

Obezitede Ras ile ilişkili nükleer protein geni anlatımının adipogenez ile ilişkisinin araştırılması

Investigation of Ras-related nuclear protein gene expression in obesity in relation with adipogenesis

Sinem Banu Demir,¹ Meliha Koldemir Gündüz,¹ Mehtap Çevik,¹
Çavlan Çiftçi,² Belgin Süsleyici¹

¹Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
²İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Ras ile ilişkili nükleer protein (RAN)'in; farklı gelişim evrelerindeki adipositlere, farklı dozlarda uygulanacak olan oksidatif stres faktörlerine (stearik asit, linoleik asit, etanol ve hidrojen peroksit) karşı yanıt olarak gen anlatımının ne yönde değişim göstereceği ile birlikte hücrelerin proliferasyon yeteneklerine olan etkileri araştırıldı.

Gereç ve yöntemler: Çalışmada RAN geninin obezitedeki rolünü belirlemek amacıyla fare kökenli 3T3-L1 fibroblast hücreleri, iCELLigence sistemi ile gerçek zamanlı olarak gözlemlenerek, preadiposit ve olgun adipositlere farklılaştırıldı. Bu hücreler farklı konsantrasyonlarda sitotoksik ajanlara maruz bırakıldı ve hücre proliferasyonları yine iCELLigence sistemi ile izlendi. Elde edilen hücrelerden haberci RNA izolasyonu, haberci RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi ve elde edilen genetik materyalde sitotoksik ajanlara yanıt olarak, RAN geninin ekspresyonundaki değişimler TaqMan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile tespit edildi.

Bulgular: Oksidatif stres ajanlarının uygulama süreleri, gerçek zamanlı hücre monitörizasyonu ile çeşitli konsantrasyonların uygulanması sonrası IC50 değeri elde edilerek saptandı. 24 saat hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulaması sonucu IC50 değeri 807 µM olarak saptandı. 24 saat 1 mM H₂O₂ uygulaması 3T3-L1 adiposit hücrelerinde letal etkiye sahipken 50-250 µM konsantrasyon aralığındaki H₂O₂ uygulamalarının adiposit proliferasyonunun üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlendi. RAN gen anlatımı dört ve beş saat 600 µM H₂O₂ uygulaması sonrası artarken; stearik asit, etanol ve 24 saat H₂O₂ uygulaması sonrası azaldı. Linoleik asit uygulaması sonucunda ise RAN geni ekspresyonu tamamen susturuldu.

Sonuç: 600 µM H₂O₂'ye dört saat maruz kalan adipositlerde RAN geni anlatımı kontrol hücrelere kıyasla iki kat artarken, aynı dozda beş saat muamelenin gen anlatımını altı kata yakın artırdığının gözlenmesi farklılaşmış adiposit hücrelerinde glikoz homeostazının bozulduğunu düşündürmektedir. Etanolün RAN geni ifadesini azaltmasının ise insülin direncinin artmasına katkıda bulunduğu düşüncesindedir.

Anahtar sözcükler: Adiposit; gen ekspresyonu; iCELLigence; obezite; Ras ile ilişkili nükleer protein.

ABSTRACT

Objectives: This study aims to investigate how the gene expression of Ras-related nuclear protein (RAN) will change as a response to the adipocytes in different stages of development, oxidative stress markers (stearic acid, linoleic acid, ethanol and hydrogen peroxide) to be applied in different dosages and also its effects on the proliferation ability of cells.

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

Results: Implementation periods of oxidative stress markers were found to be IC50 value by using real-time cell monitoring, which was obtained by applying various concentrations. After 24 hours application of hydrogen peroxide (H₂O₂), IC50 value was found as 807 µM. While 24 hours application of 1 mM H₂O₂ had lethal effect on adipocytes 3T3-L1 cells, we did not observe any significant effect of H₂O₂ applications in the concentration range of 50-250 µM on proliferation of adipocytes. While RAN gene expression increased after four and five hours of exposure to 600 µM H₂O₂ application, it decreased after application of stearic acid, ethanol and 24 hours of H₂O₂. As a result of application of linoleic acid, RAN gene expression was completely silenced.

Conclusion: The observation of RAN gene expression having increased twice in adipocytes that were exposed to 600 µM H₂O₂ for four hours compared to control cells while five hours of exposure to the same dosage to increase nearly six times suggests the deterioration of glucose homeostasis in differentiated adipocyte cells. We think the fact of ethanol decreasing RAN gene expression contributes to the increase of insulin resistance.

