

**T.C. ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BIYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**PEDİATRİK OBEZİTEDE MELANOKORTİN 4 RESEPTÖR GENİ, PLAZMINOJEN  
AKTİVATÖR İNHİBİTÖR – 1 GENİ (-675 4G/5G), TÜMÖR  
NEKROZİS FAKTÖR –ALPHA (-308 G/A), YAĞ ASİTİ BAĞLAMA  
PROTEİNİ -87 T/C ve İNTERLÖKİN -6 (-174 G/C) GEN DEĞİŞİMLERİNİN  
ÖNEMİ ve siRNA YAKLASIM İLE FONKSİYON TAYİNİ**

**Uzman Biyolog Fatma Duygu ÖZEL DEMİRALP**

**Danışman  
Prof. Dr. Nejat AKAR**

**EYLÜL-2006  
ANKARA**

Prof. Dr Nejat AKAR danismanliginda, Fatma Duygu ÖZEL DEMIRALP tarafından hazirlanan "PEDIATRİK OBEZİTEDE MELANOKORTİN 4 RESEPTÖR GENİ, PLAZMINOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR – 1 GENİ (-675 4G/5G), TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR –ALPHA (-308 G/A), YAĞ ASİTİ BAĞLAMA PROTEİNİ -87 T/C ve İNTERLEUKİN -6 ( -174 G/C) GEN DEĞİŞİMLERİNİN ÖNEMİ ve siRNA YAKLASIM ile FONKSİYON TAYİNİ" adli tez çalısması ..02.../10/2006 tarihinde asagidaki jüri tarafından Biyoteknoloji Enstitüsü Anabilim Dal'ında Temel Biyoteknoloji Doktora Program tezi olarak kabul edilmiştir.

Baskan : Prof. Dr. Gönül ÖCAL \_\_\_\_\_

Üye : Prof. Dr. Nejat AKAR \_\_\_\_\_

Üye: Prof. Dr. Merih BERBEROGLU \_\_\_\_\_

Üye : Prof. Dr. Ali UYSAL \_\_\_\_\_

Üye : Doç. Dr. Mustaf TEKİN \_\_\_\_\_

Bu tez, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tez yazim kurallarına uygundur, sunumu onaylarım.

**Prf. Dr. Nejat AKAR**

**Enstitü Müdürü**

**PEDIATRİK OBEZİTEDE MELANOKORTIN -4 RESEPTÖR GENİ,  
PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR – 1 GENİ (-675 4G/5G), TÜMÖR  
NEKROZİS FAKTÖR –ALPHA (-308 G/A), YAĞ ASİTİ BAĞLAMA  
PROTEİNİ -87 T/C ve İNTERLÖKİN -6 (-174 G/C) GEN DEĞİŞİMLERİNİN  
ÖNEMİ ve siRNA YAKLASIM ile FONKSİYON TAYİNİ**

**ÖZET**

Obezite ya da halk arasında bilinen adıyla sismanlık, vücutta fazla miktarda yağ birikmesi sonucu ortaya çıkan kronik değişikliklerle karakterize kompleks, multifaktöriyal bir hastalıktır. Obezite, besinlerle alınan enerji miktarının, metabolizma ve fiziksel aktivite ile tüketilen enerji miktarını sağlığı bozacak ölçüde astığı durumda ortaya çıkar ve mutlaka tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır (WHO 2000).

Obezitenin özellikle diabetes mellitus, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon gelişimi ve bazı kanserlerin insidansında artışa yol açtığı kabul edilmektedir. Bunun dışında kalp ve damar sistemi, solunum sistemi, hormonal sistem, sindirim sistemi gibi sistemleri etkileyen ve birçok önemli rahatsızlığa zemin hazırlayan bir hastalıktır. Dolayısıyla obezite, mortalite ve morbitideyi artıran, insan yaşamını kısaltan ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen bir hastalık olarak tanımlanabilir.

Yapılan araştırmalara göre, obezite özellikle son 20 yılda, bütün dünyada süratle artmakta ve bir salgın hastalık gibi yayılmaktadır. Dünyada 315 milyon insanın vücut kitle indeksinin (BMI) 30 kg/m<sup>2</sup> olduğu, 750 milyon insanın ise BMI'nin 25-30 kg/m<sup>2</sup> aralığında olduğu dolayısıyla 1.1. milyar insanın asiri kilolu veya obez olduğu rapor edilmektedir (Caterson-Gill, 2002). Bu salgından ülkemiz de etkilenmektedir. Kadın nüfusumuzun yaklaşık üçte biri, erkek nüfusumuzun da yaklaşık beşte biri obezdir (Satman I, 2001).

Ortaya çıkan hızla artan obezite tablosunda son yıllarda değişen fiziksel aktivite düzeyleri ve sedental yaşam tarzı mutlak etkili olmakla beraber kalıtsal etkenlerin önemi yadsınamaz. Özellikle ikiz ve adoptin çalışmalarında BMI ile genetik etkileşimler 60%-84% 'lere kadar çıkmaktadır. (Maes, Neale et al. 1997).

Tüm bu hayati özelliklerinden dolayı ve multifaktöriyal bir hastalık olarak genetik etkinin yadsınamaz ölçüde önemli olmasından ötürü pediatrik obezitede gen değişimleri bu doktora tez çalışması kapsamında araştırılmıştır. Bu çalışmanın başlangıç noktasını teşkil eden gen frekanslarının kontrol ve klinik olarak pediatrik obez tanısı ile izlenen grupta değerlendirilmesi, karşılaştırılması aşamasında elde edilen PAI-1 geni verileri yayımlanmıştır (Berberoglu, Evliyaoglu et al. 2006) (EK1). Daha sonra pediatrik obezitede etkili olabilecek diğer hedef genler ile pediatrik obezitede genetik etkenler araştırılmıştır.

