağlamıştır. Hem seçici hem de seçici olmayan otofaji, aynı otofaji makinesini kullanır, ancak seçici otofaji, seçici olmayan formda bulunmayan ilave bileşenleri içerir. İlk olarak, seçici otofaji, seçilen kargoyu, büyüyen fagoforun iç yüzeyine lipide edilmiş LC3'lere bağlayan otofaji reseptörlerine (p62 gibi) dayanır. İkincisi, seçici otofaji işaretli kargolara bağlıdır. Pek çok otofaji substratı ubikütin ile işaretlenir. Üçüncüsü, otofaji reseptörlerinin ve kargonun, fagofor oluşumunu mümkün kılmak için yeterince büyük bir yapı halinde toplanması gerekir. Dördüncüsü, seçici otofaji, büyümekte olan fagoforun iç zar yüzeyine kargo bağlayan adaptörler olarak işlev gören LC3'lere bağlıdır (72).

Fonksiyonu bozulmuş mitokondriyonda E3 ubikütin ligaz olan Parkinin sitozolden mitokondriyona translokasyonunu takiben p62, PB1 domaini üzerinden polimerizasyon yaparak agregasyona aracılık eder ve hasarlı mitokondriyonun otofaji ile ortadan kaldırılmasını sağlar (73).

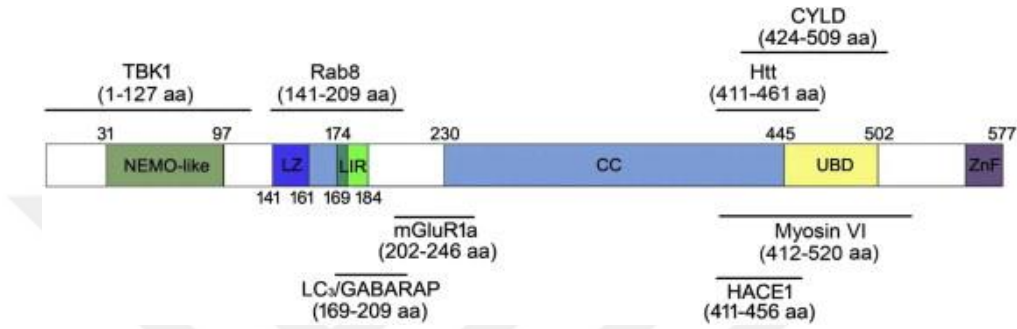
2.5.2. Optineurin yapı ve özellikleri

Optineurin (OPTN), Normal tansiyonlu glokom (NTG) ve Amiotropik Lateral Skleroz (ALS) ile ilişkilendirilmiş bir genidir. Bu genin kodladığı sitozolik proteinin farklı proteinler ile etkileşime girerek; veziküler trafik, golgi devamlılığı, Nükleer Faktör Kappa Beta (NFK- β) yolağı, antibakteriyel/antiviral sinyalizasyon, hücre döngüsü kontrolü ve otofajide görev aldığı bildirilmiştir (74).

OPTN ilk olarak 1998 yılında maya iki-hibrid görüntülemeye, adenovirüs proteini E3-14.7K (C grubu insan adenovirüsleri 14.7 kDa'nın erken bölgesi 3) bağlanma partneri olarak keşfedilmiştir ve bundan sonra FIP-2 olarak adlandırılmıştır (14.7 kDa etkileşimli protein için). Daha sonra, bu genin NEMO (NF-KB temel modülatör) ile güçlü bir homolojiye sahip olduğu ve NEMO-ilişkili protein olarak adlandırıldığı belirlenmiştir. Fakat aynı zamanda transkripsiyon faktörü IIIA-etkileşimli protein, Huntingtin-etkileşimli protein 7 ve Huntingtin maya partneri L olarak da bilinir. Sonunda, bu çok fonksiyonlu protein “optik nöropati uyaran” (OPTN) olarak

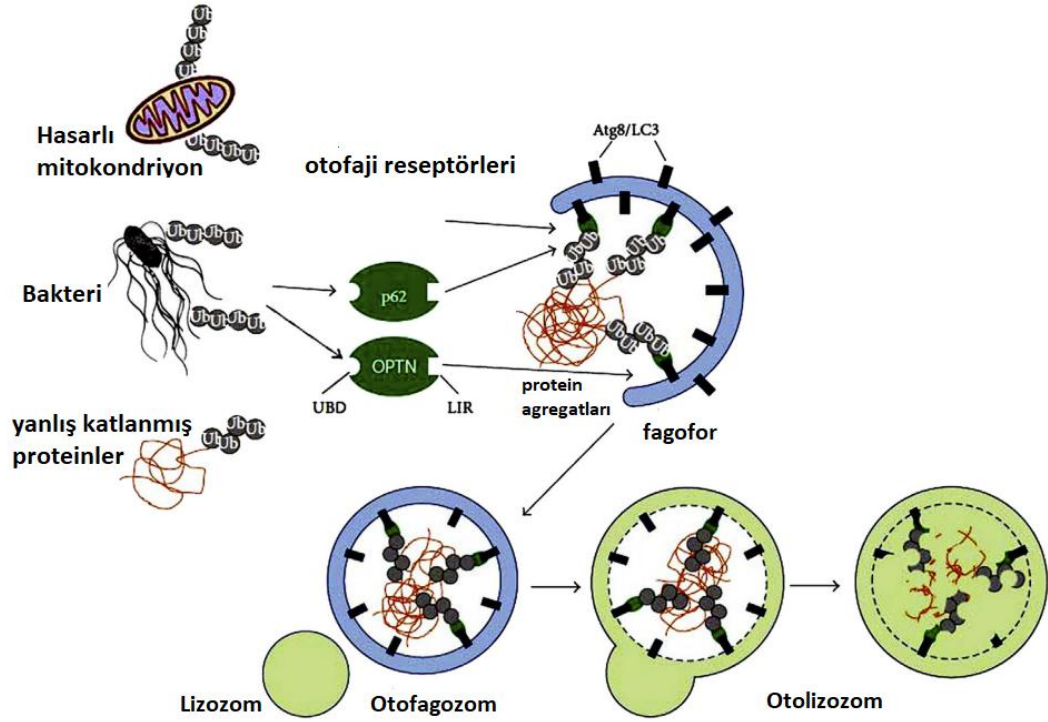
yeniden adlandırılmıştır, önemli bir nöroprotektif rol oynadığı ve bu gende mutasyonların körlükle sonuçlanan birincil açık açılı glokom gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (75–77).

OPTN geni 10p13’de lokalizedir ve 37kb’lık uzunluktadır. mRNA’sı 16 ekzondan oluşur. İlk üç ekzon kodlanmayan dizilerdir ve kalan 13 ekzon 577 aminoasitlik protein kodlamaktadır (Şekil 24) (74,75).



Şekil 24 Optineurin yapısı (78)

Optineurin proteini kalp, beyin, iskelet kası, karaciğer ve gözde ifadelenir. NEMO benzeri domain, lösün fermuar ve coiled-coil motiflerini, ubikütün bağlanma domaini (UBD), LC3 etkileşim bölgesi-interacting region (LIR) ve karboksi (C) terminal C₂H₂ tip çinko parmak içerir. İçerdiği UBD domaini sayesinde ubikütünlenir. Ubikütünlenen kargoya bağlanma yeteneği sayesinde otofaji ile ilişkili LC3 proteini ile etkileşerek otofaji reseptörü ya da adaptörü olarak görev alır (Şekil 25) (74,78).

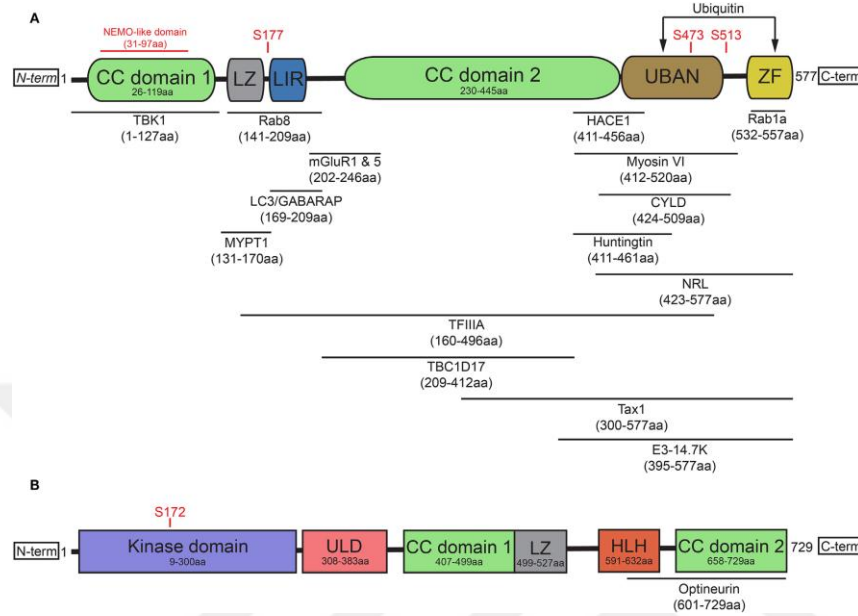


Şekil 25 Ubikütün bağımlı seçici otofaji süreci (74)

Birçok hücresel süreç boyunca optineurinin adaptör rolü, çok sayıda protein ile etkileşime girme kabiliyeti sayesinde mümkün olmaktadır. OPTN'in; TRAF ile ilişkili NFκ-B aktivatörü (TANK)-bağlayıcı kinaz 1 (TBK1), LC3-II, miyozinVI, Tax1 Bağlayıcı Protein1 (TAX1BP1), Rab8, Huntingtin (Htt), transferrin reseptör, adenovirüs E3-14.7K, reseptör etkileşimli protein (RIP), bZIP transkripsiyon faktörü nöral retina lösin fermuar, miyozin fosfataz hedefli alt ünite 1, transkripsiyon faktörü IIA, SOD1, kaspaz 8, HACE1, CYLD ve metabotropik glutamat reseptörü 1-5 gibi proteinlerle fonksiyonel etkileşimleri ile çok sayıda metabolik yolun düzenlenmesinde görev almaktadır (Şekil 26) (71).

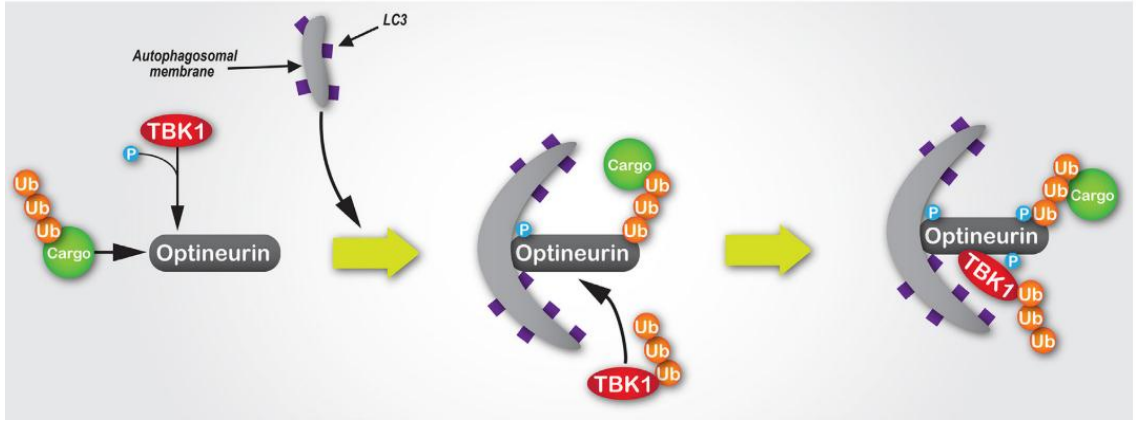
Optineurinin post-translasyonel modifikasyonları da düzenlemesinin bir parçası olarak ortaya çıkar. Bir serin/treonin kinaz olan TBK1, optineurinin birincil düzenleyicilerinden biridir. Yapısal olarak, TBK1, N-terminal kinaz domaini ve ubikütün benzeri domain (ULD), sarmal iskele dimerizasyon domaini (SDD) ve C-terminal bölgesinde adaptör bağlanma (AB) domaininden meydana gelmektedir (Şekil 26). TBK1'in aktivasyonu, Ser172 rezidüsünde kinaz aktivasyon loopunun

fosforilasyonu ile gerçekleşmektedir. TBK1 lokalizasyonu, aktivitesinin belirlenmesinde ve optineurin fonksiyonu üzerindeki etkilerinden ötürü kritik öneme sahiptir (71,79).



Şekil 26 Optineurin ve TBK1'in domain yapıları. A ile gösterilmiş olan OPTN, B ile gösterilmiş olan TBK1'dir (71)

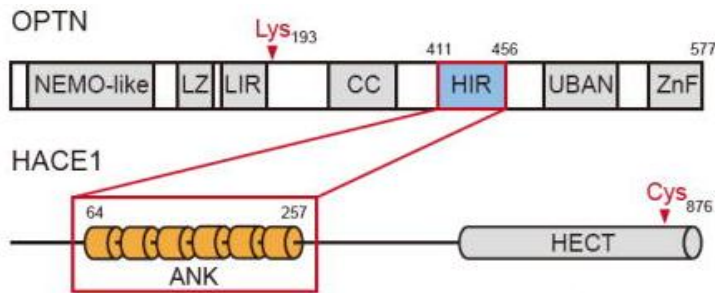
TBK1'in optineurine bağlanması C-terminali CC domaini içinde, polar ve hidrofobik etkileşimler yoluyla sağlanır ve TBK1 aracılı Ser177 fosforilasyonu için gereklidir. Bunun da, optineurin LIR'in LC3 bağlama kapasitesini belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Optineurinin TBK1 tarafından UBAN domaini üzerinde Ser473 ve Ser513'ten fosforilasyonu polubikütün zincirlerinin bağlanma afinitesini artırarak optineurin aracılı mitofajinin etkinliğini artırır. Bu veriler, optineurinde meydana gelen posttranslasyonel değişikliklerin, otofaji sırasında kargonun tanınması işlevini değiştirmede kritik olduğunu göstermektedir. TBK1, ubikütün proteinlerinin yanı sıra LC3 ailesi proteinleri ile etkileşimlerini düzenlemek için optineurini doğrudan da fosforlayabilir (Şekil 27) (71,80–82).



Şekil 27 Optineurin TBK etkileşimi (71)

TBK1 ayrıca, glokom ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili protein agregatlarının otofajik klerensinde görev almaktadır. TBK1'in ayrıca, hasarlı mitokondriyonun etkin bir şekilde uzaklaştırılması için seçici otofaji yollarında da kilit rol oynamaktadır. TBK1 depolarize mitokondriyonun mitofajisine aracılık etmek için otofaji reseptörleri ile uyum içinde hareket eder (76).

OPTN'nin etkileşime girdiği bir diğer protein ise HECT domain ve ankirin tekrarları içeren E3 ubikülin protein ligaz 1 (HACE1)'dir. HACE1, C terminalinde HECT domaini ve N terminalinde 6 ankirin tekrarı içeren bir E3 ubikülin ligazdır. OPTN'nin K 193. pozisyonundan ubikülinlenmesi, otofaji reseptörleri olan OPTN ve p62/SQSTM1 ile olan fiziksel etkileşimleriyle otofajinin aktivasyonunda görev almaktadır (Şekil 28) (74).



Şekil 28 Optineurin ve HACE1 etkileşimi (83)

Optineurin otofagozom oluşumu ve protein agregatlarının degradasyonunu sağlar. Ancak optineurin mitofajideki rolü tam olarak belirlenememiştir. OPTN’de meydana gelen mutasyonlar ALS Hastalığı ve Glokom ile ilişkili bulunmuştur. Bu nörodejeneratif hastalıkların mitokondriyal hasarlanmalarla da ilişkisi olduğundan optineurin hasarlı mitokondrinin otofajik yıkımında bir rolü olduğunu işaret eder niteliktedir (83).

İşlevini yitirmiş substratların yıkılacağı zaman selektif otofaji ile doğru eşleşmesi için, optineurin, nükleer nokta proteini 52 (NDP52), NBR1 veya p62 gibi otofaji reseptörü proteinleri gereklidir. Yıkılacak olan substratlar, otofaji reseptörleri içerisinde bulunan belirli ubikütün bağlantı tipleri için özgün olan UBD’ler tarafından her yerde bulunur ve tanınır. İlave bir LC3 etkileşimli bölge (LIR) sayesinde, bu reseptörler doğrudan otofagozomal membran ile etkileşime girebilir, böylece kargonun tanınması, trafiği ve yıkımı kolaylaşır. (71)

2.6. Lipotoksisite

Obezite ve T2DM görülme sıklığı dünya çapında artmaktadır. T2DM uzun süreli metabolik bir hastalık olup; hiperglisemi ile karakterize bir hastalıktır. Hastalığın primer patogenezi halen tamamıyla bilinmemekle birlikte artmış seviyede SYA sirkülasyonu T2DM’nin temel sebebini oluşturmaktadır. Normal fizyolojik koşullarda beslenmeyle alınan enerjinin fazlası trigliserid olarak adipositlerde depolanmakta olup, enerji ihtiyacı olunca lipoliz aracılığıyla SYA’leri salınmasıyla metabolik homeostaz sağlanmaktadır. Ancak obezitede, anormal bazal doku lipolizinden dolayı, dolaşımdaki SYA miktarı artmaktadır. Artan serbest yağ asitleri ise karaciğer, iskelet kası, kalp ve pankreas gibi non-adipoz dokularda birikmeye başlamaktadır. Bu durumda gelişen lipotoksisite, organel fonksiyon bozukluğuna, hücre hasarına, metabolik bozukluklara, kronik inflamasyona, hücre fonksiyon kayıplarına ve non-adipoz doku ölümüne sebep olmaktadır (3,84).