Keywords: Adipocytes; gene expression; iCELLigence; obesity; Ras-related nuclear protein.

Geliş tarihi: 12 Mayıs 2016 **Kabul tarihi:** 29 Temmuz 2016

İletişim adresi: Dr. Belgin Süsleyici, Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, 34722 Kadıköy, İstanbul, Türkiye.
Tel: 0216 - 346 45 53 e-posta: belgin.susleyici@marmara.edu.tr

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

Obezite; beyaz adipoz dokusunun (BAD) aşırı derecede genişlemesi ve büyümesi ile açıklanan epidemik boyutlara ulaşan bir hastalıktır. Obezite, BAD'deki adipositlerin hipertrofisi ve hiperplazisi ile gelişir. Gelişme gösteren BAD'nin geliştiği yeri ve hücrel mekanizması obezite patolojisini büyük ölçüde etkiler. Beyaz adipoz dokusu vücutta farklı alanlarda bulunabileceği gibi çoğunlukla derialtı dokularda iç organların çevresinde konumlanır.^[2] İnsanlarda derialtı dokularda BAD birikimi ve abdominal, derin iç organların çevresinde BAD yerleşimi ile diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve ölüm oranı artar.^[3]

Obeziteye neden olarak görülen bazı faktörler; patolojik olarak regülasyon bozukluğu, psikojenik kaynaklı obezite, nörojenik bozukluklara bağlı obezite ve genetik kaynaklı obezite olarak dört grupta tanımlanmıştır.^[4]

Obezitenin genetiği ile ilgili çalışmalar genellikle ikizler üzerinde yapılmış ve VKİ'nin genetik geçişle aktarılabileceği düşünülmüştür.^[5,6]

Adipoz doku, adiposit adı verilen ve %95'i yağ damlacığıyla kaplı hücrelerce oluşturulan bir dokudur. Diğer organlardan farklı olarak, vücut boyunca dağılım gösteren adipoz doku oldukça dinamikdir. Vücut yerleşimlerine göre adipoz doku hücrelerinin gen ifadenme kalıplarında küçük farklılıklar görülebilir. Yağ dokusu sadece yağ depolamadan sorumlu olmayıp aynı zamanda polipeptidik sitokinler ve hormon benzeri moleküller salgılamaya yeteneğine sahip hücrelerden oluşan organize bir endokrin dokudur.^[7]

Adipoz dokunun salgıları arasında leptin, adiponektin, rezistin, visfatin, insülin benzeri büyüme

faktörü (IGF)-7, Nükleer faktör kappa-beta (NF- κ β) gibi biyomoleküller gösterilebilir.^[8-10]

Ras-ilişkili nükleer protein (RAN) veya GTP-bağlayıcı nükleer protein olarak bilinen protein RAN geni tarafından kodlanır. Ras üst familyasının bir üyesi olan bu protein 25 kDa moleküler ağırlığı gösteren küçük bir proteindir.^[11,12]

RAN proteini RNA ve proteinlerin translokasyonunda bu moleküllerin, nükleer porlardan geçirilmesinde büyük rol oynar. Çekirdek-sitozol arasında makromoleküllerin geçişinde rol alan mikrotübül ağının organizasyonunu ve formasyonunu ayarlar.^[13,14] Guanozin trifosfat (GTP) veya guanozin difosfat (GDP)'ye bağlanarak çekirdek zarından molekül geçişine aracılık eder.

İnterfaz esnasında çekirdek ve sitoplazma arasındaki orantsız Ran-GTP ve Ran-GDP dağılımını nükleer RCC1 (guanin-nucleotide exchange factor for Ran)^[15] ve sitoplazmik RanGTPaz aktive proteininin (RanGAP)^[16] Ran-bağlayıcı proteinlere (RanBP1 ve RanBP2) bağlanmasıyla düzenler.^[17,18]

RAN proteini aynı zamanda DNA sentezinin kontrolünde ve mitotik hücre döngüsünün işleyişinde görev görür.^[19]

RAN mitoz esnasında, mikrotübül polimerizasyonunda moleküllerin düzenlenmesi sinyalizasyonunun anahtarı olabilir. RCC1 kromatin etrafında yüksek konsantrasyonlu RAN-GTP üretir. Bu da çekirdeğin mikrotübüllerini indükler.^[20]