Bu çalışma ile, araştırmaya dahil edilen IL-6 -174 G/C ve FABP4 T/C gen değişimlerinin pediatrik yaş grubu obezitesinde koruyucu yönde etkili olabileceği, TNF-a -308 G/A değişiminin istatistiksel olarak kontrol-obez grupları arasında anlamlı bir fark oluşturmadığı ve PAI-1 -675 4G/5G polimorfizminin

2.8 kat pediatrik obezitede anlamlı olduğu gösterilmiştir Tüm eksonu taranan Melanokortin 4 reseptör geninde toplam 18 obez bireyde biri literatürde daha önce tanımlanmamış 2 farklı gen değisi tespit edilmiştir. Bu çalışma ile pediatrik obezitede etkili gen değisimleri ön veriler ile değerlendirilmiştir. Melanokortin 4 reseptör geni ve Plazminojen aktivatör inhibitör-1 geni üzerinde çalışmaların devam etmesinin önemli olduğu düşünölmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Plazminojen Aktivatör Inhibitör-1 (PAI-1), Melanokortin 4 Reseptör (MC4R), Tümör Nekrozis faktör –alfa (TNF-a), Interlökin-6 (IL-6), ), Obezite, Diabetes mellitus

Danisman: Prof. Dr. Nejat AKAR

**MELANOCORTIN 4 RECEPTOR GENE, PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR - 1 GENE  
(-675 4G/5G), TUMOR NECROSIS FACTOR –ALPHA  
(-308 G/A) , INTERLEUKIN -6 (-174 G/C) and FATTY ACID BINDING PROTEIN -  
87T/C GENE INTERACTIONS IN PEDIATRIC OBESITY**

## **ABSTRACT**

Obesity is a complex, multi-factorial chronic disease, frequently associated with cardiovascular risks, hypertriglyceridaemia, low HDL-cholesterol, high blood pressure and the insulin resistance that appears to be central to the pathogenesis of type II diabetes. Obesity occurs when the energy intake from foods is over than energy used and balance is break-down (WHO 2000).

Obesity Over the last several decades, cases of obesity and Type II diabetes have reached epidemic proportions and threaten to over burden the world's health care systems. The incidence of obesity seems over 315 million in the world. This effective increase of obesity is also affect Turkey. In our country; 1/3 of women and 1/5 of men are obese (satman i 2001).

There is considerable evidence to suggest that, like height, weight is a heritable trait. Traditionally the most favoured model for separation of the genetic component of variance is based on studies of twins , as monozygotic co- twins share 100% of their genes and dizygotes 50% on average. Overall, data from twin and adoption studies are consistent with a genetic contribution for body mass index of between 60-84%. It is clear that different individuals have a certain genetic propensity to store excessive caloric intake as fat(Maes, Neale et al. 1997).

However the role of PAI-1 in adipogenesis is still unknown, circulating PAI-1 levels are elevated at an early stage of impaired glucose tolerance and continue to be elevated as diabetes and metabolic syndrome develop humans. In our study we investigated PAI-1 promoter -675 4G/5G polymorphism in pediatric obese group as a risk factor with 2.8 fold (Berberoglu, Evliyaoglu et al. 2006). And we demonstrated that the 4G/4G genotype increase the PAI-1 promoter activity, PAI 1 increases the differentiation of preadipocytes to adipocytes.

In this present studie, IL-6 -174 G/C and FABP4 T/C polymorphisms were investigated as protector gene alternations and TNF-a -308 G/A polymorphism was not significant in our obese group. Tha last gene we focus on was melanocortin 4 receptor gene that in 18 obese patients, 2 different mutations were found. One of these mutations was a new mutation. So that we conclude, Melanocortin 4 receptor gene and plasminogen activator inhibitor-1 genes modulate the obesity and thought to continue focus on these genes with additional studies.

**Key Words:** Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Melanocortin 4 Reseptor gene (MC4R), Tumor Necrosis faktor –alpha (TNF-a), Interleukin-6 (IL-6), Obesity, Diabetes mellitus