Serbest yağ asitlerinin karaciğerde fazla birikmesi ile insülin direnci (IR), diyabet, NAYKH ve NASH gözlenmektedir(85).

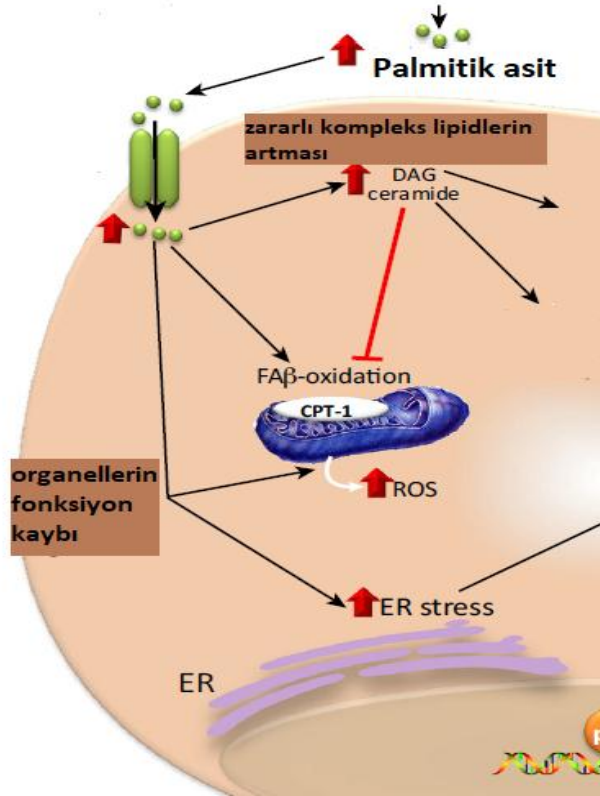
NAYKH, Batı'da ve Asya'da sırasıyla % 20-30 ve % 15-20 oranında prevalansa sahiptir. NAYKH gelişimde insülin sinyalizasyonu, m-TOR, otofaji ve AMPK gibi hücrel yollarda meydana gelen bozukluklar önemli bir rol oynamaktadır. Yağlı karaciğer hastalığı, T2DM gibi çeşitli ko-morbiditeler ile de ilişkili olup, her iki koşulda da adipositlerde ve hepatositlerde IR, glukoz ve lipid metabolizma bozukluklarını içerir (86).

2.6.1. Palmitik asit (PA)

Serbest yağ asitleri kimyasal olarak doymuş ve doymamış serbest yağ asitleri olarak sınıflandırılırlar. Bu farklılık onların biyolojik fonksiyonunu etkilemektedir. Diyetle ve serumda en fazla bulunan doymuş serbest yağ asidi Palmitik Asit (PA) olup; 16 karbonlu uzun zincirli bir yağ asididir. En sık rastlanan doymamış serbest yağ asidi ise 18 karbonlu oleik asittir. Yapılan çalışmalar doymuş yağların lipotoksik etkisinin doymamış olanlara göre daha fazla olduğunu göstermiş olup; ayrıca doymamış yağların lipotoksistekte koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (87–92).

Hücre içi artmış seviyede PA, mitokondriyonda oksidasyona uğrayarak zararlı kompleks lipidler olan diaçil gliserole (DAG) ve seramide dönüşür. Hücre içinde artmış DAG ve seramid ise birçok yolağı etkilemektedir. Artmış seramid sentezi çeşitli yollar üzerinden insülin direncine neden olurken, bunun dışında da organeller üzerinde etkisi bulunmaktadır. ER'da ER stresine sebep olurken; mitokondriyonda da yağ asitlerinin β oksidasyonunun inhibisyonu, Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) artışı ve mitokondriyal strese sebep olmaktadır (Şekil 29) (87,93).

Viseral obezite--> adipoz doku lipolizi



Şekil 29 Palmitik asidin etkili olduğu yolların bir kısmı (88)

2.7. Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon ‘carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone’ (CCCP)

Fizyolojik koşullarda mitokondriyon tamamen eşleşmemiş-‘*uncoupled*’ haldedir. Oksidatif fosforilasyon sürecinde mitokondriyon iç zarından proton kaçıışı söz konusudur. Bu kaçış ROS üretimini minimize etmek için oluşmuş koruyucu bir mekanizmadır. Endojenik eşleşmeme-‘*uncoupling*’; mitokondriyal anyon süper ailesi olan aspartat/glutamat taşıyıcılar, mitokondriyal permeabilizasyon poru (mPTP), adenin nükleotit translokaz (ANT) ve uncoupling proteinler (UCP) ile gerçekleşmektedir. UCP’ler çeşitli metabolik ve nörodejeneratif bozukluklarla ilişkili mitokondriyal ROS üretiminin regülasyonunda katkıları bulunmaktadır. ‘*Uncoupler*’lar ise UCP’lerin etkilerini taklit etmekte olup bunlara örnek olarak

Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon '*Carbonyl cyanide phenylhydrazone*' (CCCP) verilmektedir (94).

CCCP yüksek reaktif tiol gruplarından dolayı mitokondriyal ayırıcı-'*uncoupler*' dir. Lipofilik zayıf asit sınıfı üyesidir. Lipit membranlarda protonlar için geçirgenliği seçici olarak artırmalarından dolayı proton taşınım bileşeni olarak tanımlanmıştır. CCCP'ler MİZ'deki lipitlerin içinde çözündüğünden protonları mitokondriyal matrikse bırakabilirler. Bu süreçte ise ΔpH bozulur. İyonize negatif yüklenmiş bileşen daha sonra membran boyunca yayılarak elektrik alan gradiyentini azaltır ve $\Delta\psi m$ 'ı dağıtır (94,95).

CCCP, ETZ'nin bir uncoupler-ayırıcısıdır. Uncoupler-ayırıcılar, elektrokimyasal gradyanlarını takiben protonların mitokondriyal matrikse hareket etmesine izin veren ve Mitokondriyal Membran Potansiyelinin (MMP)'nin çökmesine yol açan, artan mitokondriyal ROS ve apoptoza neden olan ilerleyici mitokondriyal yetmezliğe yol açan küçük moleküllerdir (95).

Deneyssel koşullarda mitokondriyal hasarı taklit etmek için CCCP gibi uncouplerlar hücrelere verilerek mitokondriyon depolarize hale getirilmektedir. CCCP iç zarda membran potansiyelinde azalmaya sebep olmaktadır. Böylece proteinlerin TIM kompleksinden iç zara taşınmasına sebep olarak PINK1, Parkin proteininin fonksiyonel hale getirerek ve mitofajiyi tetiklemektedir (57,96,97).

Yapılan çalışmalarda farklı tiol grubu içeren ajanların düşük konsantrasyonlarda OXPHOS'u eşleşmemiş hale getirdiği ve yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında ise solunumu inhibe ettiği ve $\Delta\psi m$ 'nin güç kaybı ve çöküşünün mitokondriyal degradasyona ve apoptoza neden olduğu bildirilmiştir. Söz konusu çalışmalarda $\Delta\psi m$ bozulmasına ve mitokondriyal ATP üretimi kesilmesine rağmen kültür hücrelerinin direnç gösterdiği raporlanmıştır (94).

CCCP'nin mitokondriyon depolarizasyonu, ATP sentezinin azaltılması, mitokondriyal fisyon, mitofaji ve ROS üretimi gibi, pleiotropik etki gösterdiği bildirilmiştir (98).

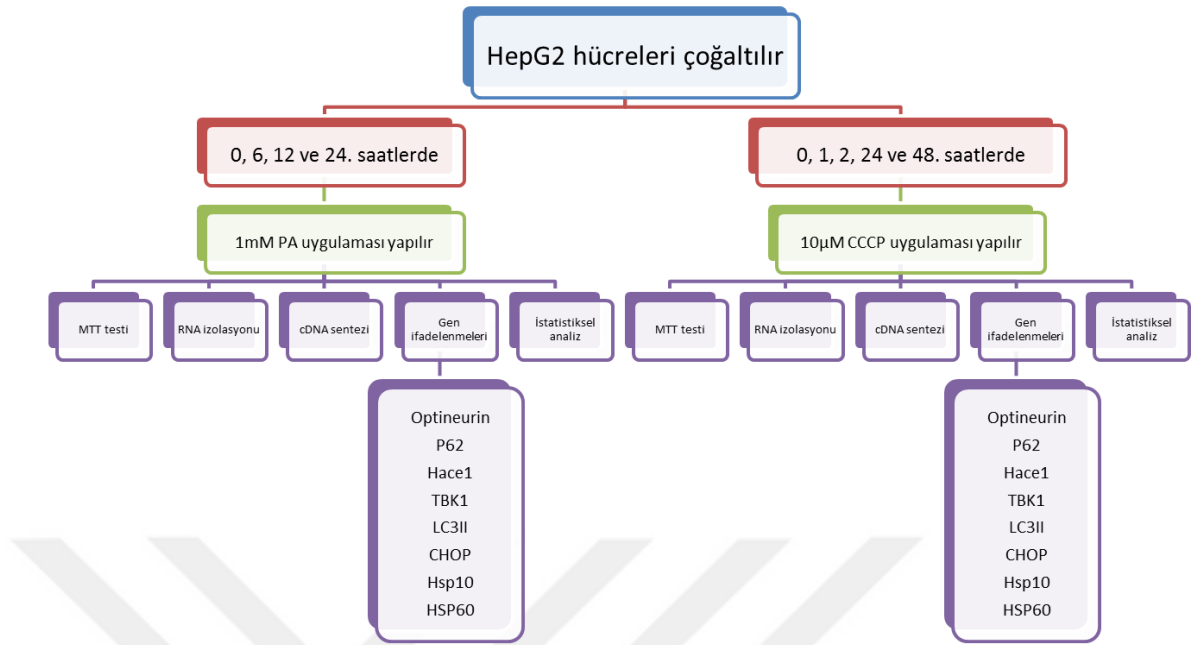
3. GEREÇ ve YÖNTEM

İnsan Hepatoselüler Karsinom hücre dizisi olan HepG2 (ATCC-HB8065) hücrelerinde palmitik asit (PA) ve Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon '*Carbonyl cyanide phenylhydrazine*' (CCCP) kullanılarak yaratılan stres ortamında, tablo 2’de listelenen mitokondriyonla ilişkili stres ve mitofaji genleri ile otofaji adaptörü/otofaji reseptörü genlerinin ifadelenmeleri gerçek zamanlı PZR yöntemi ile analiz edilmiştir.

Çalışmanın iş akış planı ise tablo 3’de gösterilmektedir.

Mitokondriyonla ilişkili stres ve mitofaji genleri	Otofaji adaptörü/otofaji reseptörü genleri
Parkin	Optineurin
HSP60	HACE1
HSP10	p62
CHOP	TBK1
	LC3-II

Tablo 2 İfadelenmesi yapılacak olan genler



Tablo 3 İş akış planı

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1. Hücre kültürü

Hücre Hattı

Bu çalışmada İnsan Hepatoselüler Karsinom (HepG2) (ATCC-HB8065) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler 37°C su banyosunda 1 dakika bekletilerek çözüldükten sonra 1200 rpm'de 7 dak. santrifüj edilip süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet taze besi yeriyle çözdürülüp çoğaltılmıştır.

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

25cm² TC Flask: Orange scientific 4420100N

Hücre dondurma tüpleri: Greiner bio-one, 2ml

Dimetilsülfoksit (DMSO): Sigma, D9170

Fosfat Tuz Tamponu (PBS): Sigma, D1408

2-Mercaptoethanol: Merck, ES-007-E

Palmitik Asit: Sigma, P0500

CCCP: Sigma C2759

Deney tüpü (15ml): Greiner, 188261

Bovin Serum Albumin (BSA): Sigma A6003

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

3.1.2. Cell proliferation kit I (MTT) [3-(4,5-dimetildiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium bromid]

Hücre canlılığının tespiti için MTT testi yapılmıştır (Katalog numarası: 11 465 007 001 ROCHE). Uygulamalar 96 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. RNA izolasyonu

RNA izolasyon kiti: Qiagen, RNeasy mini kit,74104

Dietil piro karbonat, DEPC: Sigma, D5758

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

Etil Alkol: Sigma, E7023

3.1.4. cDNA(komplementer DNA) sentezi

cDNA sentezi için ticari kit olan Transcriptor First Strand Synthesis Kit Roche, 0487030001 kullanılmıştır. Uygulama için sarf malzemesi olarak 0,2 ml'lik PZR tüpleri ve steril filtreli pipet uçları kullanılmıştır.

3.1.5. cDNA kontrol PZR

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

dNTP (10mM X 4): Roche, 11581295001

beta aktin primer F: 5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3'

beta aktin primer R: 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3'

MgCl₂ (25mM): Sigma, M8787

PZR sonrası elde edilen amplifikasyon ürünleri Kodak EDAS 290 UV görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. PZR işlemi için XP cyclor cihazı kullanılmıştır.

3.1.6. Agaroz jel elektroforezi

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 (50bp): Thermo scientific, SMO373

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

3.1.7. Eş zamanlı PZR (qRT-PZR)

Kantitatif eş zamanlı PZR (qRT-PZR) için Roche firmasına ait Light Cycller 480 II cihazı kullanılmıştır.

LC 480 Multiwell plate Roche 4729692001

LightCycler 480 Probes Master Roche 4887301001

RealTime ready Catalog Assay ACTB 143636

RealTime ready Catalog Assay DDIT3 100355

RealTime ready Catalog Assay HACE1 119971

RealTime ready Catalog Assay HSPD1 137174

RealTime ready Catalog Assay HSPE1 100500

RealTime ready Catalog Assay MAP1LC3B 144005

RealTime ready Catalog Assay OPTN 114513

RealTime ready Catalog Assay PARK2 144556

RealTime ready Catalog Assay SQSTM1 113560

RealTime ready Catalog Assay TBK1 145187

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

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücrelerin çözülmesi

Azot tankından %10 DMSO içeren besiyerinde dondurulmuş olan vialler çıkarılarak, önceden 37°C ayarlanmış su banyosu içinde 1 dakika bekletilmiştir. Steril bir falkon tüp içine 6 ml besiyeri koyulup vial içindeki hücre karışımı bir miktar besiyeri ile birlikte falkon tüpe aktarılmış, 1200 rpm'de 7 dakika santrifuj sonrası tüpün üstündeki supernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine yeni besiyeri eklenerek pipetaj yapılmış ve hücre+besiyeri karışımı 25cm²'lik flaska ekilmiştir. İnverted mikroskop (Olympus CK40 10X büyütme) ile hücreler gözlenerek 37°C, %5 CO₂ inkübatörüne yerleştirilmiştir.

3.2.2. Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması

HepG2 hücrelerinin çoğaltılmasında DMEM besiyerine %10 ısı ile inaktive edilmiş (56°C'de 30 dakika) Fetal Dana Serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin eklenmesiyle hazırlanmış besi yeri kullanılmıştır. Haftada 2 kez besi yeri değiştirilerek 37°C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe büyümeleri sağlanmıştır. Ayrıca flasklar inverted mikroskop ile günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından değerlendirilmiştir. Hücreler ekildikleri flaskları kapladıklarında (%90 konfluensiye ulaştıktan sonra) %0.25 Trypsin-EDTA ile pasajlanmıştır. Pasaj sonrası hücrelerin 4X10⁴ hücre/cm² olacak şekilde ekilip üremeleri sağlanmıştır. Çalışma

için yeterli sayıda hücre elde edildiğinde hücreler 96 kuyucuklu plaklara ve 25 cm²'lik flasklara ekilmiştir.

3.2.3. Palmitik asit (PA) hazırlanması

512 mg PA tartılıp, 10 ml %100 etil alkol ile karıştırılarak 60°C su banyosu içinde çözülerek 200 mM PA stok elde edilmiştir. 3 gr Bovine Serum Albumin (BSA) tartıp 30 ml DMEM FBS içermeyen besiyerinde çözülerek %10'luk BSA elde edilmiştir. 200 mM PA hesaplamalarla uygun miktarda alınıp %10'luk BSA'da çözüldüğünde 4 mM PA elde edilmiştir. PA'nın BSA'da iyice çözünmesi için 2 saat süreyle çalkalayıcı platformda karıştırılmıştır. Çözülme tamamlandıktan sonra da 4mM PA karışımı filtreden geçirilmiştir. 96 kuyucuklu plaklarda 0,3mM, 0,5mM, 0,7mM ve 1mM PA olacak şekilde doz denemeleri yapılarak uygun dozun referans makaleyle benzer şekilde 1mM olması kararlaştırılmıştır. Kontrol grubunda ise etanol ve %10'luk BSA'dan 4mM kontrol stok elde edilmiştir (99–101).

3.2.4. Karbonil siyanid 3-klorofenilhidrazon (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) (CCCP) hazırlanması

1 g olarak ambalajlanmış olan CCCP 5 ml DMSO'da çözülerek 1M (1000mM) stok CCCP elde edilmiştir. Buradan hesaplamalarla 1mM (1000µM) 2. stok elde edilmiştir. Filtreden geçirerek güncel makaleler doğrultusunda 10µM, 20µM, 30µM konsantrasyonda uygulamalar yapılmış ve 10µM CCCP uygun doz olarak kararlaştırılmıştır. Kontrol grubu olarak DMSO ve besi yerinden 100mM'lık kontrol stok elde edilmiş ve buradan da 1000µM'lık CCCP kontrol 2. stok elde edilmiştir (96).