İmportin α/β heterodimeri ve GTPaz RAN nükleer protein taşınımında anahtar rol oynar. İmportin nükleer lokalizasyon sinyaline (NLS) bağlanır. Digitonin permeabiliteli hücrelerin çekirdeklerine sitosol veya sitosolik fraksiyonların eklenmesiyle yapılan çalışmada protein taşınımıyla ilişkili dört adet gen yapısı tanımlanmıştır: GTPaz Ran/TC4, importin- α , importin- β ve pp15. Ayrıca importin, karyoferin; pp15 ise NTF2 veya p10 olarak da bilinir.^[21,22]

RAN'ın birçok işlevinin yanında diğer proteinlerle interaksiyona giriyor olması nedeniyle RAN'da oluşacak bir mutasyon DNA sentezini sekteye uğratar. RAN mitoz esnasında hücre döngüsüne katılır ve kromozomlar ayrıldıktan sonra tekrar çekirdek oluşumunda rol alır. Profaz esnasında nükleer porlardaki Ran-GDP ve Ran-GTP oranı azalarak nükleer zar, akıcı

ve kararsız bir hale dönüşür. Ran-GTP konsantrasyonu kromozomların etrafında RCC1 indüklenmiş halde yüksek oranda bulunur. RanBP2 (Nup358) ve RanGAP kromozomların iç iplikleri ile başlanmalarını kolaylaştırmak için kinetokorlara giderler. Ayrıca Ran-GTP; NuMA ve TPX2 gibi inhibe edilmiş faktörlerin importinlere başlanmasını sağlar. İmporinlerin salınmasıyla Ran-GTP bu faktörleri aktive eder ve mitotik döngüye katılan moleküllere tutunmalarını sağlar. Telofazda ise Ran-GTP hidrolizi ve nükleotid değişimi yeni oluşan hücre tarafından hücre gelişiminde kullanılır.^[23]

RAN çeşitli uzunluklardaki poliglutamini androjen reseptörüne (AR) başlayan androjen reseptörü koaktivatörüdür (ARA24). Poliglutaminin AR'de yayılma tekrarı, Bulber-spinal kas atrofisi (Kennedy hastalığı) ile ilişkilendirilmiştir. RAN'ın androjen reseptörüne koaktivasyonun, poliglutaminin AR'de yayılımını azaltır. Bu durumda zayıf koaktivasyon, spinal ve bulbar kas gelişimi atrofisi ile kısmi adrojen hassasiyetine neden olabilir.^[24]

Metabolik sendromun birçok komponenti özellikle obezite ve diyabet bazı kanser tiplerinin gelişiminde rol alır.^[25,26] Obezitenin endoplazmik retikulum (ER) stresini uyardığı ve ER stresinin de özellikle obezite, tip 2 diyabet ve insülin direnci arasında anahtar rol oynadığı bilinse de^[27] adipoz dokuda obezitenin uyardığı ER stresine yanıt olarak RAN gen anlatımının ne şekilde gerçekleştiği ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

3T3-L1 Fibroblast Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan 3T3L-1 fibroblast hücre soyu American Type Culture Collection (ATCC) (University Boulevard, Manassas, Virginia, USA) ticari olarak temin edildi ve hücreler -1960 °C'de saklandı. Hücre kültürü çalışmasına başlamadan önce DMEM medyumuna + %10 FBS+ penisilin (100 U/mL) ve streptomisin (100 µg/mL) içeren besi yeri steril şartlarda ultraviyole (UV) kabin içerisinde hazırlandı.

3T3-L1 Fibroblast Hücrelerinin Adiposit Hücrelerine Dönüşümü

3T3-L1 fibroblast hücreleri DMEM medyumuna + %10 FBS içinde %5'lik karbondioksit etüvde 370 °C'de dört gün inkübe edildi. Flaskların

%75'inin hücreler tarafından doldurulması ile hücrelere DMEM-FBS içine 10 µg/mL insülin + 1 µM dexametazone + 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine eklenmiş besi yeri ilave edildi. Farklılaşmanın başlatılması amacıyla inkübasyon üç gün sürdürüldü. Daha sonra ikişer gün aralıklarla DMEM-FBS + 10 µg/mL insülin içeren besi yeri ile hücrelerin üç kez besi yeri yenilemesi yapıldı. Adiposit farklılaşması hücre içi lipid damlacıklarının birikimi ile saptandı.