**Advisor:** Prof. Dr. Nejat AKAR

## TESEKKÜR

Tüm moleküler genetik öğrenimim boyunca olduğu gibi doktora tezi çalışmamın olusturulmasında ve yürütülmesinde de değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her aşamasında bana yol göstererek bilgi ve tecrübelerini paylasan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a ve 7 yıldır beraber çalışma şansını bulduğum moleküler biyoloji eğitimimde büyük katkıları bulunan, ilk günden bugüne kadar her zaman desteğini hissettığım Üniversitemiz Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Uzm. Bio. Ece AKAR'a şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarım boyunca vakit ayırıp değerli fikirleriyle katkıda bulunan aynı zamanda çalışmaya alınan hasta grubunun klinik tanımlarını değerlendiren ve hasta örneklerini sağlayan Tez İzleme Komitesi hocalarımdan, Üniversitemiz Pediatrik Endokrinoloji ABD Öğretim Görevlisi Prof. Dr. Merih BERBEROĞLU'na, ve katkılarından ötürü yine Tez İzleme Komitesi jürim Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mustafa TEKİN'e teşekkürlerimi sunarım. Hasta örneklerinin temininde gösterdiği titizlikten ve özverili katkılarından ötürü Üniversitemiz Pediatrik Endokrinoloji ABD öğretim üyelerinden Doç. Dr. Pelin ADIYAMAN'a ve Ankara Üniversitesi Sosyal Pediatri Bölümüne, Harvard Tıp Fakültesinde tez çalışmalarımın devam etmemde yardımlarını esirgemeyen Hüseyin AKTAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Biyolog Dr. Erkan YILMAZ'a, Uzman Biyolog Arzu ULU'ya, Uzman Biyolog Züleyha YILDIZ'a, Kadir SIPAHI'ye, Uzm. Bio. Biyolog Sükrü GÜLEÇ'e, Tez yazım aşamamda A.B.D. 'de sevgi ve desteğini hiçbir zaman unutamayacağım Uzman Biyolog Ayça Dilara YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Her zaman sevgi ve desteklerini esirgemeyen, tüm öğrenim hayatım boyunca her türlü fedakarlıkta bulunan emeklerinden dolayı minnetkar olduğum; babam Haluk ÖZEL'e, annem Selma ÖZEL'e ve kardesim Murat ÖZEL'e, Her türlü zorluğu beraber göğüslediğimiz, sevgi ve desteğiyle hiçbir zaman zorlu yollarda beni yalnız bırakmayan, bilimsel ve manevi büyük katkıları ile birlikte bugünlere geldiğimiz esim Dr. Özerk DEMİRALP'e sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora Tez çalışması Ankara Üniversitesi tarafından Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü Proje kapsamında desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TESEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SIMGELER DIZINI .....	xii
SEKİLLER DIZINI .....	xiv
TABLolar DIZINI .....	xviii
<b>1. GIRIS .....</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler .....	3
1.1.1. Obeziteye Genel Yaklaşım .....	3
1.1.2. Obezite Etiyolojisi .....	5
1.1.3. Obezite ve Genetik .....	7
1.1.4. Obezite Tipleri .....	9
1.1.4.1. Yağ Dağılımına Göre Obezite .....	9
1.1.4.1.1. Santral veya Visseral Obezite .....	9
1.1.4.1.2. Subkutanöz Obezite .....	10
1.1.4.2.1. Hipersellüler Obezite .....	10
1.1.4.2.2. Hiperplastik Obezite .....	10
1.1.5. Yağ Doku ve Adipogenezis .....	12
1.1.6. Adipositlerin Antisteatotik Fonksiyonları .....	13
1.1.7. Bu Doktora Çalışmasında Analiz Edilen Pediyatrik Obezitede Etkisi Olabilecek Gen Değişimleri .....	14
1.1.7.1. Plasminojen Aktivatör İnhibitör-1 .....	14
1.1.7.2. Melanokortin 4 Reseptör Geni .....	17
1.1.7.3. Tümör Nekrozis Faktör Alfa .....	18
1.1.7.4. Yağ Asiti Bağlama Proteinini 4 .....	20
1.1.7.5. İnterlökin-6 Geni .....	22
1.1.8. Gen Değişimlerinin Taranmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler .....	23



1.1.8.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	23
1.1.8.1.1.PZR'u Komponentleri .....	25
1.1.8.1.1.1.Polimeraz Enzimi .....	25
1.1.8.1.1.2.PZR'da Kullanilan Tamponlar .....	25
1.1.8.1.1.3.dNTP'ler.....	25
1.1.8.1.1.4. Sentetik Oligonükleotidler.....	25
1.1.8.2.Restriksiyon Endonükleaz Fragman Uzunluk Polimorfizm Analiz Yöntemi.....	26
1.1.8.3.Sanger Yöntemi ile DNA Dizi Analizi.....	26
1.1.8.3.1.Maxam-Gilbert Yöntemi .....	27
1.1.8.3.2.Sanger DNA Dizi Analiz Yöntemi.....	27
1.1.8.4.Klonlama Yöntemi .....	27
1.1.8.4.1.Vektörler.....	28
1.1.8.4.2.Plazmidler.....	28
1.1.8.4.3.Kosmidler .....	29
1.1.8.4.4.Bakteriofaj Lambda .....	29
1.1.8.4.5.YAC Kromozomlari (Yapay Maya Kromozomlari) .....	30
1.1.8.5.Site-directed Mutagenesis .....	31
1.1.8.6.Ligasyon .....	32
1.1.8.7.Klonların Transformasyon ile Sub-Klon Bakteriye Aktarılması .....	33
1.1.8.8.Klonların Aktarıldığı Bakteri Hücrelerinden Tekrar Amplifiye Edilen Pozitif Plazmidlerin İzolasyonu için İnokülasyon .....	33
1.1.8.9.Hücre Kültürü.....	34
1.1.8.10. Hazırlanan Klonların Hücrelere Transfeksiyon ile Aktarımı.....	34
1.1.8.11. Dual-Glo Lusiferaz Klon Analiz Sistemi .....	35
1.1.8.12. Western-Blot .....	37
1.1.8.13.Gen Ekspresyonunun siRNA Yöntemi ile Durdurulması.....	37
1.1.8.13.1.siRNA dizayni .....	38
1.1.8.14.Aktivite Tayin Yönteminde Kullanılan İlaçlar .....	39
1.1.8.14.1.Ciglitazone.....	39
1.1.8.14.2.Troglitazone.....	40