3.2.5. Hücre canlılığı ve sitotoksikite testi

Kararlı tetrazolium tuzu olan MTT hücrelerde gerçekleşen kompleks hücresel mekanizma ile çözülebilir formazana dönüşmektedir. Bu dönüşüm canlı hücrelerde NAD(P)H'nın glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir. Bu çalışmamızda farklı saatlerde uygulanan PA ve CCCP'nin HepG2 hücrelerindeki sitotoksik etkisini göstermek amacıyla MTT kullanılmıştır.

Bunun için ilk önce thoma lamında sayım yapılmış, sonrasında HepG2 hücrelerini 40000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklulu plaklara ekilmiştir. Kuyucuklara 100µl besiyeri eklenerek, tutunmaları için 48 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelere ayrı ayrı 1mM PA ve 10µM CCCP uygulanmıştır. PA verilen hücreler 0, 6, 12 ve 24. saatlerde, CCCP verilen hücreler ise 0, 1, 2, 24 ve 48. saatlerde uygulaması sonlandırılmıştır. Her saat için ayrı bir 96 kuyucuklu plak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi dolan plak inkübatörden çıkarılmış ve üzerindeki besiyerinden 150µl çekilip 10 µl MTT solüsyonu eklenmiştir. 4 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra her kuyuya 100µl MTT solubilizasyon solüsyonu eklenmiş ve bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün plaklar 96 kuyucuklulu ELISA okuyucuda (Biotek Epoch Gen5 2.0) 550 nm- 690 nm dalga boylarında okunmuş ve sonuçları all-in-one microplate reader programında analiz edilmiştir.

3.2.6. Hücre kültürü materyalinden total RNA izolasyonu

25cm²'lik flasklara ekilmiş olan HepG2 hücrelerine PA ve CCCP ile gerekli inkübasyon süreleri sonunda elde edilen hücrelerden aşağıdaki protokol takip edilerek RNA izolasyonları yapılmıştır;

1. 25cm²'lik flasklardaki hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp %0,25'lik Tripsin/EDTA ile kaldırıldıktan sonra üzerine 350 µl RLT tamponu eklenmiştir. Pipetleme yapıldıktan sonra hücreler 1,5ml'lik steril ependorf tüplerine aktarılmıştır.

2. Üzerine 350 µlt DEPC'li su ile hazırlanmış olan %70'lik etil alkol eklenmiş ve toplam hacim kolonlara aktarılmıştır. 15 saniye 8000g'de santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpünde biriken sıvı lizat uzaklaştırılmıştır.
3. 700 µlt RW1 tamponu eklenmiş, 15 saniye 8000g'de santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne biriken sıvı lizat uzaklaştırılmıştır.
4. 500 µl RPE tamponu eklenmiş, 15 saniye 8000g'de santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne biriken sıvı lizat uzaklaştırılmıştır.
5. 500 µl RPE tamponu eklenmiş, 2 dakika 8000g'de santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne biriken sıvı lizat uzaklaştırılmıştır.
6. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 1 dakika maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
7. Kolon yeni bir 1,5ml'lik steril ependorf tüpe yerleştirilmiştir. 45µlt RNAaz içermeyen su eklenmiş, 2 dakika 8000g'de santrifüj yapılmıştır.
8. Elde edilen 45 µlt hacmindeki RNA'nın 6 µlt'si steril bir başka tüpe aktarılmıştır. Bu işlem ile ana stoğun sürekli dondurma-çözme süreçlerine maruz kalması engellenmiştir. Ayrılan RNA agaroz jelde RNA kalitesinin değerlendirilmesinde ve RNA miktarının ölçümünde kullanılmıştır. Stok RNA ise izolasyon sonunda -80°C'ye kaldırılmıştır.

RNA'nın Kalitatif Değerlendirilmesi:

İzole edilen total RNA hazırlanan %1,5'lik agaroz jel de kontrol edilmiştir. 100 ml 0,5X Tris Asetik asit EDTA (TAE) tamponu içine 1,5 g agaroz koyulup, kaynatılmıştır. Üzerine 2,5µlt (10mg/ml) etidyum bromür eklenmiş ve çalkalanmıştır. Polimerleşme tamamlandıktan sonra 5 µlt jel yükleme tamponu ile karıştırılan 4 µlt RNA örneği 90V'da 45 dakika yürütülmüştür. Yürütme sonrası 28S ve 18S rRNA UV ışığında gözlenmiştir.

3.2.7. RNA saflığının ve miktarının tayini

İzole edilen RNA'ların saflığının kontrolü 260/280 nm'deki absorbans oranı ile saptanmıştır. Spektrofotometre cihazı olarak Biotek Epoch Gen5 2.0 ve all-in-one Reader yazılım programı kullanılmıştır. DNA ve protein kontaminasyonu taşımayan, iyi kalitede izole edilmiş RNA'da beklenen 260/280 nm absorbans oranı 1,8-2,1'dir. 2µlt izole edilen RNA, 2µlt steril distile su ile karıştırılıp her kuyuya 2µlt örnek koyularak okuma yapılmıştır. Elde ettiğimiz RNA'ların 260/280 nm absorbans oranı 2,0-2,1 olarak ölçülmüştür. Ölçüm sonrası elde edilen veriler 2 ile çarpılarak izole edilen RNA'ların miktarları hesaplanmıştır.

3.2.8. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için ROCHE Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Steril, PZR tüpleri kullanarak buz üzerinde çalışılmıştır. Her tüpe koyulan kalıp- primer karışımını ise aşağıdaki miktarlara göre hazırlanmıştır (tablo 4 ve 5).

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

Tablo 4 Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)

Kalıp-primer karışımı 65°C'de 10 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir. Bu işlem ile RNA'nın sekonder yapılarını uzaklaştırılmıştır. İşlem sonunda tüpler tekrar buz üzerine alınarak ters transkriptaz (reverse transcriptase, RT) karışımı aşağıdaki protokole göre hazırlanmış ve kalıp-primer karışımına transfer edilmiştir.

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

Tablo 5 Komplementer DNA (cDNA) karışımı

29°C’de 10 dakika, 50°C’de 60 dakika ve enzim inaktivasyonu için 85°C’de 5 dakika bekletilmiştir. Tüm ısı uygulama işlemlerini Bioer XP Cyclers cihazında yapılmıştır. İşlem sonrası elde edilen cDNA -20°C’de saklanmıştır.

3.2.9. cDNA kontrol PZR

Elde edilen cDNA’lardan insan aktin β primerleri kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için Tablo 6’da gösterilen protokol kullanılmıştır.

Kimyasal	Stok Konsantrasyon	Son hacim
Taq DNA Polimeraz	5U/ μ l	0,25 μ l
Taq DNA pol.tampon	5X	5 μ l
dNTP	10mM her biri	2 μ l
Primer F	100pmol	1 μ l
Primer R	100pmol	1 μ l
MgCl ₂	25mM	2,5 μ l
dH ₂ O		15 μ l
Kalıp DNA(cDNA)		2 μ l
toplam		28,75 μ l

Tablo 6 Kontrol PZR protokol

Bioer XP Cyclex cihazında 94 °C’de 5 dakika denatürasyon sonunda 94°C’ de 30 saniye, 60°C’ de 45 saniye, 72°C’ de 30 saniye 30 döngü yapılmış, PZR 72 °C’ de 5 dakika ile bitirilmiştir.

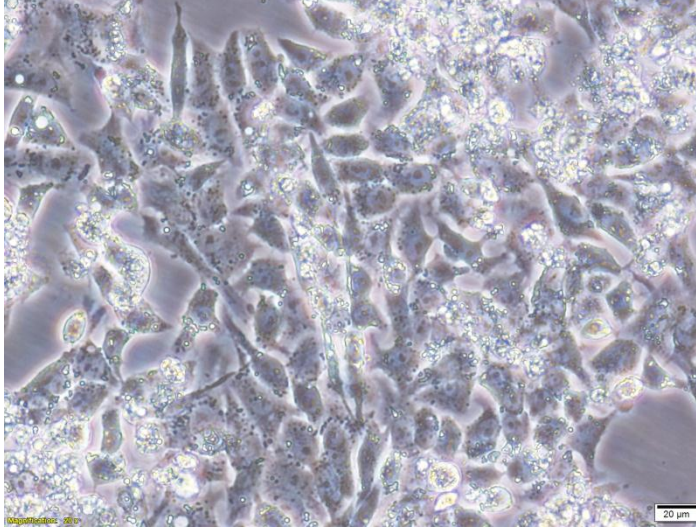
3.2.10. Gen ifadenmesinin saptanması

CHOP, Parkin, HACE1, Optineurin, Hsp60, Hsp10, P62, LC3-II, TBK1 genlerinin ifadenmeleri saptamak amacı ile her bir gene ait real time ready prob ile birlikte LightCycler 480 Probes Master kiti kullanılmıştır. LightCycler 480 Probes Master karışımı kit protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. HepG2 Hücrelerinin Mikroskopik İnceleme Bulguları

Sıvı azot tankından çıkarılan HepG2 hücreleri DMEM besi yerinde çözündürüldükten sonra 25cm²'lik kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saat sonra inverted mikroskopta incelendiğinde hücrelerin tutunmuş olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin besi yeri haftada 2-3 kez değiştirilerek çoğalması sağlanmıştır (Şekil 30).

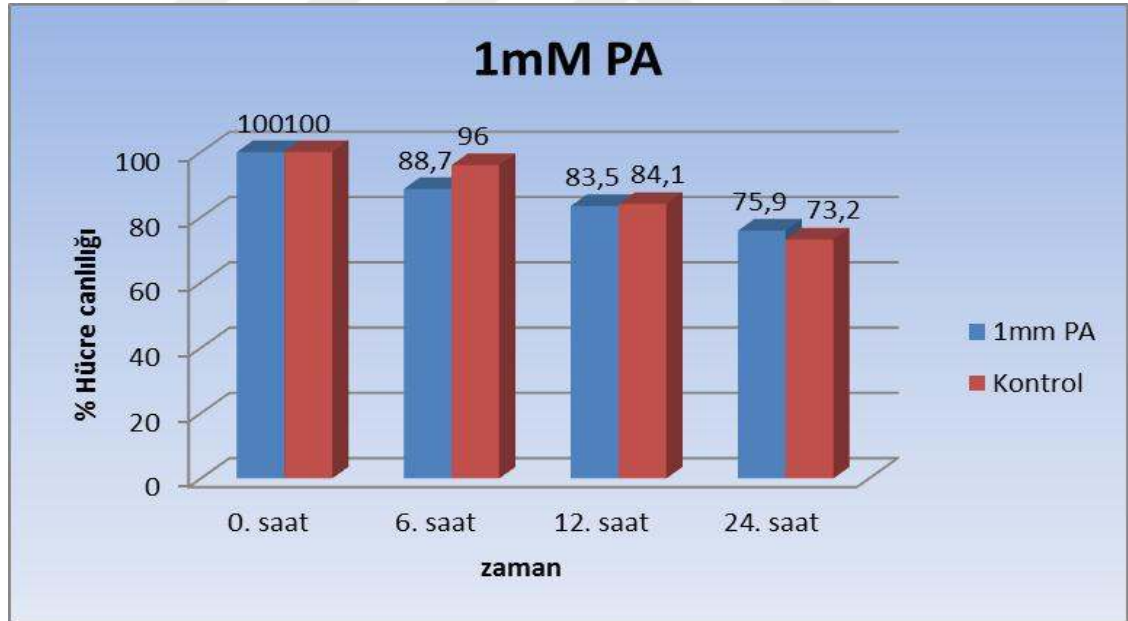


Şekil 30 HepG2 hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü (Olympus IX73, 20X büyütme)

4.2. Palmitik Asit ve CCCP'nin HepG2 Hücrelerinde Zamana Bağlı Sitotoksik Etkilerinin MTT Testi İle Değerlendirme Bulguları

Obezitede artan yağ dokusu çok sayıda sitokin, hormon salgılamakta ve inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır (102). Karaciğer hepatositlerinde artan SYA kaynaklı lipotoksisitenin meydana gelmesi; obezite, diyabet ve NAYKH gibi hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. SYA'lar kimyasal olarak doymuş ve doymamış olarak iki gruba ayrılmaktadır ve doymuş SYA'lar doymamış SYA'lardan

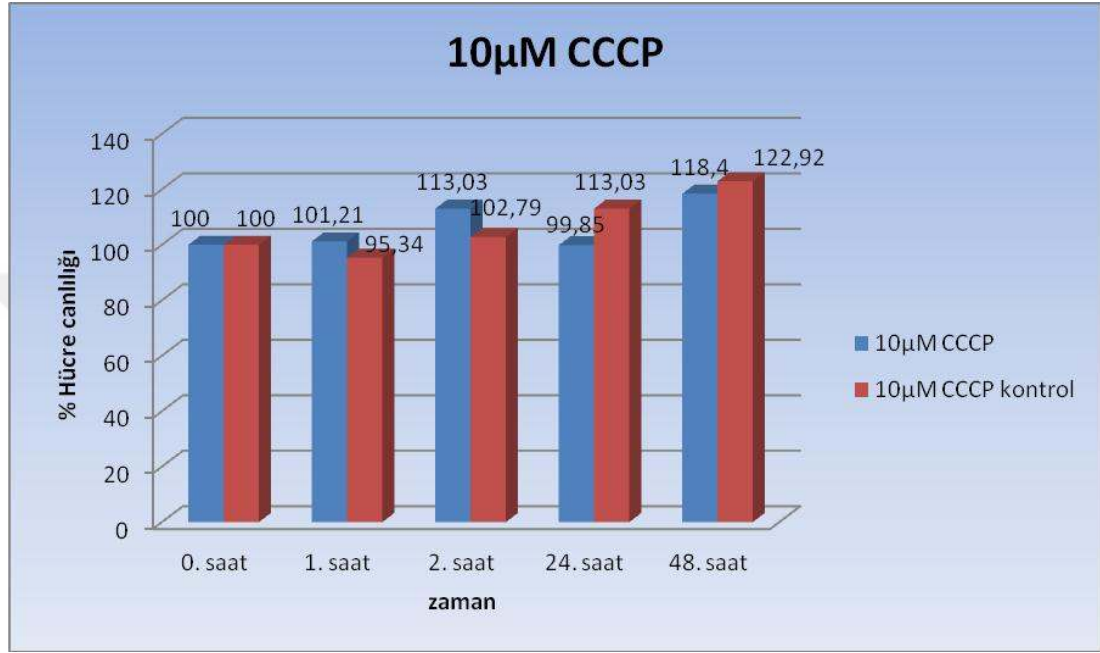
daha fazla lipotoksositeye sahiptir (103). Bu nedenle çalışmamızda doymuş uzun zincirli yağ asidi olan PA'nın HepG2 hücrelerindeki etkisi, hücre canlılığı ve otofaji aktivitesi üzerinden incelenmiştir. Buna ek olarak PA'nın yanında otofaji aktivatörü olan CCCP de kullanılmıştır. PA için 1mM, CCCP için 10µM sitotoksik doz olarak belirlenmiştir. HepG2 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 40000 hücre olarak ekilip, 48 saat sonunda kuyulardaki besi yeri uzaklaştırıldı ve 1mM PA ve 10µM CCCP içeren besi yerleri her kuyuda 250µl olacak şekilde eklenmiştir. PA uygulamasında 0, 6, 12 ve 24. saatlerde, CCCP uygulamasında ise 0, 1, 2, 24 ve 48. saatlerde inkübasyon yapılmıştır. Süre sonunda hücre canlılığı MTT testi ile analiz edilmiştir. MTT testi biyoyumnluluk testleri içerisinde hızlı sonuç alınması ve çok hassas olmasının yanı sıra materyallerin çok düşük düzeydeki toksisitelerinin dahi değerlendirilebilmesine olanak sağlaması nedeniyle en güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir. MTT testi ile elde edilen bulgular Şekil 31'de görülmektedir.



Şekil 31 1mM PA uygulamasının MTT testi analizleri

MTT testi sonucunda HepG2 hücrelerinde PA'nın stres faktörü etkisi gösterilmiş olup çalışmamızda da en etkili saatin 24. saat olduğu tespit edilmiştir. CCCP mitokondriyal uncoupler olup; mitofaji çalışmalarında kullanılan bir kimyasal

ajandır. Hepatositlerde ve HepG2 hücrelerinde yapılan çalışmalarda sitotoksositeye sebep olmadan mitotoksositeye sebep olduğu bildirilmiştir (104). Çalışmamızda 10µM CCCP uygulanması HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etki etmediği gözlenmiştir. MTT testi ile elde edilen bulgular Şekil 32’de görülmektedir. İstatistiksel analizleri ise Tablo 7 ve 8’de verilmiştir.