Adipositlerin oil red O boyama ile tespiti

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

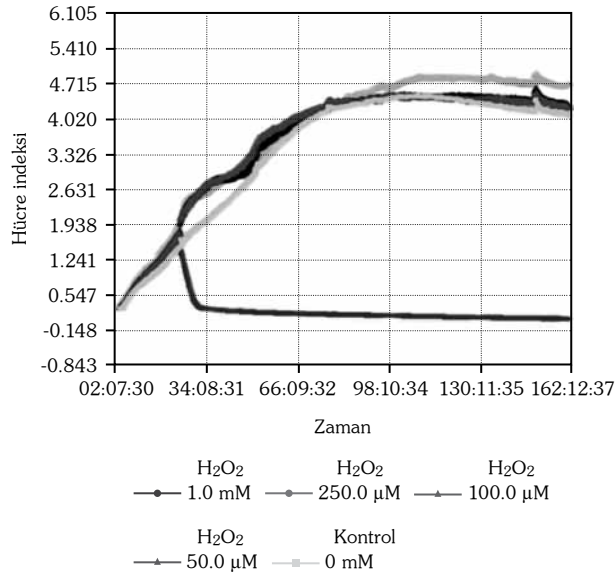
iCELLigence sistemi ile 3T3-L1 adiposit hücre sayısının optimizasyonu

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

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

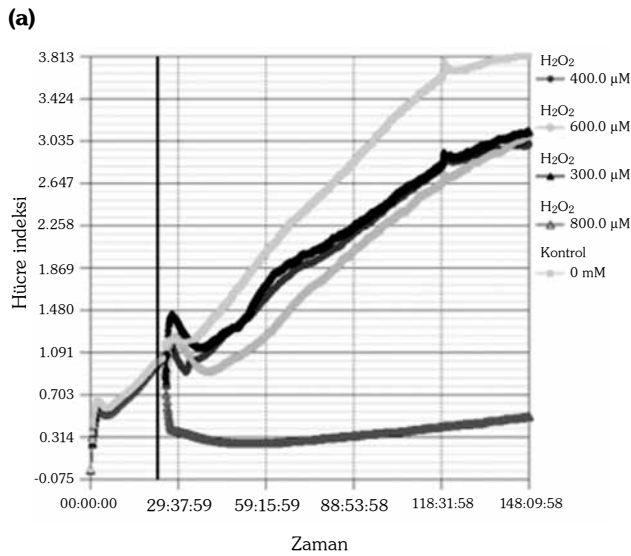
iCELLigence sisteminde 3T3-L1 adiposit hücrelerine madde uygulanması

Hücreler iCELLigence plakalara ekilerek ortama farklı konsantrasyonlarda etanol, hidrojen



Şekil 1. Kontrol hücrelerine (hidrojen peroksit ile muamele edilmemiş hücreler) kıyasla 1 mM H₂O₂ konsantrasyonu letal etki göstermiştir. Kullanılan diğer dozlar hücrelerin yaşamsallığını etkilememiştir.

peroksit (H₂O₂), linoleik asit ve stearik asit eklendi. Farklı dozlarda ajanlara maruz bırakılan hücrelerin yaşam döngüleri belirlenerek maddelerin hangi konsantrasyonda, kaçınıcı saatten itibaren, hangi zaman aralığında etkili olduğu tespit edildi.



Şekil 2. (a) Normalize edilmiş hücre indeksi-zaman grafiği. 1 mM ve 250 µM aralık denendiğinde kullanılan en yüksek doz olan 800 µM'nin tamamen letal etki göstermediğini fakat ciddi bir sitotoksik etki meydana getirdiğini ve 600 µM konsantrasyonunun kontrol hücrelerine kıyasla proliferasyonu 59-118 zaman aralığında inhibe ettiğini görmekteyiz. Bu etki diğer dozlarda da görünmektedir, fakat 300 µM ve 400 µM konsantrasyonlarının etkileri aynıdır. **(b)** H₂O₂ (madde eklendikten sonra) 24. saat IC₅₀ değeri (noktalar kullandığımız konsantrasyon). Yirmi dört saat H₂O₂ uygulaması sonucu IC₅₀ değeri 108 µM olarak saptandı.