<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>41</b>
2.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	41
2.1.1.DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler .....	42
2.1.1.2.STE Çözeltisi .....	42
2.1.1.3. Fenol:Kloroform:Izoamilalkol Karisimi .....	42
2.1.1.4. TE Çözeltisi .....	43
2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	43
2.3.Restriksiyon Endonükleaz Uzunluk Polimorfizm AnalizYöntemi .....	43
2.3.1.Gen Değişimlerine ait PZR'u ve RFLP Kosulları.....	44
2.3.1.1.Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 4G/5G Polimorfizminin Tanımlanması.....	44
2.3.1.2.Yağ Asiti Bağlanma Proteini (FABP4)promoter -87 T/C Değişimi .....	45
2.3.1.3.Interlökin 6 -174 G/C promoter Değişimi.....	46
2.3.1.4.Tümör Nekrozis Faktör Alfa -308 G/A Değişimi .....	47
2.3.1.5.Melanokortin 4 Reseptör Geni .....	48
2.4.Agaroz Jel Elektrophorez Yöntemi ile PZR'u ve RFLP örneklerinin Görüntülenmesi .....	49
2.4.1.Agaroz Jel Elektrophorezinin Komponentleri .....	50
2.4.1.1. 5X TBE Çözeltisi .....	50
2.4.1.2.1X TBE Çözeltisi .....	50
2.4.1.3.Ethidiyum Bromit Hazırlanışı .....	50
2.5.Sanger Yöntemi ile MC4R Geninin Taranması.....	50
2.6.PAI-1 Aktivite Tayin Yöntemi için 4G/4G ve 5G/5G Klonların	

Hazirlanmasi .....	51
2.6.1.Klonlama için Primer Dizayni .....	51
2.6.1.1.Site-directed mutagenesis .....	51
2.6.2.RFLP Yöntemi ile Plazmid ve Klonlanacak Gen Dizilerinin Hazirlanmasi .....	52
2.6.3.Klonlama için RFLP Yöntemi ile Hazirlanan örneklerin Pürifikasyonu .....	53
2.6.3.1.Agaroz Jelden DNA Pürifikasyonu.....	53
2.6.4.Klonlama için Plazmid Hazirlama Asamasi ve Gen Ligasyonu .....	55
2.6.4.1.Ligasyon.....	55
2.6.5.Klonların Transformasyon ile Sub-Klon Bakteriye Aktarilmasi .....	56
2.6.5.1.Transformasyonda Kullanilan LB Tampon Hazirlanisi.....	56
2.6.5.2.Transformasyonda Kullanilan LB Agar Hazirlanisi .....	57
2.6.6.Klonların Aktarildigi Bakteri Hücrelerinden Tekrar Amplifiye edilen Pozitif Plazmidlerin İzolasyonu için İnokülasyon.....	57
2.6.7.İnokülasyon Ürünlerinden Plazmid İzolasyonu .....	57
2.6.8.Plazmidlerin Klon Açısından Değerlendirilmesi .....	58
2.6.8.1.PZR ile Plazmid-Klon Değerlendirilmesi .....	58
2.6.8.2.RFLP Yöntemi ile Plazmid-Klon Değerlendirilmesi.....	58
2.7.Hücre Kültürü.....	59
2.7.1.Preadiposit Adiposit Hücre Farklılaşması.....	60
2.7.2.Oil Red O Boyaması .....	61
2.7.3.Hazirlanan Klonların Hücrelere Transfeksiyon ile Enfekte Edilmesi .....	62
2.7.3.1.Transfeksiyon Asamaları .....	63

2.7.3.2.Dual-Glo Lusiferaz Klon Analiz Sistemi.....	64
2.8.Western Blot.....	66
2.8.1.SDS PAGE.....	66
2.8.1.1.Akrilamid-Bisakrilamid .....	66
2.8.1.2.TBE Tampon Çözeltisi.....	66
2.8.1.3.APS Hazirlanisi.....	67
2.8.1.4.Tris-HCL.....	67
2.8.1.5.SDS .....	67
2.8.2.Elektroforez Aparatinin Hazirlanmasi .....	67
2.9.PAI-1 Gen Ekpresyonununun siRNA Yöntemi ile Azaltılması.....	69
2.9.1.siRNA Dizayni.....	69
2.10.Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi .....	70
2.11.Real Time PZR.....	71
2.11.Istatistiksel Analiz.....	72
<b>3. BULGULARI .....</b>	<b>73</b>
3.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1-675 4G/5G Polimorfizmi .....	73
3.1.1.Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1-675 4G/5G Polimorfizminin Tanımlanması için PZR .....	73
3.1.2. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1-675 4G/5G Polimorfizmini Tanımlamak için BseL1 Restriksiyon Endonükleazi ile Kesim .....	73
3.2. Adiposit Yağ Asiti Bağlanma Proteini(FABP4,aP2) -87 promoter T/C Polimorfizmi.....	74
3.2.1.Adiposit Yağ Asiti Bağlanma Proteini(FABP4,aP2) -87 promoter T/C Polimorfizminin tanımlanması için PZR.....	74
3.2.2.Adiposit Yağ Asiti Bağlanma Proteini (FABP4,aP2) -87 promoter T/C Polimorfizminin tanımlanması için Mun I Restriksiyon Endonükleazi ile Kesim .....	75
3.3. Interlökin 6 (IL-6) -174 G/C Değişimi .....	76