Şekil 32 10µM CCCP uygulamasının MTT testi analizleri

1mMPA	(J) factor1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
0. saat	6. saat	,162 [*]	,016	,000	,114	,210
	12. saat	,236 [*]	,017	,000	,186	,286
	24. saat	,345 [*]	,020	,000	,286	,405
6. saat	12. saat	,074 [*]	,011	,000	,043	,105
	24. saat	,183 [*]	,013	,000	,146	,221
	0. saat	-,162 [*]	,016	,000	-,210	-,114
12. saat	6. saat	-,074 [*]	,011	,000	-,105	-,043
	24. saat	,109 [*]	,011	,000	,079	,140
	0. saat	-,236 [*]	,017	,000	-,286	-,186
24. saat	6. saat	-,183 [*]	,013	,000	-,221	-,146
	12. saat	-,109 [*]	,011	,000	-,140	-,079
	0. saat	-,345 [*]	,020	,000	-,405	-,286
1mMPA Kontrol	(J) KONTROL	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
0. saat	6. saat	,057 [*]	,018	,027	,004	,109
	12. saat	,227 [*]	,019	,000	,170	,284
	24. saat	,380 [*]	,018	,000	,328	,432
6. saat	12. saat	,170 [*]	,010	,000	,142	,199
	24. saat	,323 [*]	,010	,000	,294	,353
	0. saat	-,057 [*]	,018	,027	-,109	-,004
12. saat	6. saat	-,170 [*]	,010	,000	-,199	-,142
	24. saat	,153 [*]	,013	,000	,114	,191
	0. saat	-,227 [*]	,019	,000	-,284	-,170
24. saat	6. saat	-,323 [*]	,010	,000	-,353	-,294
	12. saat	-,153 [*]	,013	,000	-,191	-,114
	0. saat	-,380 [*]	,018	,000	-,432	-,328

Tablo 7 10mM PA uygulaması MTT testi istatistiksel analiz (* p< 0,001)

10µM CCCP		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
0. saat	1. saat	-,017	,015	1,000	-,063	,030
	2. saat	-,182	,015	,000	-,229	-,135
	24. saat	,002	,018	1,000	-,053	,057
	48. saat	-,257	,012	,000	-,294	-,219
1. saat	0. saat	,017	,015	1,000	-,030	,063
	2. saat	-,165	,011	,000	-,198	-,133
	24. saat	,019	,023	1,000	-,052	,089
	48. saat	-,240	,022	,000	-,306	-,174
2. saat	0. saat	,182	,015	,000	,135	,229
	1. saat	,165	,011	,000	,133	,198
	24. saat	,184	,021	,000	,120	,248
	48. saat	-,074	,020	,006	-,135	-,014
24. saat	0. saat	-,002	,018	1,000	-,057	,053
	1. saat	-,019	,023	1,000	-,089	,052
	2. saat	-,184	,021	,000	-,248	-,120
	48. saat	-,259	,018	,000	-,314	-,203
48. saat	0. saat	,257	,012	,000	,219	,294
	1. saat	,240	,022	,000	,174	,306
	2. saat	,074	,020	,006	,014	,135
	24. saat	,259	,018	,000	,203	,314
10µM CCCP Kontrol		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
0. saat	1. saat	,065	,019	,014	,008	,122
	2. saat	-,039	,020	,945	-,101	,024
	24. saat	-,181	,014	,000	-,226	-,137
	48. saat	-,320	,018	,000	-,374	-,265
1. saat	0. saat	-,065	,019	,014	-,122	-,008
	2. saat	-,104	,023	,000	-,173	-,034
	24. saat	-,246	,015	,000	-,291	-,202
	48. saat	-,385	,024	,000	-,457	-,312
2. saat	0. saat	,039	,020	,945	-,024	,101
	1. saat	,104	,023	,000	,034	,173
	24. saat	-,143	,020	,000	-,204	-,082
	48. saat	-,281	,022	,000	-,350	-,212
24. saat	0. saat	,181	,014	,000	,137	,226
	1. saat	,246	,015	,000	,202	,291
	2. saat	,143	,020	,000	,082	,204
	48. saat	-,138	,019	,000	-,195	-,081
48. saat	0. saat	,320	,018	,000	,265	,374
	1. saat	,385	,024	,000	,312	,457
	2. saat	,281	,022	,000	,212	,350
	24. saat	,138	,019	,000	,081	,195

Tablo 8 10µM CCCP uygulaması MTT testi istatistiksel analiz (* p< 0,001)

4.3. Palmitik Asit ve CCCP Uygulaması Yapılmış HepG2 Hücrelerinden İzole Edilen RNA'ların Sonuçları

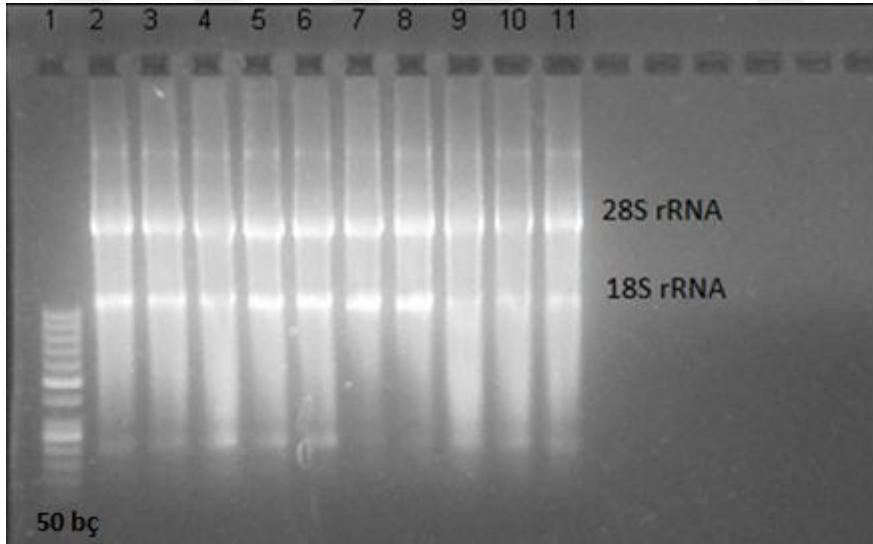
Farklı saatlerde uygulanan PA ve CCCP sonrasında HepG2 hücrelerinden RNA izolasyonu ile elde edilen RNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için yapılan ölçümlerin sonucu Tablo 9'da verilmiştir.

UYGULAMALAR VE SAATLERİ	Pozisyon	1. ölçüm	2. ölçüm	
0. saat RNA	B	0,548 0,267 2,052 438,151	0,541 0,262 2,068 433,127	260 280 260/280 ng/μL
1mM PA 6. saat RNA	C	0,441 0,208 2,124 353,099	0,433 0,203 2,128 346,433	260 280 260/280 ng/μL
1mM PA Kontrol 6. saat RNA	D	0,889 0,425 2,093 711,129	0,824 0,396 2,08 659,477	260 280 260/280 ng/μL
1mM PA 12. saat RNA	E	0,54 0,262 2,056 431,656	0,539 0,257 2,1 431,181	260 280 260/280 ng/μL
1mM PA Kontrol 12. saat RNA	F	0,718 0,346 2,073 574,219	0,706 0,34 2,079 564,961	260 280 260/280 ng/μL
1mM PA 24. saat RNA	G	0,254 0,12 2,108 202,994	0,273 0,129 2,117 218,04	260 280 260/280 ng/μL
1mM PA Kontrol 24. saat RNA	H	0,7 0,338 2,073 560,115	0,705 0,342 2,062 563,759	260 280 260/280 ng/μL
0. saat RNA	B	0,858 0,408 2,1 686,07	0,854 0,408 2,095 683,436	260 280 260/280 ng/μL
10μM CCCP 1. saat RNA	C	0,802 0,382 2,101 641,648	0,854 0,41 2,085 683,461	260 280 260/280 ng/μL
10μM CCCP Kontrol 1. saat RNA	D	0,734 0,355 2,065 586,932	0,785 0,382 2,053 627,609	260 280 260/280 ng/μL
10μM CCCP 2. saat RNA	E	0,924 0,442 2,09 738,876	0,927 0,439 2,11 741,465	260 280 260/280 ng/μL

10µM CCCP Kontrol 2. saat RNA	F	0,772	0,751	260
		0,367	0,357	280
		2,106	2,103	260/280
		617,839	600,492	ng/µL
10µM CCCP 24. saat RNA	G	0,879	0,817	260
		0,417	0,388	280
		2,11	2,104	260/280
		703,242	653,232	ng/µL
10µM CCCP Kontrol 24. saat RNA	H	0,71	0,706	260
		0,334	0,329	280
		2,127	2,146	260/280
		568,093	564,762	ng/µL
10µM CCCP 48. saat RNA	B	0,869	0,827	260
		0,417	0,396	280
		2,085	2,089	260/280
		694,995	661,272	ng/µL
10µM CCCP Kontrol 48. saat RNA	C	0,494	0,48	260
		0,238	0,231	280
		2,074	2,076	260/280
		395,233	383,823	ng/µL

Tablo 9 ve CCCP uygulamalarının RNA izolasyonu saflık ve konsantrasyon sonuçları

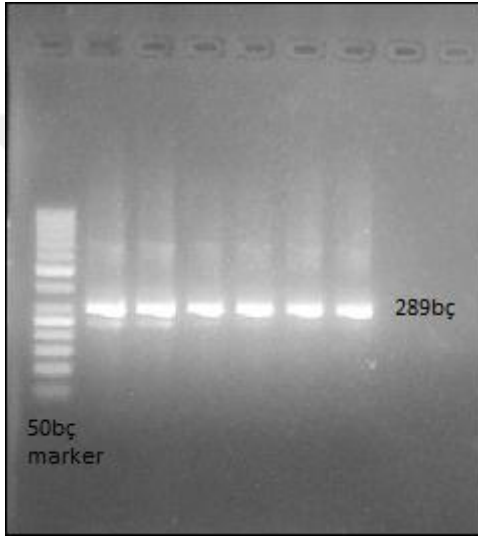
Elde edilen RNA örneklerinin % 1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü şekil 33'de gösterilmiştir.



Şekil 33 RNA izolasyonu sonucu %1,5'lik agaroz jeldeki görüntüsü

4.4. cDNA Kontrol PZR

HepG2 hücrelerinden elde edilen RNA'lar ticari kit kullanılarak cDNA'ya çevrilmesi için uygun protokol uygulanmıştır. Protokol sonucunda cDNA'ların elde edilip edilmediği referans gen olan aktin β 'nın PZR'ı koyularak kontrol edilmiştir. Klasik PZR sonucu 289 baz çiftlik (bç) ürün elde edilmiştir (Şekil 34).



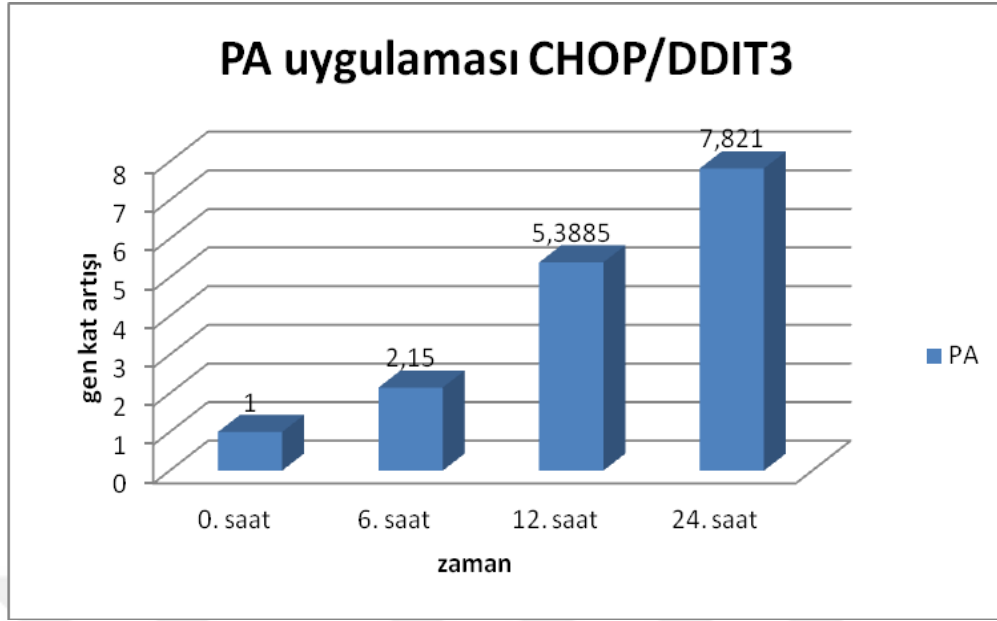
Şekil 34 cDNA kontrol PZR (insan β aktin PZR) örnekleri

4.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) Sonuçları

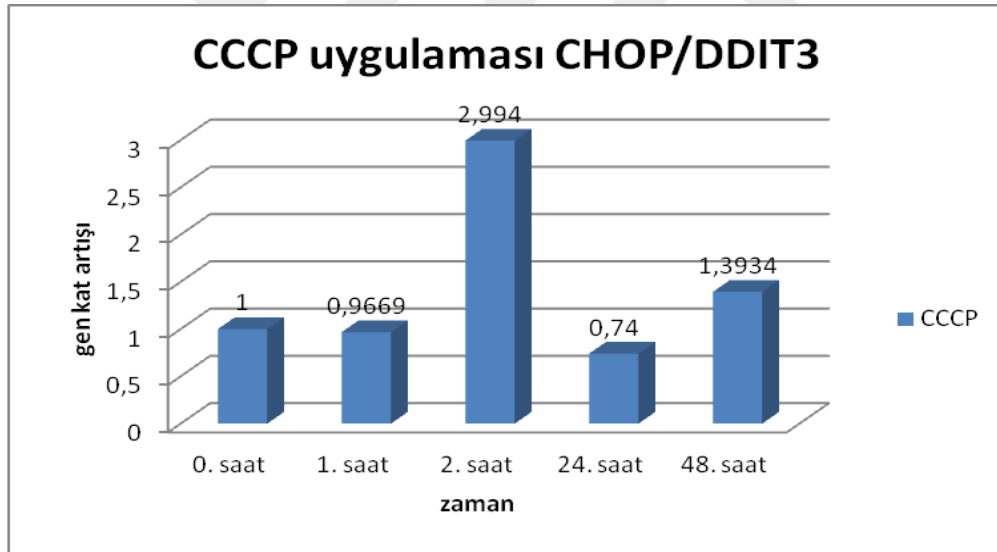
İfadenme çalışmaları ROCHE Light Cycler 480 II cihazında yapılmıştır. Birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip her bir örneğin miktarı 1000 ng olacak şekilde hesaplanarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezden sonra ise 200 ng'a dilüsyonu gerçekleştirilerek ifadenme çalışmalarına başlanmıştır. Hedef genler ve referans genin (β aktin) ifadenmeleri için ticari olarak tasarlanmış olan bölgeye özgü primer-prob karışımı ve 480 probes master kiti kullanılarak ifadenme deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada mitokondriyonla ilişkili stres ve mitofaji genleri; Parkin, Hsp60, Hsp10, CHOP ile otofaji adaptörü/otofaji reseptörü genleri; Optineurin, HACE1, TBK1, LC3-II'nin PA uygulaması yapılarak 6, 12 ve 24. saat; CCCP uygulaması yapılarak 1, 2, 24 ve 48. saat ifadelenmelerine bakılmıştır. Referans gen olarak aktin β kullanılarak gen ifadelenmelerindeki kat artış değişiklikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmalardan CHOP'a ait gen amplifikasyon eğrisi aşağıdaki gibidir. Aynı protokol diğer 7 gen için uygulanmıştır.

CHOP geninin aktin β referans genine göre, PA ve CCCP uygulamasına bağlı çeşitli saatlerdeki gen ifadelenmelerindeki kat artış oranları şekil 35 ve 36'da verilmiştir. CHOP geni PA uygulaması yapıldığında referans gene kıyasla en fazla artış olan saatler 12. ve 24. saatlerde görülmüştür. 12. saatte 5.38 kat artış gözlenirken 24. saatte ise 7,82 kat artış meydana gelmiştir. CCCP uygulandığında ise en fazla artışın 2. saatte 2,94 olduğu gözlenmiştir. Ancak CCCP uygulamasındaki artış oranları PA uygulamasındaki artış oranı kadar yüksek olmamıştır.

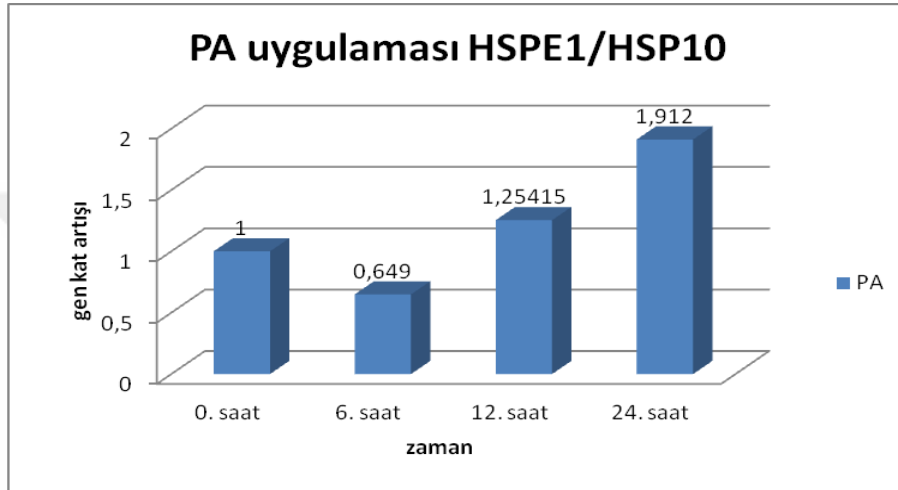


Şekil 35 CHOP geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

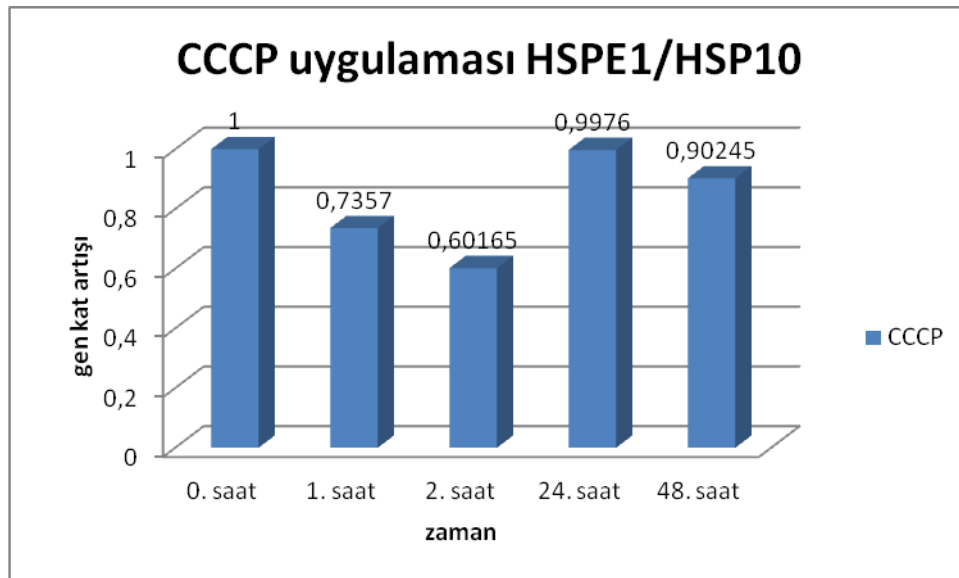


Şekil 36 CHOP geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

HSP10/ HSPE1 geni ise PA uygulamasında en fazla artış 24. saatte saptanmıştır. Referans gene kıyasla 1,91 kat artmış olduğu saptanmıştır. CCCP uygulamasında ise 24 ve 48. saatlerde artış gözlenmiştir. 24. saatte 0,99 kat artarken 48. saatte 0,90 kat artışı saptanmıştır. İki ayrı strese verilen cevap 24. saatte ortak olarak benzer bir artış göstermiştir (Şekil 37 ve 38).