Gen anlatım düzeylerinin belirlenmesi

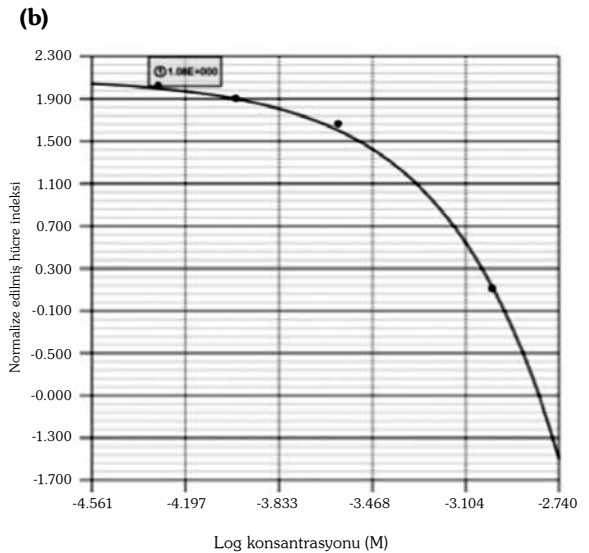
3T3-L1 fibroblastları (preadipositler), adiposit hücre soylarının yer aldığı hücre kültürlerindeki hücrelerden total RNA izole edilerek, izolasyonu yapılan total RNA'dan tamamlayıcı DNA sentez edilerek RAN gen ürününü çoğaltmak amacıyla RT-PCR uygulandı.

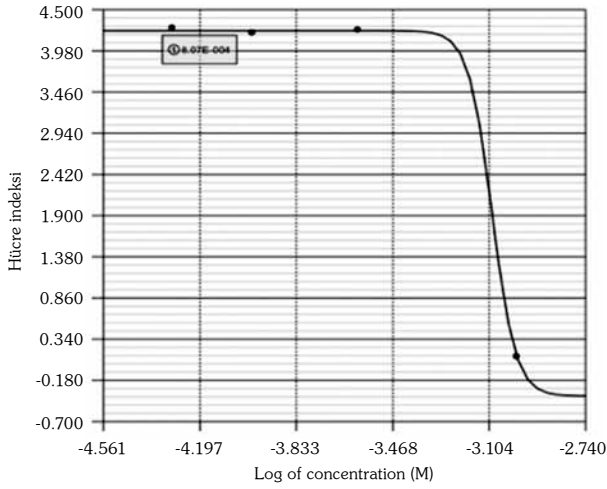
BULGULAR

Oksidatif stres ajanlarının uygulama süreleri, optimizasyon deneyi sonucunda 50000 Cell/well olmasına karar verildi. Yapılan deneyde kontroller tekrarsız çalışıldı. Bu deney analizlerinde hesaplanan IC₅₀ değerleri sigmoidal dose-response (Variable slope) formülü ile hesaplandı. Elli bin adiposit hücre kültürüne alınarak H₂O₂ maddelerinin farklı dozlarının hücre yaşamsallığı üzerindeki etkileri kontrol edildi.

Yirmi dört saat 1 mM H₂O₂ uygulaması 3T3-L1 adiposit hücrelerinde letal etkiye sahipken 50-250 µM konsantrasyon aralığındaki H₂O₂ uygulamalarının adiposit proliferasyonunun üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlendi (Şekil 1).

Sitotoksikite sınır değerini bulabilmek için 1 mM ve 250 mM aralığındaki dozlar denendiğinde kullanılan en yüksek doz olan 800 µM'nin tamamen

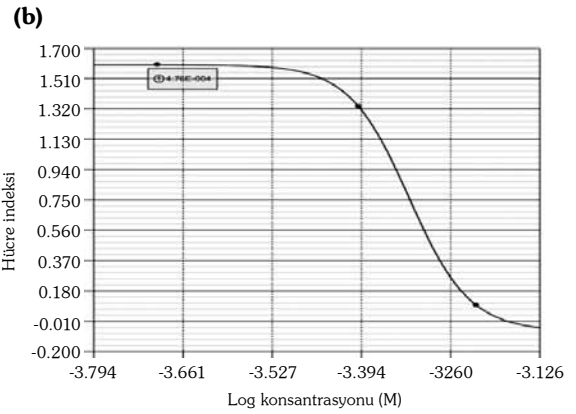
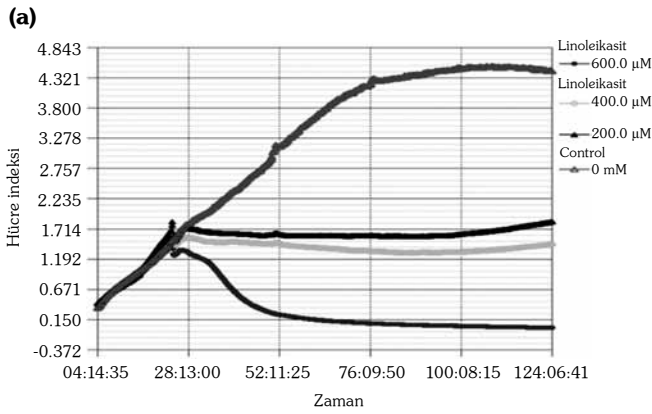