3.3.1. Interlökin 6 -174 G/C Değişiminin Tanımlanması için PZR.....	76
3.3.2. Interlökin 6 -174 G/C Değişiminin Tanımlanması için NlaIII Restriksiyon Endonükleazi ile Kesim.....	76
3.4. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa -308 G/A Değişimi .....	77
3.4.1. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa -308 G/A Değişiminin Tanımlanması için PZR .....	77
3.4.2. TNF-Alfa-308 G/A Değişiminin Tanımlanması için BspH I Restriksiyon Endonükleazları ile Kesim .....	78
3.5. Melanokortin 4 Reseptör Geni(MC4R) .....	79
3.5. 1. Melanokortin 4 Reseptör Geninin DNA Dizi Analizi Yöntemi ile Taranması için Ekson içi I. Bölge PZR'u .....	79
3.5.2. Melanokortin 4 Reseptör Geni Ekson içi I. Bölge DNA Dizi Analizi.....	79
3.5.2.1. Melanokortin 4 Reseptör Geninin DNA Dizi Analizi Yöntemi ile Taranması için II. Bölge PZR'u .....	81
3.5.2.2. Melanokortin 4 Reseptör Geni Ekson içi II. Bölge DNA Dizi Analizi .....	81
3.6. Plasminojen Aktivatör İnhibitör-1 -675 4G/5G Polimorfizmi Aktivasyon Tayini.....	82
3.6.1. Site-Directed Mutagenesis ile 4G/5G Polimorfizminin Oluşturulması .....	82
3.6.2. Adipogeneziste Site-Directed Mutagenesis ile Oluşturulan 4G/5G Örneklerinin Değerlendirilmesi .....	83
3.6.3. Klonların Dual-Glo Lusiferaz Analiz Yöntemi ile Değerlendirilmesi .....	84
3.6.4. PAI-1 Ekspresyonuna Anti-Diyabetik İlaçların Etkileri.....	84
3.6.4.1. Dual-Glo Lusiferaz Analiz Yöntemi ile Ciglitazone İlaç Denemesi .....	84
3.6.4.2. Dual-Glo Lusiferaz Analiz Yöntemi ile Troglitazone İlaç Denemesi .....	85
3.6.5. Western Blot Yöntemi ile PAI-1 Ekspresyonunun Gösterilmesi .....	86
3.6.7. siRNA Gen Susturma Yöntemi ile PAI-1 Gen Ekspresyonunun Azaltılması .....	87
<b>4. TARTISMA .....</b>	<b>90</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>95</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>103</b>
<b>EK 1 .....</b>	<b>104</b>
<b>EK2 .....</b>	<b>112</b>

## SIMGELER DIZINI

A	Adenin bazi
AP-1	Adipojenik protein 1
AP-2	Adipojenik protein 2
Bç	Baz çifti
BSF2	Beta Hücre Farklılaşma Faktörü 2
BMI	Vücut Kütle İndeksi
C	Sitozin bazi
ddNTP	Dideoksi nükleotid trifosfat
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetra asetikasit
FABP4	Yağ Asiti Bağlanma Proteini 4
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
G	Guanin bazi
IL-1	Interlökin 1
IL-6	Interlökin 6
IR	İnsülin Rezistansi
LB	Luria Bertani Tamponu
lt	Litre
MC4R	Melanokortin 4 Reseptörü
MCP-1	Monosit Kemoatrakt Protein 1
Mg <sup>++</sup>	Magnezyum
µl	Mikro litre
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör 1
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBC	Red Blood Cell
PPAR	Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptör
RFLP	Restriksiyon Fraksiyon Uzunluk Polimorfizim
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

T	Timin bazi
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid
TNF-a	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
YAC	Yapay Maya Kromozomu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## SEKİLLER DİZİNİ

Sekil 1.1. 2-20 Yaş Grubu Çocuk ve Gençlerde BMI-Persentil eğrileri.....	4
Sekil 1.2. İnsülin Rezistansı ve Metabolik Sendrom.....	6
Sekil 1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile hedef DNA dizinin logaritmik olarak çoğaltılması .....	24
Sekil 1.4. Hedef DNA'nın YAC vektörü ile aktarımı .....	31
Sekil 1.5. Site-Directed Mutagenesis ile mutasyon oluşturulması .....	32
Sekil 1.6. Ligasyon işlemi .....	33
Sekil 1.7. Preadiposit hücre serisi.....	34
Sekil 1.8. pGL-3 temel vektörünün halkasal yapısı.....	35
Sekil 1.9. Duol-Glo Lusiferaz klonlamam firefly lusiferaz plazmidini işleme mekanizması .....	36
Sekil 1.10. Duol-Glo Lusiferaz klonlamam renilla lusiferaz plazmidini işleme mekanizması .....	36
Sekil 1.11. siRNA gen susturma yönteminde kullanılan pLentilox 3.7'in sematik görünümü .....	38
Sekil 1.12. siRNA pLentilox 3.7 vektörü .....	39
Sekil 1.13. Ciglitazone biyokimyasal formülasyonu.....	40
Sekil 1.14. Troglitazone biyokimyasal formülasyonu.....	40
Sekil 2.1. PAI-1 promotor dizisi .....	44



Sekil 2.2. FABP 4 promoter dizisi .....	45
Sekil 2.3.. IL-6 promoter dizisi.....	46
Sekil 2.4.. TNF promoter dizisi .....	47
Sekil 2.5. MC4R ekson dizisi .....	48
Sekil 2.6. RFLP ve PZR'u ürünlerinin ve jelden kesim ile tekrar izolasyon sonrasi agaroz jelde görünümü .....	53
Sekil 2.7. Agaroz jelden DNA elde edilmesi.....	54
Sekil 2.8. Preadiposit hücre serisi.....	60
Sekil 2.9. (a) Oil Red O ile boyamasi ile farklılaşma ile oluşturulan adipojenik hücrelerin görünümü.....	62
Sekil 2.10. Western –blot yöntemi .....	68
Sekil 2.11. siRNA yönteminde kullanılan pLentilox 3.7'nin sematik gösterimi .....	69
Sekil 3.1. PAI-1 98/99 bç. geni promotor bölgesinin PCR görüntüsü .....	73
Sekil 3.2. Plasminojen aktivatör inhibitör-1 geni promotor bölgesi -675 4G/5G polimorfizminin BseI1 restriksiyon endonükleazi kullanılarak gösterilmesi .....	74
Sekil 3.3. FABP4 geni promotor bölgesinin 396 bç.'lik PCR görüntüsü .....	74
Sekil 3.4. FABP4 –87 T /C polimorfizminin Mun 1 restriksiyon endonükleazi kullanılarak gösterilmesi.....	75
Sekil 3.5. IL-6 geni promotor bölgesinin 431bç.'lik PCR görüntüsü .....	76
Sekil 3.6. Interlökin 6 -174 G/C degisiminin Nla III restriksiyon endonükleazi kullanılarak gösterilmesi.....	76