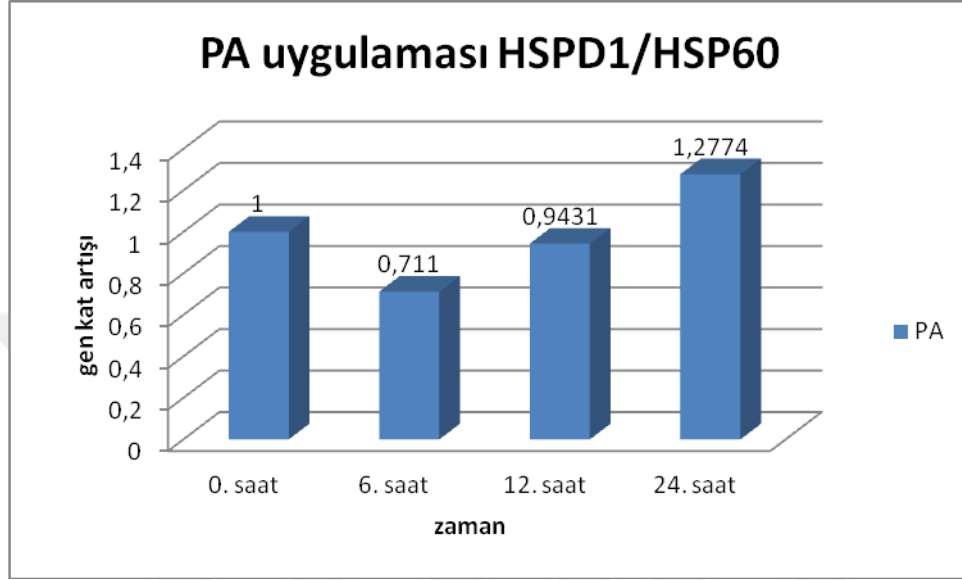


Şekil 37 HSP10/HSPE1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

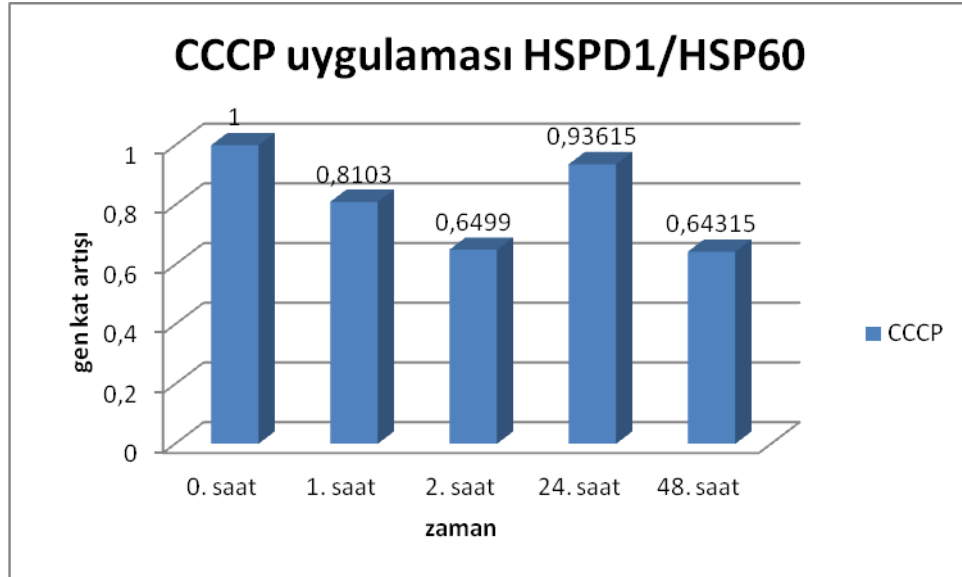


Şekil 38 HSP10/HSPE1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

HSP60/HSPD1 geni PA uygulamasında referans gene oranla en fazla kat artışı 24. saatte saptanmış olup bu artış 1,27'dir. CCCP uygulamasında da en fazla kat artışı 24. saatte gözlenmiştir ve 0,93 olarak saptanmıştır (Şekil 39 ve 40).

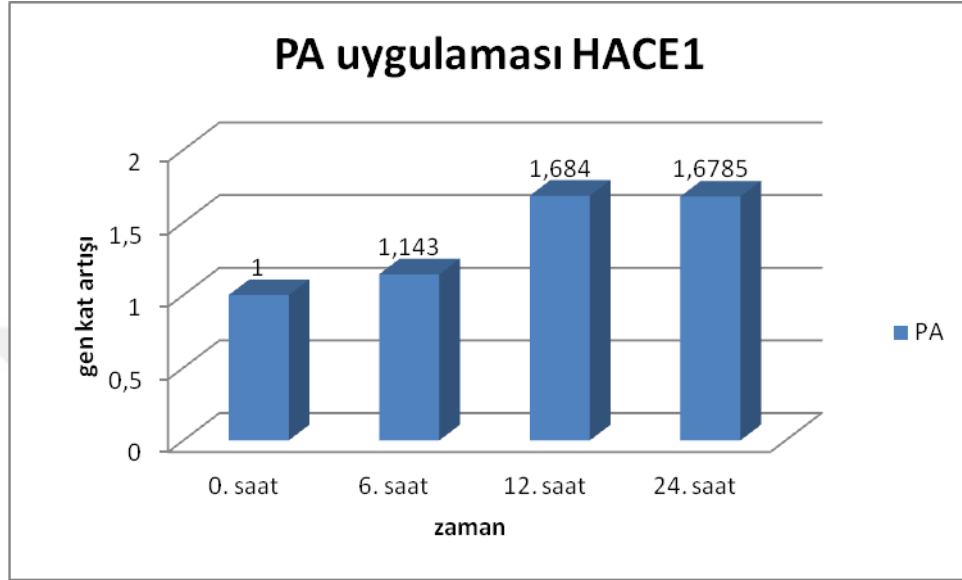


Şekil 39 HSP60/HSPD1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

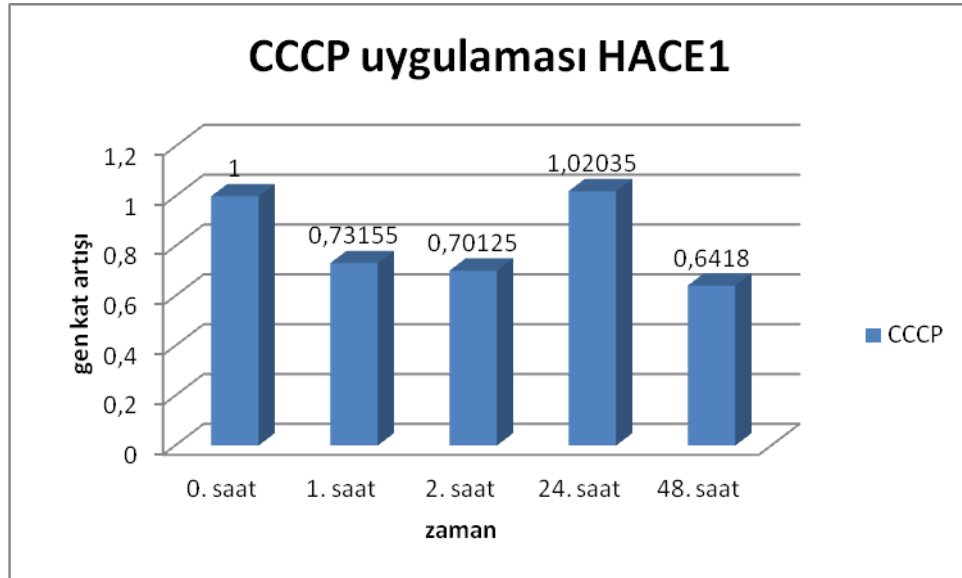


Şekil 40 HSP60/HSPD1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

PA ve CCCP uygulamasına bağılı HACE1 geninin verdiğı yanıtı bakıldığında ise ifadelenmesindeki en yüksek kat artışı PA uygulamasında 12. ve 24. saatte gözlenmiş olup 1,68 ve 1,67 olarak tespit edilmiştir. CCCP uygulamasında da en fazla artış 24. saatte saptanmış olup 1,02 olarak tespit edilmiştir (Ş).

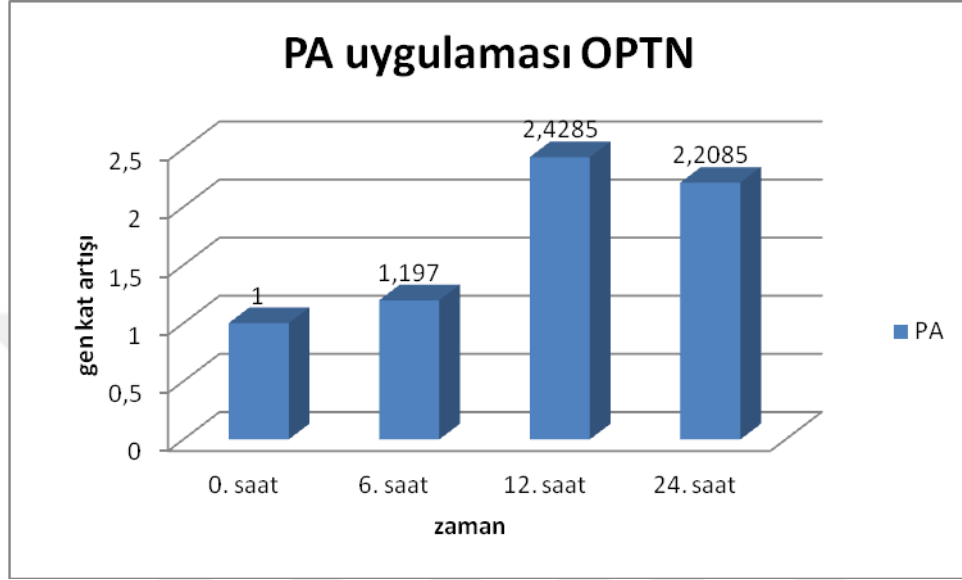


Şekil 41 HACE1 geni PA uygulaması ve zamana bağılı gen ifadelenmesindeki kat artışı

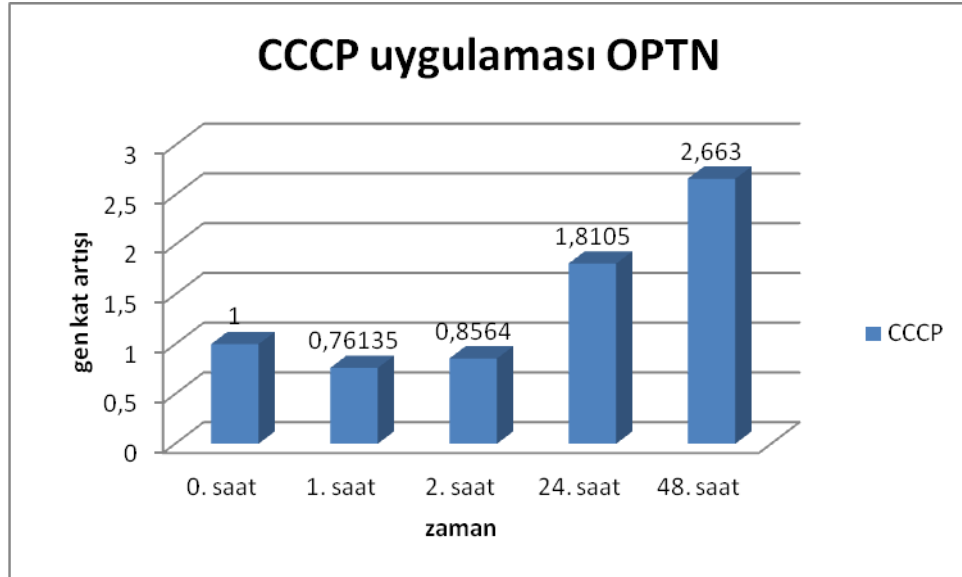


Şekil 42 HACE1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağılı gen ifadelenmesindeki kat artışı

OPTN geni PA uygulamasında en fazla kat artışı 12. ve 24. saatte olup 2,42 ve 2,20 olarak saptanmıştır. CCCP uygulamasında ise en fazla kat artışı 48. saatte 2,66 olarak tespit edilmiştir (Şekil 43 ve 44).

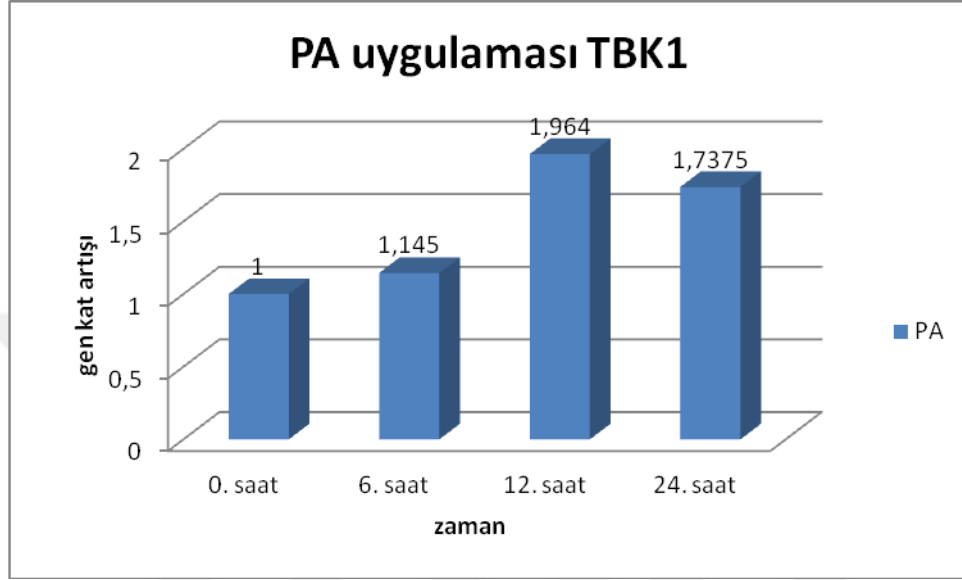


Şekil 43 OPTN geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

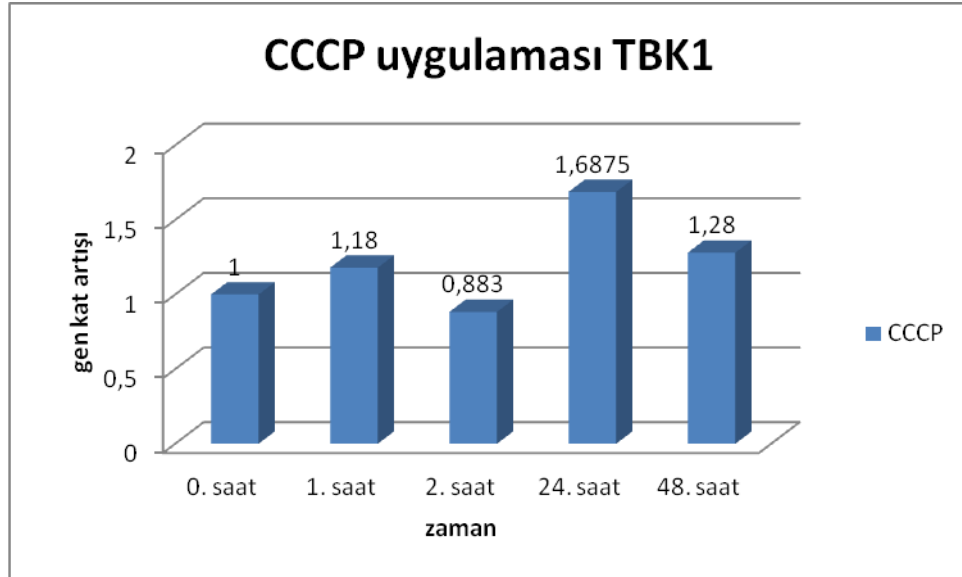


Şekil 44 OPTN geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

TBK1 geninde PA uygulandığında en fazla kat artışı 12 ve 24. saate olup 1,96 ve 1,73 olarak tespit edilmiştir. CCCP uygulandığında ise en fazla artış 24. saatte 1,68 olarak tespit edilmiştir (Şekil 45 ve 46).