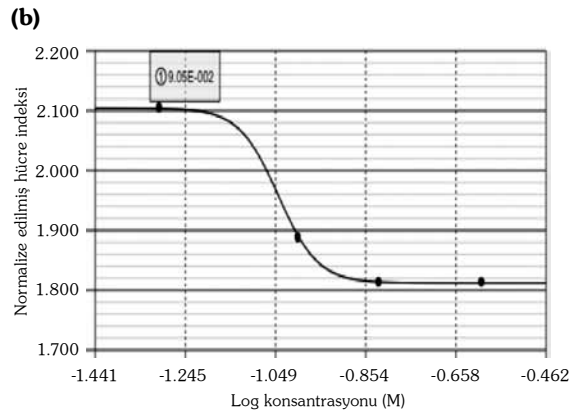
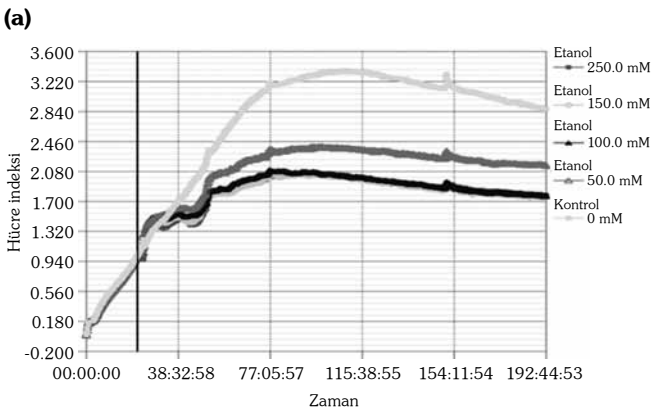
Şekil 3. H₂O₂'nin 48. saat IC₅₀ değeri 807 µM olarak saptandı.

letal etki göstermediğini fakat ciddi bir sitotoksik etki meydana getirdiğini ve 600 mM konsantrasyonunun kontrol hücrelerine kıyasla proliferasyonu 59-118 zaman aralığında inhibe ettiğini görmekteyiz. Bu etki diğer dozlarda da görülmektedir, fakat 300 mM ve 400 mM konsantrasyonlarının etkileri aynıdır (Şekil 2a). Yirmi dört saat H₂O₂ uygulaması sonucu IC₅₀ değeri 108 mM (Şekil 2b), 48 saat uygulaması sonucu ise 807 mM (Şekil 3) olarak saptandı.

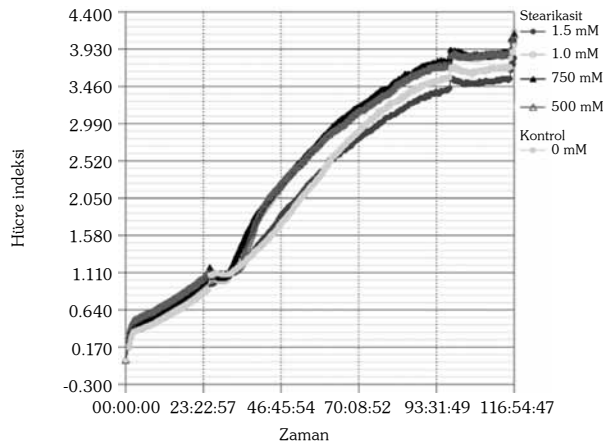
Linoleik asitin 600 mM dozajının hücreler üzerinde letal, 400 ve 200 mM dozajlarının antiproliferatif etki yaptıkları izlenmiştir (Şekil 4a). Kırk sekiz saatlik Linoleik asit uygulamasına ait IC₅₀ değeri 476 mM olarak belirlendi (Şekil 4b).