Sekil 3.7. TNF-a -308 G/A promotor bölgesinin 116 bç.'lik PCR görüntüsü .....	77
Sekil 3.8. TNF-a -308 G/A degisiminin BspH I restriksiyon endonükleazi kullanılarak gösterilmesi.....	78
Sekil 3.9. MC4R geni ekson içi 1. bölge 610 bç.'lik PCR görüntüsü.....	79
Sekil 3.10. MC4R ekson içi 124 G/A degisimi, heterozigot.....	79
Sekil 3.11. MC4R ekson içi 124 G/A degisimi, homozigot .....	80
Sekil 3.12. MC4R ekson içi 307 G/A degisimi, heterozigot.....	80
Sekil 3.13. MC4R geni aa. Sekansi, E; 42. aa., Glutamik asid, V; 103. aa. Valin .....	81
Sekil 3.14. MC4R geni ekson içi II. bölge 620 bç.'lik PCR görüntüsü .....	81
Sekil 3.15. Site-directed mutagenesis ile olusturulan PAI-1 -675 4G/4G homozigot örnek .....	82
Sekil 3.16. Site-directed mutagenesis ile olusturulan PAI-1 -675 4G/4G homozigot örnek dizi .....	82
Sekil 3.17. PAI-1 -675 4G/4G promoter dizi ile tranfekte edilmiş preadipositlerden farklılaşmış adipoz doku, 10. gün .....	83
Sekil 3.18. Tranfekte edilmemiş preadipositlerden farklılaşmış adipoz doku, 10. gün.....	83
Sekil 3.19. Relatif PAI-1 promoter 4G/5G genotip aktivasyonunun adipojenik siklusa günlere göre karşılaştırılması.....	84
Sekil 3.20. Adipojenik hücrelerin günlere göre PAI-1 gen aktivitelerinin ciglitazone ile etkilesimi .....	85
Sekil 3.21. Adipojenik hücrelerin günlere göre PAI-1 gen aktivitelerinin troglitazone ile etkilesimi .....	86

Sekil 3.22. (A). Adipojenik ve 3T3L1 hücre serilerinin ilaçlı ve ilaçsız western blot görüntüsü.....	87
Sekil 3.23. PAI-1 gen ekspresyonunun siRNA ile azaltılması, trasfeksiyondan sonra 24. saat .....	88
Sekil 3.24. Azaltılmış PAI-1 ekspresyonlu hücre serisinde adipogenezis .....	88
Sekil 3.25. PAI-1 ekspresyonunun tam olduğu hücre serisinde Adipogenezis .....	89

## TABLolar DIZINI

Tablo 1.1.Obezitede BMI .....	3
Tablo 1.2.Obezitede Bel Çevresi .....	3
Tablo 1.3.Çocuklarda persentil sınıflandırması .....	4
Tablo 1.4. Yasa ve Cinsiyete göre BMI-Obezite ilişkisi .....	11
Tablo 1.5. Adipokinlerin doku dağılımı ve obezite ilişkisi.....	13
Tablo 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve kullanılan miktarları .....	43
Tablo 2.2.. Çalışmaya alınan gen değişimlerinin tanımlanmasında kullanılan PZR'u ve RFLP koşulları .....	49
Tablo 2.3. Ligasyon yöntemi bileşenleri.....	55
Tablo 2.4. Transfeksiyonda kullanılan kimyasallar ve miktarları .....	63
Tablo 2.5. pGL 3 plazmid enzim haritası .....	65
Tablo 3.1. PAI-1 -675 4G/5G gen değişiminin hasta-kontrol grupları arasında değerlendirilmesi .....	74
Tablo 3.2. FABP 4 -87 T/C gen değişiminin hasta-kontrol grupları arasında değerlendirilmesi .....	75

Tablo 3.3. IL-6 -174 G/C gen değisiminin hasta-kontrol gruplari arasinda değerlendirilmesi .....	77
Tablo 3.4. TNF-a -308 G/A gen değisiminin hasta-kontrol gruplari arasinda değerlendirilmesi .....	78

## 1. GIRIS

Obezite ya da halk arasında bilinen adıyla sismanlık, vücutta fazla miktarda yağ birikmesi sonucu ortaya çıkan kronik değişikliklerle karakterize kompleks, multifaktöriyal bir hastalıktır. Obezite, besinlerle alınan enerji miktarının, metabolizma ve fiziksel aktivite ile tüketilen enerji miktarını sağlıklı bozacak ölçüde astığı durumda ortaya çıkar ve mutlaka tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır (WHO 2000).