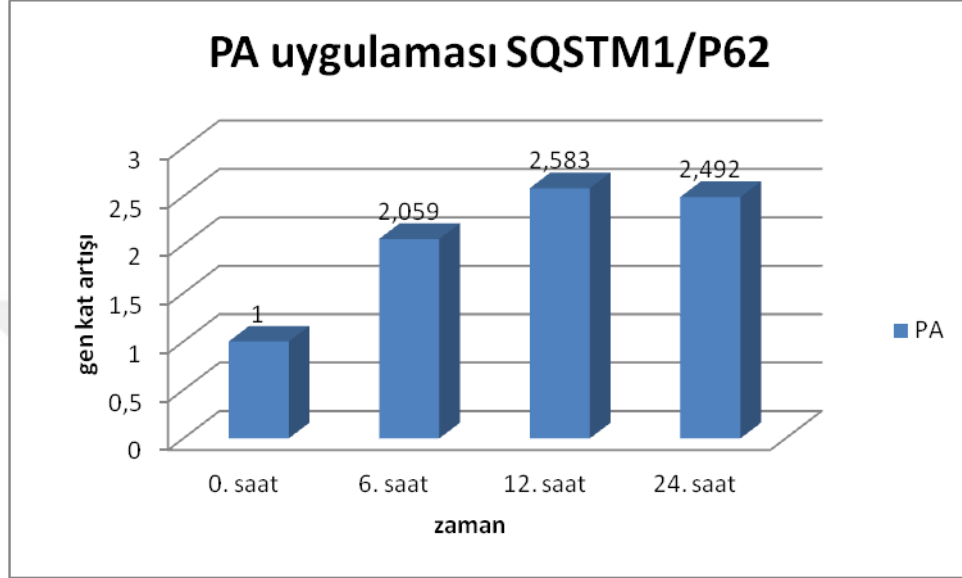


Şekil 45 TBK1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

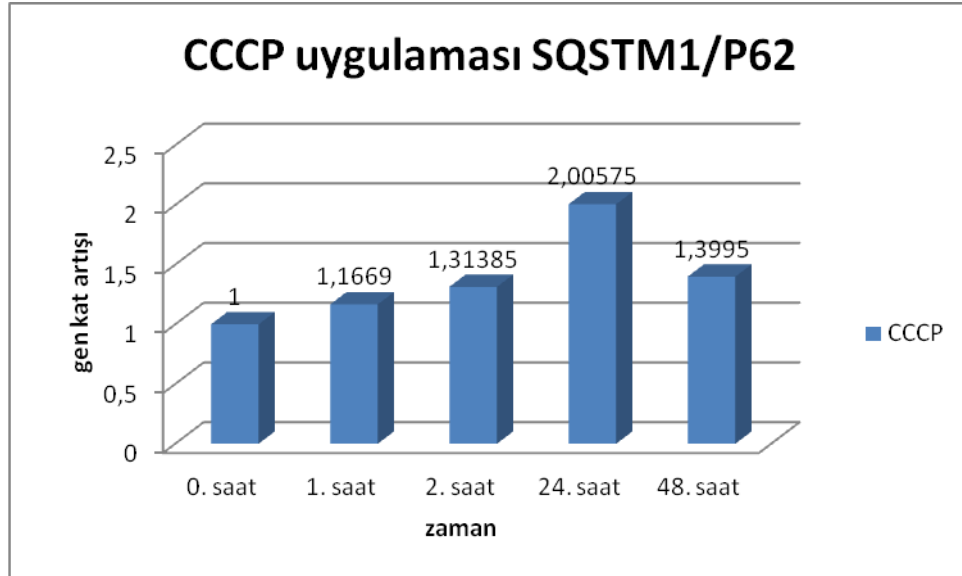


Şekil 46 TBK1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

SQSTZM1 geninde PA uygulandığında en fazla kat artışı 12 ve 24. saate olup 2,58 ve 2,49 olarak tespit edilmiştir. CCCP uygulandığında ise en fazla artış 24. saatte 2 olarak tespit edilmiştir (Şekil 47 ve 48).

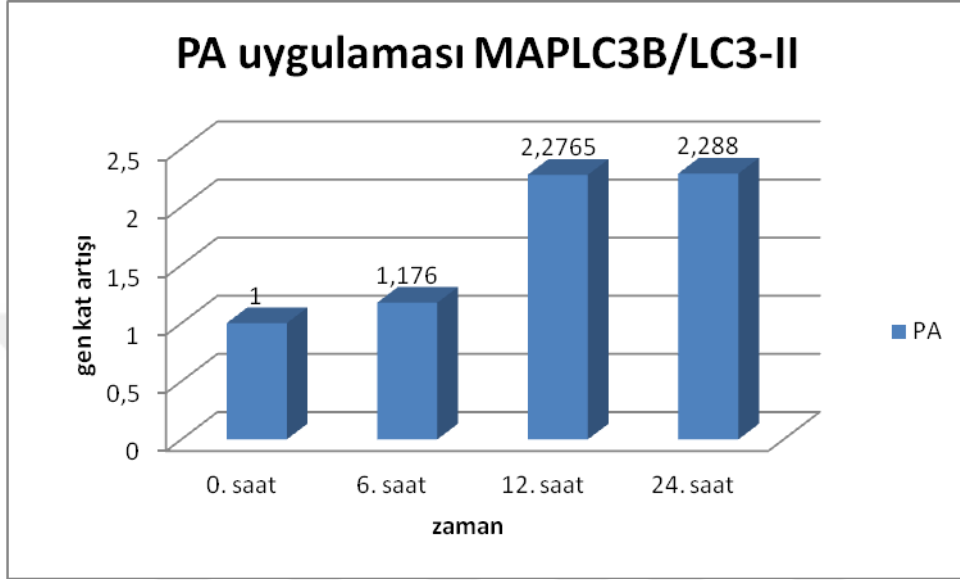


Şekil 47 SQSTZM1 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

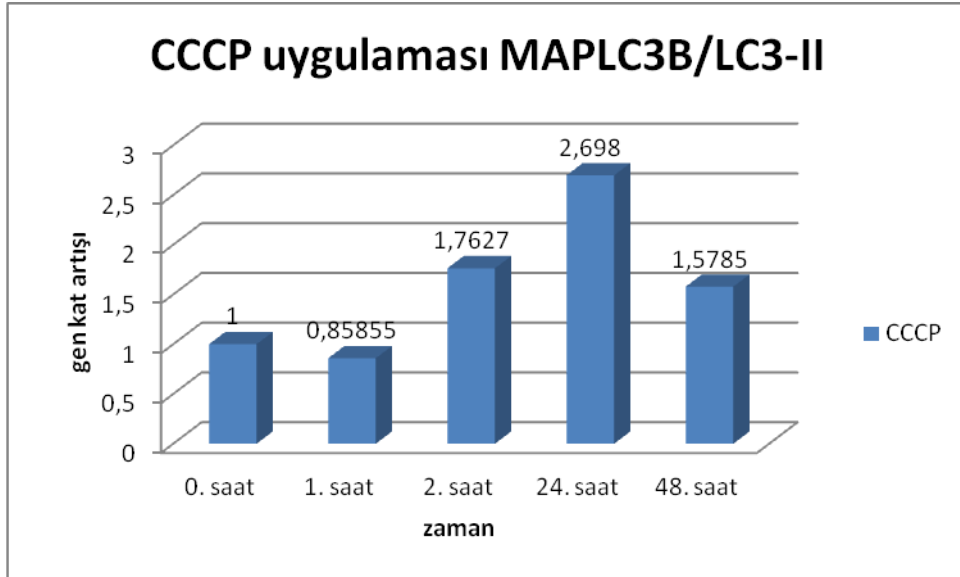


Şekil 48 SQSTZM1 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

LC3-II/ MAPLC3B geninde PA uygulandığında en fazla kat artışı 12 ve 24. saate olup 2,27 ve 2,28 olarak tespit edilmiştir. CCCP uygulandığında ise en fazla artış 24. saatte 2,69 olarak tespit edilmiştir (Şekil 49 ve 50).

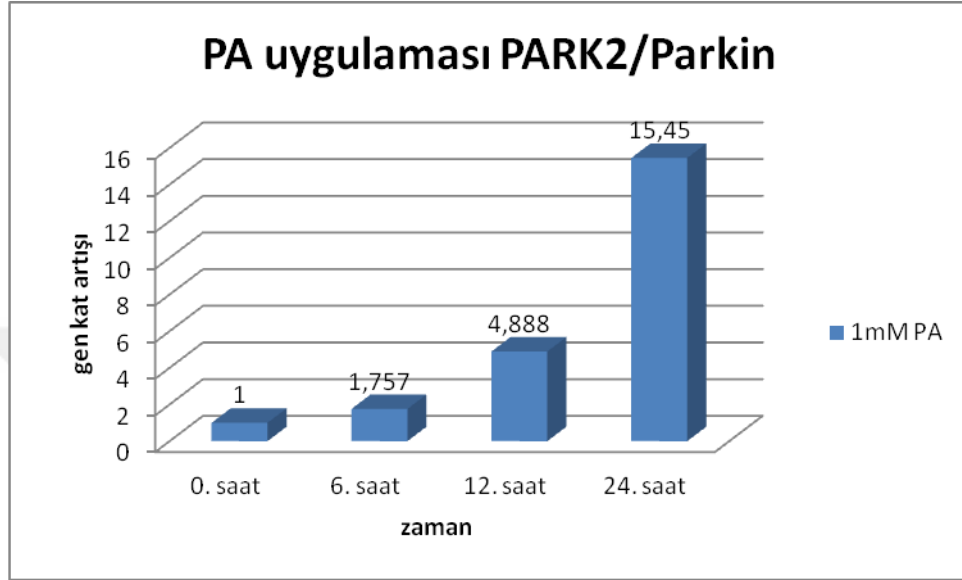


Şekil 49 LC3-II/ MAPLC3B geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

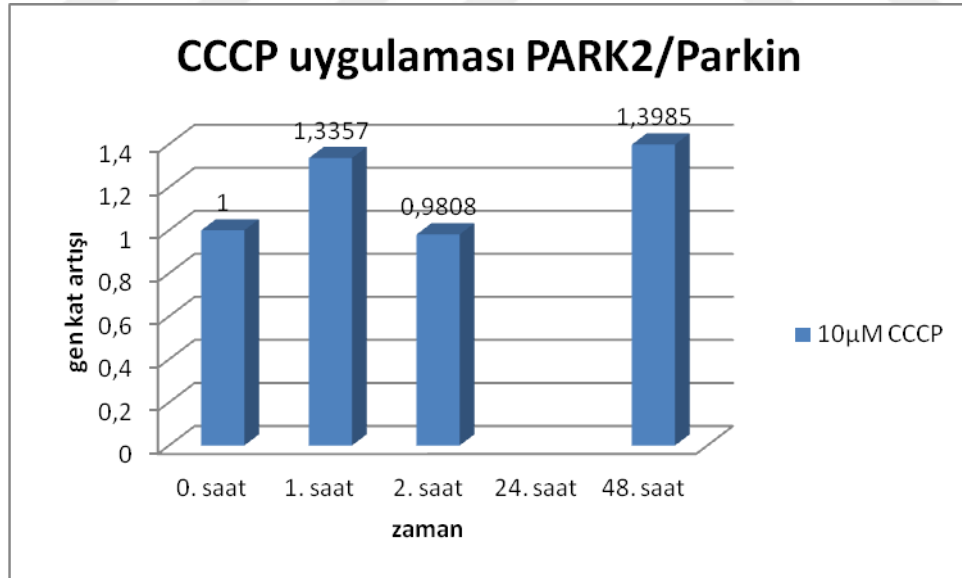


Şekil 50 LC3-II/ MAPLC3B geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadenmesindeki kat artışı

PARK2 geninde PA uygulandığında en fazla kat artışı 24. saate olup 15,45 olarak tespit edilmiştir. CCCP uygulandığında ise 1, 2 ve 48. saatte ifadelenmelerinde artış gözlenmiş olup bunlar sırasıyla 1,33, 0,98 ve 1,39 olarak tespit edilmiştir. 24 saatte ifadelenme tespit edilememiştir (Şekil 51 ve 52).



Şekil 51 Parkin/ PARK2 geni PA uygulaması ve zamana bağlı gen ifadelenmesindeki kat artışı



Şekil 52 Parkin/ PARK2 geni CCCP uygulaması ve zamana bağlı gen ifadelenmesindeki kat artışı

4.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel incelemede, MTT testi parametrik ve non parametrik açıdan incelenmiştir. Gruplar arası farklar ‘Oneway ANOVA’ analizi ile değerlendirilmiş ve saatler arası fark ‘General Linear Model’ analizi ile yapılmıştır. $P < 0,001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veri seti SPSS programı (SPSS 19, Armonk, NY: IBM Corp) kullanılarak değerlendirilmiştir.



4. TARTIŞMA

NAYKH, karaciğerde basit yağlanmadan, NASH, siroz ve hepatokarsinomlara kadar uzanan bir karaciğer hastalığı spektrumunu temsil eder. NAYKH'nin patogeneğinde, “iki vuruş” olarak adlandırılan patogeneze modeli önerilmiştir. “İlk vuruş” karaciğerde yağ birikimini içerirken, “ikinci vuruş” oksidatif stres, inflamasyon, yıldız hücresi aktivasyonu, fibrojen ve devamında NAYKH ve NASH ile sonuçlanır. Mitokondriyonda yağ asitlerinin β oksidasyonu gerçekleşmekte ve en önemli ROS kaynağını oluşturmaktadır. Böylece, bu ‘vuruş’larda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu da rol oynamaktadır (105).

Lipotoksisite hücrelerde aşırı SYA'nın bulunmasıyla meydana gelen sitotoksik durumdur. Hepatositlerde NAYKH gelişiminde yağ asitlerinin indüklediği sitotoksisite temel rol oynamaktadır. Yağ asitleri kimyasal olarak doymuş ve doymamış (tekli doymamış yağlar ve çoklu doymamış yağlar) yağ asitleri olarak iki gruba ayrılır ve yapıları biyolojik fonksiyonlarını etkilemektedir. Palmitik asit (PA) doymuş yağ asididir, oleik asit ise (OA) tekli doymamış yağ asidi olup diyet ve serumda en fazla bulunan yağ asidi türleridir. Doymuş ve doymamış yağ asitleri ile ilgili yapılan çalışmalarda doymuş yağ asitlerinin daha toksik olduğu gözlenmiştir. Altında yatan mekanizma tam olarak bilinemesi de yağ asitlerinin trigliseride (TG) dönüşümü sitotoksisiteye neden olmaktadır. PA'nın TG'ye dönüşümü daha az olduğundan daha fazla toksik; OA'nın TG'ye dönüşümü daha fazla olmasına bağlı olarak daha az toksiktir (91).

SYA'ların karaciğerde fazla birikmesinin, ektopik lipid birikimine ve insülin direncine neden olduğuna, bunun da diyabet ve NASH gibi hastalıklara yol açtığına dair önemli kanıtlar vardır. Artmış doymuş yağlar periferik doku için toksik olsa da, doymamış yağlar doymuş yağlardan kaynaklı lipotoksisitenin etkisini ortadan kaldırır. Çalışmalar, doymuş yağ olan PA'nın, çeşitli hücre hatlarında lipotoksik etkisi olduğunu ve metabolik bozukluklarda da biyolojik belirteç rolünde olduğunu göstermektedir (3).

Hücre içi PA'nın artmış seviyesi mitokondriyonda, diaçilgliserol ve seramit gibi zararlı ara maddelere dönüştürüldüğü beta oksidasyon kapasitesinin aşılmasına sebep olmaktadır. Tamamlanmamış SYA oksidasyonunun ve zararlı SYA türevli ara maddeleri ise, ROS artışı, mitokondriyal fragmentasyon, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve hücre ölümüne yol açmaktadır (3).

Cang ve ark. HepG2 hücrelerinde PA uygulaması ile yaptıkları çalışmada PA'nın ROS'u artırdığını tespit etmişlerdir (106).

CCCP, proton (H^+) iyonoforları/ protonofor olup; hücre biyolojisi çalışmalarında yaygınca kullanılmaktadır. Protonoforlar zayıf asidik lipofilik özellikte olup H^+ iyonunun mitokondriyon iç zar içine taşınabilmesi özelliğine sahiptir. Böylelikle elektrokimyasal protein gradiyentini boşaltmakta ve oksidatif fosforilasyonla 'uncoupling'e sebep olmaktadır. Bu durum mitokondriyonda oksijen tüketimini etkilemekte olup, ATP üretimini azaltmaktadır. Protonoforlar bu sebeple mitokondriyal otofaji çalışmalarında kullanılan kimyasallardır (107).

Otofaji, uzun ömürlü veya hasar görmüş proteinlerin ve organellerin dönüşümünü düzenleyen ve hücre içi bileşenleri geri dönüştürerek çeşitli hücrel streslerin tamponlanmasına yardımcı olan homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkmıştır. Otofajinin kanser, enfeksiyon, dejeneratif ve metabolik bozukluklar dahil olmak üzere bir dizi hastalığının patogenezindeki rolü bulunmaktadır. Otofajinin, hücrelerin lipid stimülasyonunun fizyolojik ve patolojik yanıtlarında katkısı bulunduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Gen nakavt fareleri kullanarak, hepatik lipid depolarının düzenlenmesinde otofajinin temel rol aldığı gösterilmiştir. Otofajinin inhibe edilmesinin, fare modellerinde akut etanolün indüklediği hepatoksisitede steatozu arttırdığını, bu da otofajinin, lipid metabolizması ve farklılaşmanın düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığını göstermiştir. Pankreatik β -hücrelerinde ise, normal hücrel fonksiyonun korunmasında otofajinin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, SYA otofaji üzerindeki bildirilen etkileri hala tartışmalıdır. SYA ile indüklenen NAYKH ve bunun altında yatan moleküler mekanizmalarda otofajinin potansiyel rolü halen tam olarak aydınlatılamamıştır (103).

Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde ayrı ayrı lipotoksik ve protonofor stresi uygulanarak mitokondriyonun verdiği stres yanıtı farklılığının araştırılması hedeflenmiştir. Böylece farklı uyaranlara karşı mitokondriyonun verdiği otofaji mitofaji yanıtlarında görev alan proteinler hakkında daha detaylı bilgi edinilmesi hedeflenmiştir. Ek olarak uygulanan stresin süresi ve çeşitliliğinin de yanıt farklılığındaki etkisi araştırılmıştır.

Mitokondriyal disfonksiyon, genel olarak, mitokondriyal matriks içinde katlanmış proteinlerin birikimini içeren fakat aynı zamanda genotoksik stres ve kimyasal inhibitörler gibi OXPHOS aktivitesini bozan koşullardan oluşmaktadır. Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı; mitokondriyal matriks içinde katlanmış proteinlerin birikimini içeren fakat aynı zamanda genotoksik stres ve kimyasal inhibitörler gibi OXPHOS aktivitesini bozan koşullar sonucu, çekirdekte mitokondriyal protein kalite kontrolünde görev alan genlerinin ifadelenmesiyle oluşturulan yanıttır. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda da oluşan yanıtlardan birisi de CHOP ifadelenmesidir (108). Mitokondriyon gibi ER da hatalı katlanan protein birikimine yatkındır ve oluşan proteotoksisiteye yanıt olarak çeşitli şaperonlar ve proteazlar transkripsiyonel olarak upregüle olup; katlanmamış protein yanıtını oluşturarak protein homeostazını sağlarlar. ER ve mitokondriyonda benzer düzenleyici proteinler görev alırlar. Bunlardan CHOP proteini ER stres boyunca ifadelenmesi artmakta ve proapoptotik rol oynamaktadır (109). Çalışmamızda HepG2 hücrelerine PA ve CCCP uyguladığımızda CHOP ifadelenmesi araştırıldı. CCCP uygulamasında 2. saatte 2,99 kat artışı gözlenirken, PA uygulanan 12. saatte 5,38 kat, 24. saatte de 7,82 kat arttığı gözlenmiştir. CHOP ifadelenmesindeki bu artış aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun da belirticidir. Benzer şekilde Achard ve ark. HepG2 hücrelerine PA'nın ER stres ve KPY'yi indüklediğini ve CHOP'un mRNA seviyesinin artmış olduğunu göstermişlerdir (110). Shinjo ve ark. HepG2 hücrelerine PA uygulaması yaparak ER'de stres oluşturmuşlar, ER ve mitokondriyon arasındaki konuşmada MİM bölgesinde meydana gelen değişimleri ve insülin direncindeki etkilerini araştırmışlar ve CHOP'un 12. ve 24. saatlerde ifadelenmesinin artmış olduğunu göstermişlerdir (111). Ancak CCCP uygulamasının etkileri ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Mitokondriyonda işlevsel olan proteinlerin katlanmasında mtHSP70, mtHSP60 ve mtHSP10 mitokondriyal şaperon ailesi üyeleri görev alırlar. HSP70 ve HSP60 öncül proteinlerin doğru katlanmasını sağlar ve kontrol eder. HSP60'lar, HSP10 ile işbirliği içinde, ATP'ye bağlı konformasyonel değişikliklerle, substrat proteinlerinin diğer çevre proteinleriyle temasını önleyerek, kendi içinde katlanmasını sağlar (112). Zhao ve ark. yapmış olduğu çalışmada; mitokondriyona özgü proteinin mutant formu ile yarattıkları mitokondriyal strese HSP70, HSP60 ve HSP10 ifadenmeleri incelemiştir. HSP70 ifadenmesi değişmezken, HSP60 ve HSP10 ifadenmesinin artmış olduğunu göstermişlerdir (113). Bu bilgiye dayanarak çalışmamızda da HSP60 ve HSP10 ifadenmeleri incelenmiştir. HSP60 ifadenmesi CCCP uygulamasında azalırken, PA uygulamasında 24. saatte 1,27 kat artış tespit edilmiştir. HSP10 ifadenmesinde ise CCCP uygulamasında azalma gözlenirken, PA uygulamasında ise 12. ve 24. saatte ise sırasıyla 1,25 kat ve 1,91 kat artmıştır. Bu bulgu PA'nın mitokondriyal KPY'nı daha fazla tetiklediğini gösterir. Ancak Soutar ve arkadaşlarının çok kısa süre önce yayınladıkları çalışmada hücre kültüründe kullanılan FBS/BSA gibi kimyasalların konsantrasyonlarının CCCP'nin mitokondriyon depolarizasyonunu azalttığını bildirmişlerdir (114). Belkide bu çalışmada CCCP uygulaması ile mitokondriyal depolarizasyonun hücre kültüründe kullanılan kimyasallar nedeniyle kısıtlı kalmış olabileceği, bunun da çalışmamızdaki HSP10 ve HSP60 genlerinin ifadenmesinde beklediğimiz artışın tespit edilememe sebebi olabileceğini düşündürmektedir.

Selektif otofajide, otofaji reseptörleri kargonun seçiminde ve tesliminde ana rol oynamaktadır. Ancak, çoklu otofaji reseptörlerinin otofajinin kontrolündeki işlevi ile ilgili bilgi sınırlıdır. OPTN yakın zamanda tanımlanmış bir otofaji reseptörü olup aynı zamanda söz konusu proteini kodlayan gendeki mutasyonların da glokom ve amiyotrofik lateral skleroz fenotipine neden olduğu bilinmektedir.

İlk kez Wilms tümöründe HACE1'in tümör baskılayıcı bir protein olduğu anlaşılmıştır. Yapılan pek çok çalışma söz konusu proteinin tümör süpresör rolüne yöneliktir. Aynı zamanda ubikütin ligaz aktivitesine sahip olan HACE1'in OPTN'i ubikütinleyerek otofajiyi aktive ettiği ile ilgili çalışmalar ise güncel bilgilerimiz dahilinde son derece sınırlıdır. Bir otofaji reseptörü olan OPTN, diğer otofaji

reseptörlerinde olduğu gibi ubikütilenerek ve LC3'e bağlanarak yıkılacak olan substratın otofagozom içine alınmasını sağlar. TBK1 ise OPTN'nin upstreamında görev alan düzenleyici bir protein olup; OPTN'i fosforlayarak aktive eder ve ubikütin zincirine bağlanma kapasitesini artırarak Parkin tarafından ubikütilenmiş mitokondriyonun otofagozoma yönlendirilmesini sağlar. OPTN'in depolarize mitokondriyonun otofajik temizliğindeki rolü ile ilgili bilgilerimiz çok sınırlıdır (78,115–118).

Bansal ve ark. çalışmalarında bazal ve açlık koşullarında meydana gelen otofajide OPTN'i susturmuşlar ve otofagozom oluşumundaki rolünü incelemişlerdir. OPTN'in bazal ve açlıkla oluşturulan mitofajide LC3-II üretimini güçlendirdiği, fagoforun olgunlaşmasına aracılık ettiğini bildirmişlerdir. (119).

Yu ve ark. çalışmalarında HACE1, OPTN'i ubikütilenerek tümör süpresör gibi davrandığını ve seçici otofaji aktive ettiğini bildirmişlerdir. HACE1 promotörünün demetilasyonu ise, OPTN ubikütilasyonunu sağladığı ve LC3-II protein seviyesini artırdığı bildirilmiştir (118).

Seçici otofaji mekanizmasında beraber rol alan OPTN, HACE1 ve TBK1 proteinlerini kodlayan genlerin PA uygulamasında 12 ve 24. saatlerde ifadenmesindeki kat artışları gözlenmiştir. 12. saatte artan OPTN ifadenmesi TBK1 ve HACE1 deki artışlar da aynı saatlerde eşlik etmiştir. Bu bulgu seçici otofajinin aktif olabileceğini düşündürmektedir. 24. saatlerde ise OPTN, HACE1 ve TBK1 genlerinde ifadenmesinin azalmaya başladığı görülmektedir. Bu bulgu da seçici otofajinin azalmaya başladığını işaret etmektedir.

CCCP uygulamasında ise söz konusu genlerin ifadenme kat artışı 24. saatte tespit edilmiştir. Bu bulgu seçici otofajinin gerçekleştiğine işaret edebilir. Ancak 48. saate OPTN ifadenmesindeki artışın aksine TBK1 ve HACE1'in ifadenmelerindeki azalma seçici otofajinin halen devam ettiğini, ya da OPTN'in başka bir fonksiyonunun olabileceğini düşündürmektedir. PA ve CCCP uygulaması birbirleriyle karşılaştırıldığında; hücrel stres yanıtının PA'da daha erken başladığı ve azaldığı, CCCP'de ise hücrel stres yanıtının daha geç aktiflenip daha uzun sürdüğü görülmektedir.

Çalışmamızda PA uygulamasından sonra p62 ve LC3-II ifadenmelerinde 6. saatte başlayan artış 12. saate kadar sürerek 24. saatte azalmaya geçmiştir. Bu bulgu da PA uygulamasının p62 ve LC3-II ifadenme artışına bağlı mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu arttırdığına işaret etmektedir. Zheng ve ark. (120) yapmış olduğu çalışmada bizim bulgumuzu doğrular niteliktedir. Cheng ve ark. (121) da yaptığı çalışmada LC3-II ifadenmesi benzer şekilde gerçekleşirken p62 ifadenmesinin ise 6. saatte artarken 12 ve 24. saatte azaldığını bildirmiştir. Meng ve ark. (122) yapmış olduğu bir başka çalışmada ise LC3 mRNA'sı artarken p62 ifadenmesinin değişmediğini bildirmelerine ek olarak aynı çalışmada PA uygulamasına bağlı olarak otofajik vakuol oluşumunu gözlemleyerek otofajinin gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Mei ve ark (91) yapmış olduğu bir başka çalışmada ise PA'in hücreleri apoptoza yönlendirdiğini bildirmişlerdir. Verilerimiz, çalışmamızda kullanılan '*in-vitro*' koşulların öncelikle prosurvival mekanizması olarak otofajiyi tetiklediğine işaret eder niteliktedir. Apoptozla ilişkili genlerin gelecek çalışmalarda bakılması da yapılacaklar arasındadır. CCCP uygulamasında ise p62 ve LC3 ifadenmelerindeki artış 2. saatte başlayıp 24. saate kadar devam etmiş 48. saatte ise azaldığı gözlenmiştir.

Fonksiyonunu yitirmiş mitokondriyonun otofaji aracılığıyla seçici yıkımı mitofajidir ve sağlıklı mitokondriyon devamlılığını sağlayan temel kalite kontrol mekanizmasıdır. PINK1 Parkin aracılı mitofaji ise üzerinde en çok çalışılan kalite kontrol mekanizması olarak literatürde yerini almaktadır (123).

Wu ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında endotelial hücrelerine PA uygulamışlardır. PINK1- Parkin yolunun aktive olduğunu göstermişlerdir. PA'nın otofaji belirteci LC3-II ve lizozom belirteci Lamp2 ile etkileşiminin arttığını bildirmişlerdir. PA'nın ek olarak PINK1 ve Parkin'nin seviyesini arttırdığını raporlamışlardır (124). Song ve ark. çalışmalarının bir ayağında HepG2 hücrelerine PA ile birlikte glikoz uygulamışlar ve metforminin etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlarında PA ve glikoz uygulaması yapılan hücrelerde Parkin ifadenmesinin artmış olduğunu göstermişlerdir (125).

Bizim çalışmamızda ise PA ile oluşturulan metabolik stresin Parkin ifadenmesini 6., 12. ve en çok da 24. saatte artırdığı, protonofor stresinde ise 1. ve 48. saatlerde

artışın olduğu gör÷lmektedir. Ancak Parkinin hücre içerisinde farklı rolleri bulunan bir protein olması nedeniyle PINK1 ifadenme düzeyi çalışılmadan bu verilerle yapılacak bir yorumun doğruluktan uzak olabileceği düşün÷lmüştür.

Her iki stres ajanında mitokondriyonda hasar oluşturduğu, seçici kurtarma sistemlerinin devreye girdiği, verilen yanıtın ise stres tipine göre farklı saatlerde farklı proteinlerin devreye girerek organeli kurtarma yönünde hareket ettiğine işaret etmektedir.



6. SONUÇLAR

- HepG2 hücrelerinde PA ve CCCP uygulaması birbirleriyle karşılaştırıldığında; hücresel stres yanıtının PA'da daha erken başladığı ve azaldığı, CCCP'de ise hücresel stres yanıtının daha geç aktiflenip daha uzun sürdüğü gözlenmiştir. Bu etkinin araştırıldığı literatürdeki ilk çalışmadır.
- HepG2 hücrelerine PA ve CCCP uygulaması yapıldığında CHOP ifadenmesi her iki grupta da artış göstermiştir. Bu da mitokondriyonda fonksiyon bozukluğu ve mitokondriyal stresin oluştuğunu göstermektedir.
- Mitokondriyal protein katlanmasında görevli olan şaperon proteinler mtHSP10 ve mtHSP60 ifadenmesine bakılmıştır. PA uygulaması yapılan hücrelerde HSP10 ve HSP60 ifadenmesi artış göstermiştir. Bu da bize mitokondriyonda meydana gelen strese bağlı şaperon proteinlerinin görev aldığına işaret etmektedir. CCCP uygulaması yapılan hücrelerde ise HSP10 ve HSP60 ifadenmesi azalmıştır. Bir protonofor olan CCCP uygulaması ile mitokondriyon morfolojisinin bozulmasına bağlı olarak; mitokondriyal membranda meydana gelen hasarlı bölgenin mitofaji ile ortadan kaldırılabileceğini düşündürmektedir.
- Seçici otofajide birlikte görev alan OPTN, HACE1 ve TBK1 proteinlerini kodlayan genlerin PA uygulanan grupta özellikle 12. saatte ifadenme artışı tespit edilmiştir. CCCP uygulanan grupta ise söz konusu genlerin ifadenme artışı 24. saate meydana gelmiştir. Bu da CCCP uygulamasına seçici otofajinin deney koşullarımızda daha geç devreye girdiğini işaret etmektedir. Farklı streslere karşı verilen seçici otofaji cevabı aynı olsa da bu cevapların farklı saatlerde devreye girmesi, regülasyonlarının farklı olduğunu düşündürmektedir.
- Otofagozom oluşumunda görev alan p62 ve LC3-II genlerinin ifadenmeleri ise PA uygulanan grupta 6. saatten başlayıp 12. saatte en fazla kat artışı göstermiştir. CCCP grubunda ise 2. saatte başlayıp 24. saate kadar devam

etmiştir. Bu durum farklı strese verilen yanıtın da sürelerinin farklı olduğuna işaret etmektedir.

- PINK1-Parkin bağımlı mitofajide görev yapan Parkin proteinini kodlayan PARK2 geni ifadenmesi ise PA uygulamasında tüm saatlerde artış gözlenmiş ancak en belirgin artış 24. saatte 15 kat tespit edilmiştir. CCCP uygulanan grupta ise 1. ve 48. saatlerde kat artışı gözlenmiştir. Ancak 24. saatte gen ifadenmesi saptanamamıştır. Bu durum PARK2 geninin ifadenmesinin hızlıca yıkılabileceğini düşündürmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol* [Internet]. 2018;68(2):280–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.014>
2. Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2015;15(5):8713–42.
3. Yang L, Wei J, Sheng F, Li P. Attenuation of Palmitic Acid–Induced Lipotoxicity by Chlorogenic Acid through Activation of SIRT1 in Hepatocytes. *Mol Nutr Food Res*. 2019;1801432:1–12.
4. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2016;27(2):105–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276015002362>
5. Bohovych I, Chan SSL, Khalimonchuk O. Mitochondrial Protein Quality Control: The Mechanisms Guarding Mitochondrial Health. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2015;22(12):977–94. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2014.6199>
6. Pickles S, Vigie P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol* [Internet]. 2018;28(4):R170–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096098221830006X>
7. Kornmann B. Quality control in mitochondria: use it, break it, fix it, trash it. *F1000Prime Rep* [Internet]. 2014;6(March):1–6. Available from: <http://www.f1000.com/prime/reports/b/6/15>
8. Zemirli N, Morel E, Molino D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018;19(2):564. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/2/564>
9. No Title [Internet]. Available from: <https://teachmephysiology.com/basics/cell-structures/mitochondria/>
10. Mitokondri; Biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Derg*. 2014;12(5):1–13.
11. Bragoszewski P, Turek M, Chacinska A. Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin–proteasome system. *Open Biol* [Internet]. 2017;7(4):170007. Available from: <http://rsob.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rsob.170007>
12. Melber A, Haynes CM. UPR mt regulation and output: A stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res* [Internet]. 2018;28(3):281–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2018.16>

13. Dudek J, Rehling P, van der Laan M. Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2013;1833(2):274–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.028>
14. Pfanner N. Mitochondrial biogenesis: The Tom and Tim machine. *Curr Biol* [Internet]. 1997;7(2):R100–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982206000480>
15. Baker MJ, Palmer CS, Stojanovski D. Mitochondrial protein quality control in health and disease. *Br J Pharmacol*. 2014;171(8):1870–89.
16. Liebl MP, Hoppe T. It's all about talking: two-way communication between proteasomal and lysosomal degradation pathways via ubiquitin. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2016;311(2):C166–78. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpcell.00074.2016>
17. Koyano F, Matsuda N. Molecular mechanisms underlying PINK1 and Parkin catalyzed ubiquitylation of substrates on damaged mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2015;1853(10):2791–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.009>
18. Zungu M, Schisler JC, Essop MF, McCudden C, Patterson C, Willis MS. Regulation of AMPK by the ubiquitin proteasome system. *Am J Pathol* [Internet]. 2011;178(1):4–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.030>
19. Rodolfo C, Campello S, Cecconi F. Mitophagy in neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* [Internet]. 2018;117:156–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.08.004>
20. Jansen AHP, Reits EAJ, Hol EM. The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2014;7(August):1–14. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2014.00073/abstract>
21. Corn PG. Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma. *BMC Biochem*. 2007;8(SUPPL. 1):1–10.
22. Sugiura A, McLelland G-L, Fon EA, McBride HM. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J* [Internet]. 2014;33(19):2142–56. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.15252/emboj.201488104>
23. Cadete VJJ, Deschênes S, Cuillerier A, Brisebois F, Sugiura A, Vincent A, et al. Formation of mitochondrial-derived vesicles is an active and physiologically relevant mitochondrial quality control process in the cardiac system. *J Physiol*. 2016;594(18):5343–62.