Şekil 4. (a) Linoleik asit dozlarının, hücreler üzerinde letal etki (600 µM) ve doza bağlı antiproliferatif etkileri (400, 200 µM) görülmekte. **(b)** Linoleik asit dozlarının 48. saat IC₅₀ değeri.



Şekil 5. (a) Etanol konsantrasyonlarının etkisi grafikteki gibi görülmektedir. Fakat bu maddenin etkisi hakkında yorum yapmak anlamlı olmayabilir. Çünkü bu grafikte normalize edilmiş şekli ile dozların proliferasyonu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. **(b)** Etanol dozlarının 48. saat IC₅₀ değeri.



Şekil 6. Kullanılan stearik asit dozları kontrol hücre grubuna kıyasla herhangi bir etki meydana getirmemiştir.

Etanolün hücre proliferasyonu üzerine anlamlı bir etkisi izlenmemiştir (Şekil 5a). Kırk sekiz saatlik uygulaması sonucu IC50 değeri ise 905 mM olarak belirlendi (Şekil 5b).

Stearik asit uygulaması hücre proliferasyonu üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir (Şekil 6).

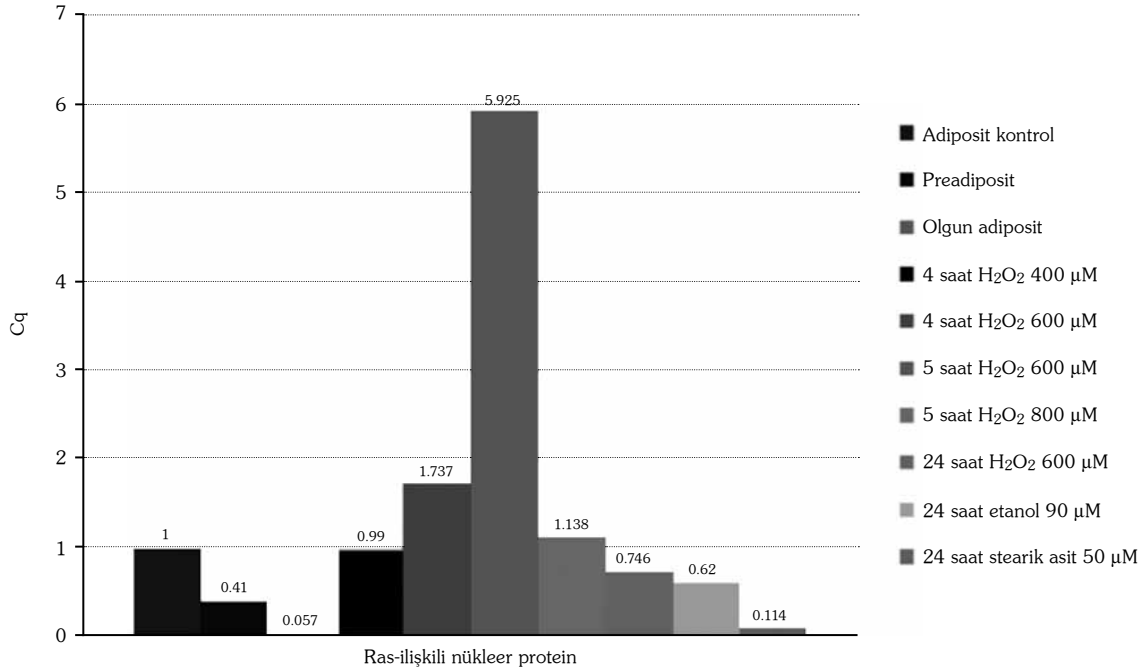
TARTIŞMA

Senesense uğratılmış, adipositlerde (olgun adipositler) RAN gen anlatımının azalması yaşlanmış hücrelerde glikoz homeostazına bağlı insülin direnci gelişmesinin daha az olabileceğini veya insülin direncine karşı hücrenin savunma mekanizmasının yeterince işleyemediğini düşündürmektedir.

Beş saat 600 μM H_2O_2 uygulamasının hücrede glikoz homeostazını bozarak insülin direncini artırdığı ve RAN geni ekspresyonunu yaklaşık altı katına kadar artırarak hücrenin bunu dengelediği düşünüldü.