Hem gelişmiş, hem de gelişmekte olan ülkelerde obezite oranı artmakta olup, erişkinleri olduğu kadar çocukları da giderek daha fazla etkilemekte ve pandemi halini almaktadır. Obezite hem bağımsız olarak hem de diğer hastalıklarla birlikte çok sayıda sağlık sorununa neden olur, ya da var olan sağlık sorunlarını ağırlaştırır. Özellikle diabetes mellitus, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon gelişimi ve bazı kanserlerin insidansında artışa yol açtığı kabul edilmektedir. Bunun dışında kalp ve damar sistemi, solunum sistemi, hormonal sistem, sindirim sistemi gibi sistemleri etkileyen ve birçok önemli rahatsızlığa zemin hazırlayan bir hastalıktır. Dolayısıyla obezite, insan yaşamını kısaltan ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen bir hastalık olarak tanımlanabilir.

Yapılan araştırmalara göre, obezite özellikle son 20 yılda, bütün dünyada süratle artmakta ve bir salgın hastalık gibi yayılmaktadır. Dünyada 315 milyon insanın vücut kitle indeksinin (BMI)  $30 \text{ kg/m}^2$  olduğu, 750 milyon insanın ise BMI'sinin  $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$  aralığında olduğu dolayısıyla 1.1. milyar insanın asiri kilolu veya obez olduğu rapor edilmektedir (Caterston and Gill 2002). Bu salgından ülkemiz de etkilenmektedir. Kadın nüfusumuzun yaklaşık üçte biri, erkek nüfusumuzun da yaklaşık beste biri obezdir (Satman i 2001).

Gelişmiş Avrupa ülkelerinde, son 10-50 yıl içerisinde popülasyonun üçte birinin obez olduğu ve obezitenin daha çok orta ve alt gelir gruplarında görüldüğü bildirilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde ise orta ve üst gelir düzeylerindeki kişilerde obezite oranı daha fazladır. Ortaya çıkan hızla artan obezite tablosunda son yıllarda değişen fiziksel aktivite düzeyleri ve sedental yaşam tarzı mutlak etkili olmakla beraber kalıtsal etkenlerin majör etken olduğu yadsınmaz. Özellikle ikiz ve adoptin çalışmalarında BMI ile genetik

etkilesimler 60%-84% 'lere kadar çıkmaktadır. Morbitide ve mortalite nedeni olan obezite, hayat boyu süren tehlikeli bir epidemi oluşturu (Maes, Neale et al. 1997).

Obezite aynı zamanda mali yükü artıran bir hastalıktır. Bunun yanı sıra toplumun sismanlığa karşı gösterdiği reaksiyon nedeniyle kişilerde anksiyete, depresyon, suçluluk duygusu ve somatik yakınmalar gelişebilir. Ayrıca, iş bulma güçlüğü, okul ve iş çevrelerince reddedilme gibi sosyal sorunlara neden olur. Yaşam kalitesini doğrudan etkileyen obezite bahsedildiği gibi çevresel faktörler ile değişkenlik göstermesinin yanı sıra poligenik bir hastalıktır. Mendeliyal kalıtım örneği gösteren obezite nedeni gen değişimleri olmasının yanı sıra mendeliyal olmayan kalıtım örnekleri de obezitede görülmektedir (Comuzzie 2002). Tüm bu hayati özelliklerinden dolayı ve multifaktoriyal bir hastalık olarak genetik etkinin yadsınamaz ölçüde önemli olmasından ötürü pediatrik obezitede gen değişimleri bu doktora tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

Bu doktora tez çalışmasının başlangıç noktasını teşkil eden gen frekanslarının kontrol ve klinik olarak pediatrik obezite tanısı ile izlenen grupta değerlendirilmesi, karşılaştırılması aşamasında elde edilen PAI-1 geni verileri yayımlanmıştır (Berberoğlu, Evliyaoğlu et al. 2006) (EK1). Aynı zamanda Türkiye'deki bilimsel çalışmalar açısından Türkiye'de yine ilk olma özelliği taşıyan materyal ve yöntemler kullanılmıştır. Sonuç olarak bu tez çalışması ile ele alınan hedef, şüpheli gen bölgeleri belirli gen değişimleri için taranarak veya yeni gen değişimleri açısından farklı yöntemler ile tüm ekson, intron veya promotor bölgelerin değerlendirilmesi ile pediatrik obezitede etken genler ve gen değişimleri değerlendirilmeye çalışılmıştır.

## 1.1.Genel Bilgiler

### 1.1.1. Obeziteye Genel Yaklasim:

Dünya saglik örgütü (WHO) tarafından “OBEZITE; sagligi bozacak ölçüde yag dokularinda anormal veya asiri miktarda yag birikmesidir.” seklinde tanimlanmaktadır. Yani obezite vücut yag oraninin artmasiyla endokrin ve metabolik degisikliklerin olusumuyla karakterize kompleks, multifaktöriyal bir hastaliktir (WHO 2000).

Yas grubuna göre ve cinsiyete göre obezite farkli sekillerde tanimlanir. 18 yasindaki erkeklerde normal olarak ; vücut agirliginin %15-18 kizlarda ise: vücut agirliginin %20-25’ni yag doku olusturur. Eriskin grubta erkeklerde %25’in üzerinde yag doku oranı kizlarda ise %30-35’in üzerinde yag doku bulunmasi durumu obezite olarak tanimlanmaktadır. Vücut kütle indeksi (BMI) ise obezite taniminda kullanılan diger bir hesaplama biçimidir. Vücut toplam yag oranı ile iliskilidir ve bel çevresi bölgesel dagilimi hakkında bilgi verir (Karasalihoglu 2005).