24. Bozi LHM, Bechara LRG, dos Santos AF, Campos JC. Mitochondrial-derived vesicles: a new player in cardiac mitochondrial quality control. *J Physiol*. 2016;594(21):6077–8.
25. Roberts RF, Tang MY, Fon EA, Durcan TM. Defending the mitochondria: The pathways of mitophagy and mitochondrial-derived vesicles. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2016;79:427–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.020>
26. Yu B, Pekurnaz G. Mechanisms Orchestrating Mitochondrial Dynamics for Energy Homeostasis. *J Mol Biol* [Internet]. 2018;#pagerange#. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.027>
27. Covill-Cooke C, Howden JH, Birsa N, Kittler JT. Ubiquitination at the mitochondria in neuronal health and disease. *Neurochem Int* [Internet]. 2018;117:55–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.07.003>
28. Truban D, Hou X, Caulfield TR, Fiesel FC, Springer W. PINK1, Parkin, and Mitochondrial Quality Control: What can we Learn about Parkinson's Disease Pathobiology? *J Parkinsons Dis*. 2017;7(1):13–29.
29. Williams JA, Ding W. Mitophagy , mitochondrial spheroids , and mitochondrial-derived vesicles in alcohol-induced liver injury. 2015;66160:66160.
30. Zhang T, Ye Y. Doa1 is a MAD adaptor for Cdc48. *J Cell Biol*. 2016;213(1):7–9.
31. Wu X, Li L, Jiang H. Doa1 targets ubiquitinated substrates for mitochondria-associated degradation. *J Cell Biol*. 2016;213(1):49–63.
32. Chatenay-Lapointe M, Shadel GS. Stressed-out mitochondria get MAD. *Cell Metab* [Internet]. 2010;12(6):559–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.11.018>
33. Taylor EB, Rutter J. Mitochondrial quality control by the ubiquitin–proteasome system. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2011;39(5):1509–13. Available from: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0391509>
34. Braun RJ, Westermann B. With the Help of MOM: Mitochondrial Contributions to Cellular Quality Control. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2017;27(6):441–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.02.007>
35. Karbowski M, Youle RJ. Regulating mitochondrial outer membrane proteins by ubiquitination and proteasomal degradation. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2011;23(4):476–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2011.05.007>

36. Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* [Internet]. 2015;4:6–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.11.006>
37. Anzell AR, Maizy R, Przyklenk K, Sanderson TH. Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol*. 2017;1–18.
38. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* [Internet]. 2018;62(3):341–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30030364>
39. Dorn GW. Evolving Concepts of Mitochondrial Dynamics. *Annu Rev Physiol*. 2019;81(1):1–17.
40. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*. 2016;212(4):379–87.
41. Marchi S, Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2014;1837(4):461–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.015>
42. Richter V, Singh AP, Kiviansakul M, Ryan MT, Osellame LD. Splitting up the powerhouse: Structural insights into the mechanism of mitochondrial fission. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(19):3695–707.
43. Kiriya Y, Nochi H. Intra- and Intercellular Quality Control Mechanisms. 2017;(Figure 1):1–11.
44. M.V. A, N. F. Dominant optic atrophy, OPA1, and mitochondrial quality control: Understanding mitochondrial network dynamics. *Mol Neurodegener*. 2013;8(1).
45. Yoshii SR, Mizushima N. Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2015;1853(10):2797–801.
46. Shi R, Guberman M, Kirshenbaum LA. Mitochondrial quality control : The role of mitophagy in aging. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2017;1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2017.11.008>
47. Wei Y, Liu M, Li X, Liu J, Li H. Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. 2018;2018.
48. Bialik S, Dasari SK, Kimchi A. Autophagy-dependent cell death – where, how and why a cell eats itself to death. *J Cell Sci* [Internet]. 2018;131(18):jcs215152. Available from: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.215152>
49. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(3):142–50.

50. Springer MZ, Macleod KF. In Brief: Mitophagy: mechanisms and role in human disease. *J Pathol* [Internet]. 2016;240(3):253–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.4774>
51. Melser S, Lavie J, Bénard G. Mitochondrial degradation and energy metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2018 Nov 19];1853(10):2812–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488915001561?via%3Dihub>
52. Stotland A, Gottlieb RA. Mitochondrial quality control: Easy come, easy go. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2018 Nov 19];1853(10):2802–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488915000105?via%3Dihub>
53. Sekine S, Youle RJ. PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC Biol*. 2018;16(1):1–12.
54. Eiyama A, Okamoto K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2018 Nov 24];33:95–101. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067415000046?via%3Dihub>
55. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* [Internet]. 2013;20(1):31–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.81>
56. Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends in Cell Biology*. 2016.
57. Winklhofer KF. Parkin and mitochondrial quality control: Toward assembling the puzzle. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2014;24(6):332–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.01.001>
58. Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2016;26(10):733–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.008>
59. Chu CT. Multiple pathways for mitophagy: A neurodegenerative conundrum for Parkinson's disease. *Neurosci Lett* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.004>
60. Lim GG, Lim K. Parkin-independent mitophagy—FKBP8 takes the stage. *EMBO Rep* [Internet]. 2017;18(6):864–5. Available from: <http://embor.embopress.org/lookup/doi/10.15252/embr.201744313>

61. Bhujabal Z, Birgisdottir ÅB, Sjøttem E, Brenne HB, Øvervatn A, Habisov S, et al. FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep* [Internet]. 2017;18(6):947–61. Available from: <http://embor.embopress.org/lookup/doi/10.15252/embr.201643147>
62. Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2012;14(2):177–85.
63. Villa E, Marchetti S, Ricci JE. No Parkin Zone: Mitophagy without Parkin. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2018;28(11):882–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.07.004>
64. Chu CT. Mechanisms of selective autophagy and mitophagy: Implications for neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2019;122(July 2018):23–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.015>
65. Praharaj PP, Naik PP, Panigrahi DP, Bhol CS, Mahapatra KK, Patra S, et al. Intricate role of mitochondrial lipid in mitophagy and mitochondrial apoptosis: its implication in cancer therapeutics. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(9):1641–52. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2990-x>
66. Deng Z, Purtell K, Lachance V, Wold MS, Chen S, Yue Z. Autophagy Receptors and Neurodegenerative Diseases. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2017;27(7):491–504. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.01.001>
67. Kim BW, Kwon DH, Song HK. Structure biology of selective autophagy receptors. *BMB Rep*. 2016;49(2):73–80.
68. Wong YC, Holzbaur ELF. Temporal dynamics of PARK2/parkin and OPTN/optineurin recruitment during the mitophagy of damaged mitochondria. *Autophagy* [Internet]. 2015;11(2):422–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801386>
69. Lippai M, Low P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int*. 2014;2014(June).
70. Xu Z, Yang L, Xu S, Zhang Z, Cao Y. The receptor proteins: Pivotal roles in selective autophagy. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015;47(8):571–80.
71. Ryan TA, Tumbarello DA. Optineurin: A coordinator of membrane-associated cargo trafficking and autophagy. *Front Immunol*. 2018;9(MAY):1–16.
72. Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem*. 2017;61(6):609–24.

73. Narendra DP, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*. 2010;6(8):1090–106.
74. Ying H, Sciences V. Optineurin : the Autophagy Connection. 2017;144:73–80.
75. Tschurtschenthaler M, Adolph TE. The selective autophagy receptor optineurin in Crohn's disease. *Front Immunol*. 2018;9(APR).
76. Weil R, Laplantine E, Génin P. Regulation of TBK1 activity by Optineurin contributes to cell cycle-dependent expression of the interferon pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2016;29:23–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.03.001>
77. Ying H, Yue BYJT. Cellular and Molecular Biology of Optineurin. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;294:223–58.
78. Slowicka K, van Loo G. Optineurin functions for optimal immunity. *Front Immunol*. 2018;9(APR):1–6.
79. Weil R, Laplantine E, Curic S, Génin P. Role of optineurin in the mitochondrial dysfunction: Potential implications in neurodegenerative diseases and cancer. *Front Immunol*. 2018;9(JUN).
80. Li F, Xie X, Wang Y, Liu J, Cheng X, Guo Y, et al. Structural insights into the interaction and disease mechanism of neurodegenerative disease-associated optineurin and TBK1 proteins. *Nat Commun*. 2016;7.
81. Li F, Xu D, Wang Y, Zhou Z, Liu J, Hu S, et al. Structural insights into the ubiquitin recognition by OPTN (optineurin) and its regulation by TBK1-mediated phosphorylation. *Autophagy* [Internet]. 2018;14(1):66–79. Available from: <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1391970>
82. Richter B, Sliter DA, Herhaus L, Stolz A, Wang C, Beli P, et al. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016;113(15):4039–44. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1523926113>
83. Wong YC, Holzbaur EL. Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014;111(42):E4439–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25294927>
84. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* [Internet]. 2018;155(2):282–302.e8. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.031>

85. Chen L, Tang Z, Wang X, Ma H, Shan D, Cui S. PKM2 aggravates palmitate-induced insulin resistance in HepG2 cells via STAT3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;492(1):109–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.025>
86. Sharma L, Lone NA, Knott RM, Hassan A, Abdullah T. Trigonelline prevents high cholesterol and high fat diet induced hepatic lipid accumulation and lipotoxicity in C57BL/6J mice, via restoration of hepatic autophagy. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2018;121(September):283–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.011>
87. Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2018;29(3):178–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>
88. Pardo V, González-Rodríguez Á, Muntané J, Kozma SC, Valverde ÁM. Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food Chem Toxicol*. 2015;80:298–309.
89. Chen X, Li L, Liu X, Luo R, Liao G, Li L, et al. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci* [Internet]. 2018;203(1):291–304. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.022>
90. Ogawa Y, Imajo K, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Kato S, et al. Palmitate-induced lipotoxicity is crucial for the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in cooperation with gut-derived endotoxin. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-29735-6>
91. Mei S, Ni H-M, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, et al. Differential Roles of Unsaturated and Saturated Fatty Acids on Autophagy and Apoptosis in Hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(2):487–98.
92. Carta G, Murru E, Banni S, Manca C. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. 2017;8(November):1–14.
93. Nissar AU, Sharma L, Tasduq SA. Palmitic acid induced lipotoxicity is associated with altered lipid metabolism, enhanced CYP450 2E1 and intracellular calcium mediated ER stress in human hepatoma cells. *Toxicol Res (Camb)*. 2015;4(5):1344–58.
94. Kane MS, Paris A, Codron P, Cassereau J, Procaccio V, Lenaers G, et al. Current mechanistic insights into the CCCP-induced cell survival response. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2018;148:100–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.018>

95. Lombardo T, Folgar MG, Salaverry L, Rey-Roldán E, Alvarez EM, Carreras MC, et al. Regulated Cell Death of Lymphoma Cells after Graded Mitochondrial Damage is Differentially Affected by Drugs Targeting Cell Stress Responses. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;
96. Park YS, Choi SE, Koh HC. PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction. *Toxicol Lett* [Internet]. 2018;284(August 2017):120–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.004>
97. Kwon KY, Viollet B, Yoo OJ. CCCP induces autophagy in an AMPK-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2011;416(3–4):343–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.038>
98. Kwon D, Park E, Sesaki H, Kang SJ. Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) suppresses STING-mediated DNA sensing pathway through inducing mitochondrial fission. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;493(1):737–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.121>
99. Li XN, Song J, Zhang L, LeMaire SA, Hou X, Zhang C, et al. Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes*. 2009;58(10):2246–57.
100. Cho HK, Lee J young, Jang YM, Kwon YH. Involvement of endoplasmic reticulum stress in palmitate-Induced apoptosis in HepG2 cells. *Toxicol Res*. 2008;24(2):129–35.
101. Karaskov E, Scott C, Zhang L, Teodoro T, Ravazzola M, Volchuk A. Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic β -cell apoptosis. *Endocrinology*. 2006;147(7):3398–407.
102. Ishii M, Maeda A, Tani S, Akagawa M. Palmitate induces insulin resistance in human HepG2 hepatocytes by enhancing ubiquitination and proteasomal degradation of key insulin signaling molecules. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2015;566:26–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.009>
103. Tu QQ, Zheng RY, Li J, Hu L, Chang YX, Li L, et al. Palmitic acid induces autophagy in hepatocytes via JNK2 activation. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2014;35(4):504–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2013.170>
104. Moeller TA, Worzella T, Larson B, Vitro I, Baltimore T, Madison P, et al. A Multiplex , Automated Approach to Screen for Mitotoxicity in Human Hepatocytes and HepG2 Cells. 2:3.

105. García-Ruiz I, Solís-Muñoz P, Fernández-Moreira D, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. In vitro treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis. *DMM Dis Model Mech*. 2015;8(2):183–91.
106. Cang X, Wang X, Liu P, Wu X, Yan J, Chen J, et al. PINK1 alleviates palmitate induced insulin resistance in HepG2 cells by suppressing ROS mediated MAPK pathways. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2016;478(1):431–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.004>
107. Georgakopoulos ND, Wells G, Campanella M. The pharmacological regulation of cellular mitophagy. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2017;13(2):136–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2287>
108. Shpilka T, Haynes CM. The mitochondrial UPR: Mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018;19(2):109–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.110>
109. Qureshi MA, Haynes CM, Pellegrino MW. The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse. *J Biol Chem*. 2017;292(33):13500–6.
110. Achard CS, Laybutt DR. Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in liver cells results in two distinct outcomes: Adaptation with enhanced insulin signaling or insulin resistance. *Endocrinology*. 2012;153(5):2164–77.
111. Shinjo S, Jiang S, Nameta M, Suzuki T, Kanai M, Nomura Y, et al. Disruption of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) plays a central role in palmitic acid-induced insulin resistance. *Exp Cell Res* [Internet]. 2017;359(1):86–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.006>
112. Naresh NU, Haynes CM. Signaling and Regulation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019;11(6):1–18.
113. Zhao Q, Wang J, Levichkin I V., Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J*. 2002;21(17):4411–9.
114. Soutar MPM, Kempthorne L, Annuario E, Luft C, Ketteler R, Ludtmann MHR, et al. FBS / BSA media concentration determines CCCP ' s ability to depolarize mitochondria and activate PINK1-PRKN mitophagy and activate PINK1-PRKN mitophagy. *Autophagy* [Internet]. 2019;0(0):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1603549>
115. Moore AS, Holzbaur ELF. Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(24):E3349–58.

116. Chernyshova K, Inoue K, Yamashita S-I, Fukuchi T, Kanki T. Glaucoma-associated mutations in the optineurin gene have limited impact on Parkin-dependent mitophagy. *Revis Submitt.* 2019;
117. Liu Z, Chen P, Gao H, Gu Y, Yang J, Peng H, et al. Ubiquitylation of Autophagy Receptor Optineurin by HACE1 Activates Selective Autophagy for Tumor Suppression. *Cancer Cell* [Internet]. 2014 Jul;26(1):106–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610814002232>
118. Yu Z, Li Y, Han T, Liu Z. Demethylation of the HACE1 gene promoter inhibits the proliferation of human liver cancer cells. *Oncol Lett.* 2019;17(5):4361–8.
119. Bansal M, Moharir SC, Sailasree SP, Sirohi K, Sudhakar C, Sarathi DP, et al. Optineurin promotes autophagosome formation by recruiting the autophagy-related Atg12-5-16L1 complex to phagophores containing the Wipi2 protein. *J Biol Chem.* 2018;293(1):132–47.
120. Zheng YY, Wang M, Shu XB, Zheng PY, Ji G. Autophagy activation by jiang zhi granule protects against metabolic stress-induced hepatocyte injury. *World J Gastroenterol.* 2018;24(9):992–1003.
121. Cheng C, Deng X, Xu K. Increased expression of sterol regulatory element binding protein-2 alleviates autophagic dysfunction in NAFLD. *Int J Mol Med.* 2018;41(4):1877–86.
122. Meng XH, Chen B, Zhang JP. Intracellular insulin and impaired autophagy in a zebrafish model and a cell model of type 2 diabetes. *Int J Biol Sci.* 2017;13(8):985–95.
123. Corsa CAS, Pearson GL, Renberg A, Askar MM, Vozheiko T, MacDougald OA, et al. The E3 ubiquitin ligase parkin is dispensable for metabolic homeostasis in murine pancreatic β cells and adipocytes. *J Biol Chem.* 2019;294(18):7296–307.
124. Wu W, Xu H, Wang Z, Mao Y, Yuan Y, Luo W, et al. PINK1-parkin-mediated mitophagy protects mitochondrial integrity and prevents metabolic stress-induced endothelial injury. *PLoS One.* 2015;10(7):1–14.
125. Song YM, Lee WK, Lee YH, Kang ES, Cha BS, Lee BW. Metformin restores parkin-mediated mitophagy, suppressed by cytosolic p53. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):1–14.