Dört saat 600 μM ve beş saat 800 μM H_2O_2 uygulanmış hücrelerde RAN ekspresyonunun artmış olması glikoz homeostazının düzenlenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

Yirmi dört saat 600 μM H_2O_2 , 90 mM etanol ve 50 μM stearik asit uygulanması hücrelerde glikoz homeostazını dengeleyici olarak etki ederek RAN gen ekspresyonunun düşmesine neden olmuştur.



Şekil 7. Ras-ilişkili nükleer protein (RAN) gen anlatımı 4 ve 5 saat hidrojen peroksit uygulaması sonrası artarken; stearik asit, etanol ve 24 saat hidrojen peroksit uygulaması sonrası azalmıştır. Linoleik asit deneylerinde üç kez tekrarlanan çalışmalarda RAN geni ekspresyonunun izlenmemiş olması sonucu Linoleik asitin RAN gen anlatımı üzerinde susturucu etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. 600 μM H_2O_2 'e dört saat maruz kalan adipositlerde RAN geni ekspresyonu kontrol hücrelere kıyasla iki kat artarken, aynı dozda beş saat muamelenin ekspresyonu altı kata yakın artırdığı ve farklılaşmış adiposit hücrelerin de etanolün RAN geni ekspresyonunu azalttığı izlenmiştir.

Linoleik asit uygulanmış hücrelerde RAN gen ifadesinin gözlenmemiş olması, farklı deneylerle bu sitotoksik ajanın hangi evrede gen ekspresyonunu susturduğunun ve hangi nedenlerle susturduğunun ortaya konması gerekliliğini oluşturmuştur.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: FEN-C-YLP-080415-0126)

KAYNAKLAR

- World Health Organization (WHO). Erişim adresi: <http://www.who.int/topics/obesity/en/> [Erişim tarihi: 04.01.2016]
- Ozcan U, Yılmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006;313:1137-40.
- Cinti S, Cigolini M, Bosello O, Björntorp P. A morphological study of the adipocyte precursor. *J Submicrosc Cytol* 1984;16:243-51.
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. İstanbul: Nobel Kitapevi; 2001.
- Sengier A. Multifactorial etiology of obesity: nutritional and central aspects. *Rev Med Brux* 2005;26:211-4. [Abstract]
- Wangensteen T, Undlien D, Tonstad S, Retterstøl L. Genetic causes of obesity. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2005;125:3090-3. [Abstract]
- Irigaray P, Newby JA, Lacomme S, Belpomme D. Overweight/obesity and cancer genesis: more than a biological link. *Biomed Pharmacother* 2007;61:665-78.
- Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19:525-46.
- Harvey AE, Lashinger LM, Hursting SD. The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1229:45-52.
- Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006;27:762-78.
- Drivas GT, Shih A, Coutavas E, Rush MG, D'Eustachio P. Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol Cell Biol* 1990;10:1793-8.
- Ren M, Drivas G, D'Eustachio P, Rush MG. Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J Cell Biol* 1993;120:313-23.
- Clarke PR, Zhang C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:464-77.
- Nagai M, Yoneda Y. Small GTPase Ran and Ran-binding proteins. *Biomol Concepts* 2012;3:307-18.
- Bischoff FR, Ponstingl H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 1991;354:80-2.
- Bischoff FR, Krebber H, Kempf T, Hermes I, Ponstingl H. Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1749-53.
- Coutavas E, Ren M, Oppenheim JD, D'Eustachio P, Rush MG. Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature* 1993;366:585-7.
- Yokoyama N, Hayashi N, Seki T, Panté N, Ohba T, Nishii K, et al. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* 1995;376:184-8.
- Sazer S, Dasso M. The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci* 2000;113:1111-8.
- Nemergut ME, Lindsay ME, Brownawell AM, Macara IG. Ran-binding protein 3 links Crm1 to the Ran guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 2002;277:17385-8.
- Moore MS, Blobel G. The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* 1992;69:939-50.
- Moore MS, Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 1993;365:661-3.
- Ye F, Zhang H, Yang YX, Hu HD, Sze SK, Meng W, et al. Comparative proteome analysis of 3T3-L1 adipocyte differentiation using iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *J Cell Biochem* 2011;112:3002-14.
- Kanno Y, Miyazaki Y, Inouye Y. The nuclear import of the constitutive androstane receptor by importin/Ran-GTP systems. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:968-74.
- Rehman AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569-78.
- Cowey S, Hardy RW. The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer? *Am J Pathol* 2006;169:1505-22.
- Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, et al. Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. *Cell Metab* 2009;10:13-26.