Obezite	BMI
Asiri kilolu	25-30 kg/m <sup>2</sup>
Obez	>30 kg/m <sup>2</sup>

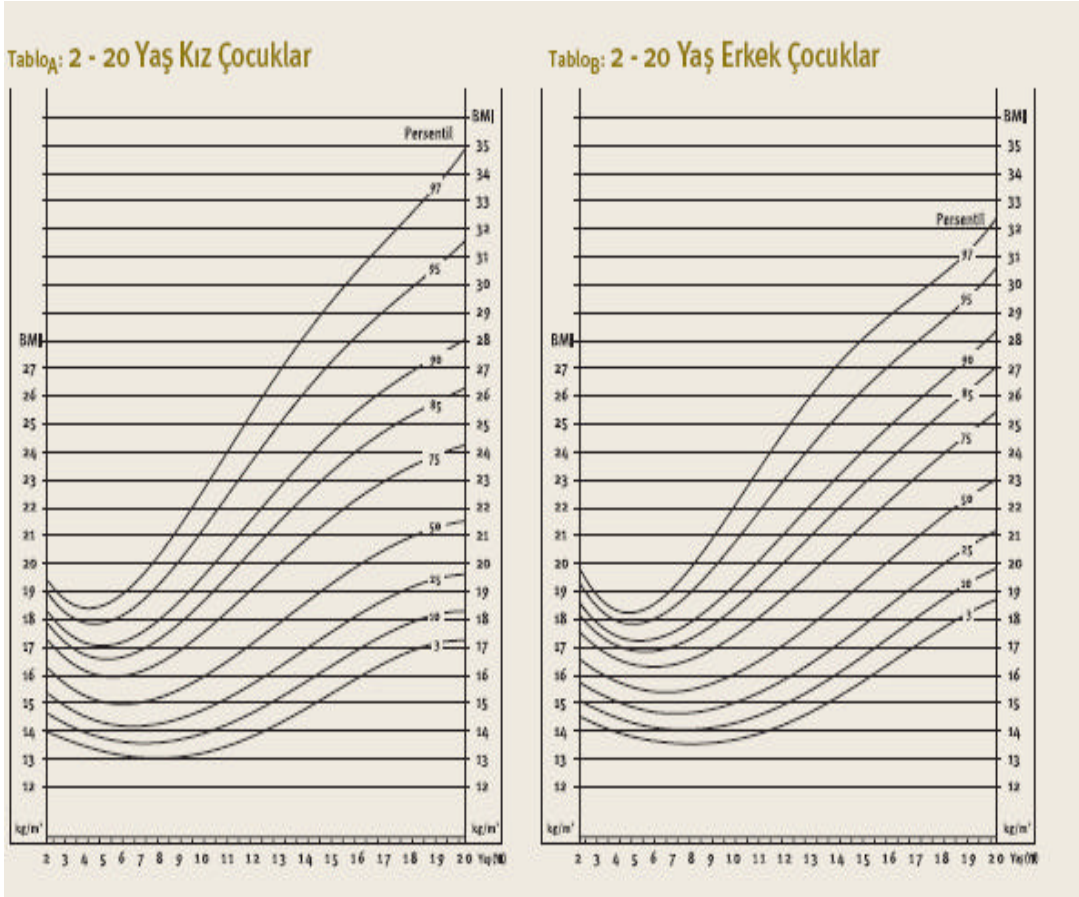
Tablo 1.1.Obezitede BMI

Obezite	Bel Çevresi
Kadin	>80 cm.
Erkek	>95 cm.

Tablo 1.2.Obezitede Bel Çevresi

Çocuklarda ise BMI degerlendirilmesi yas ve cinsiyete göre özel olarak hazirlanan tablolar ile yapilir. Bu tablolar 2-20 yas arasindaki çocuklar ve gençler için geçerlidir. Tablolardaki egriler, özel persentilleri göstermektedir (Süzek 2005).





Sekil 1. 1. 2-20 Yas Grubu Çocuk ve Gençlerde BMI-Persentil eğrileri, Atasoy 2005

Bu persentil eğrileri kullanılarak çocukların kilolarını yaşlarına göre değerlendirmek mümkündür. Hesaplanan BMI'ya göre çocuklar zayıf, normal ve fazla kilolu olarak sınıflandırılır.

	Yasa göre BMI (Persentil)
<b>Zayıf</b>	< 5
<b>Normal</b>	5-85
<b>Fazla Kilolu (Obez)</b>	> 85

Tablo1.3.Çocuklarda persentil sınıflandırması

### **1.1.2. Obezite Etiyolojisi:**

Obezitede etioloji tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla beraber genetik ve çevresel etkenlerin birlikteliğinin büyük rol oynadığı bilinmektedir (Ozata 2003).

#### **Eriskinlerde obezite gelişiminde risk faktörleri başlıca şöyle özetlenebilir;**

- Fiziksel aktivitede azalma
- Bozuk beslenme alışkanlığı
- Yaş
- Cinsiyet ( kadınlarda obezite sıklığı daha fazladır)
- Alkol kullanımı
- Gestasyonel diabetli anneden doğma
- Anne veya babanın veya herikisinin obez olması
- Psikolojik problemler olarak belirtilebilir.

#### **Çocukluk çağı obezitesinde ise başlıca risk faktörleri;**

- Anne ve babada obezite olması
- Ailesel aktivite azlığı
- Yemek yeme davranışının televizyona bağımlı hale getirilmesi olarak belirtilebilir (Ozata 2003).

Fiziksel aktiviteyi kısıtlayan yaşam tarzı ve aileden gelen kalıtsal riskler çocukluk çağı obezitesinde temelini teşkil etmektedir. Obezitenin giderek epidemik halini almasının en önemli sebepleri kolay yaşam şekli, sedentary yaşam ve beraberinde fazla kalori alımı ve adolesans döneminde de fast-food türü yeme alışkanlığı kazanılmasıdır (. 1998).

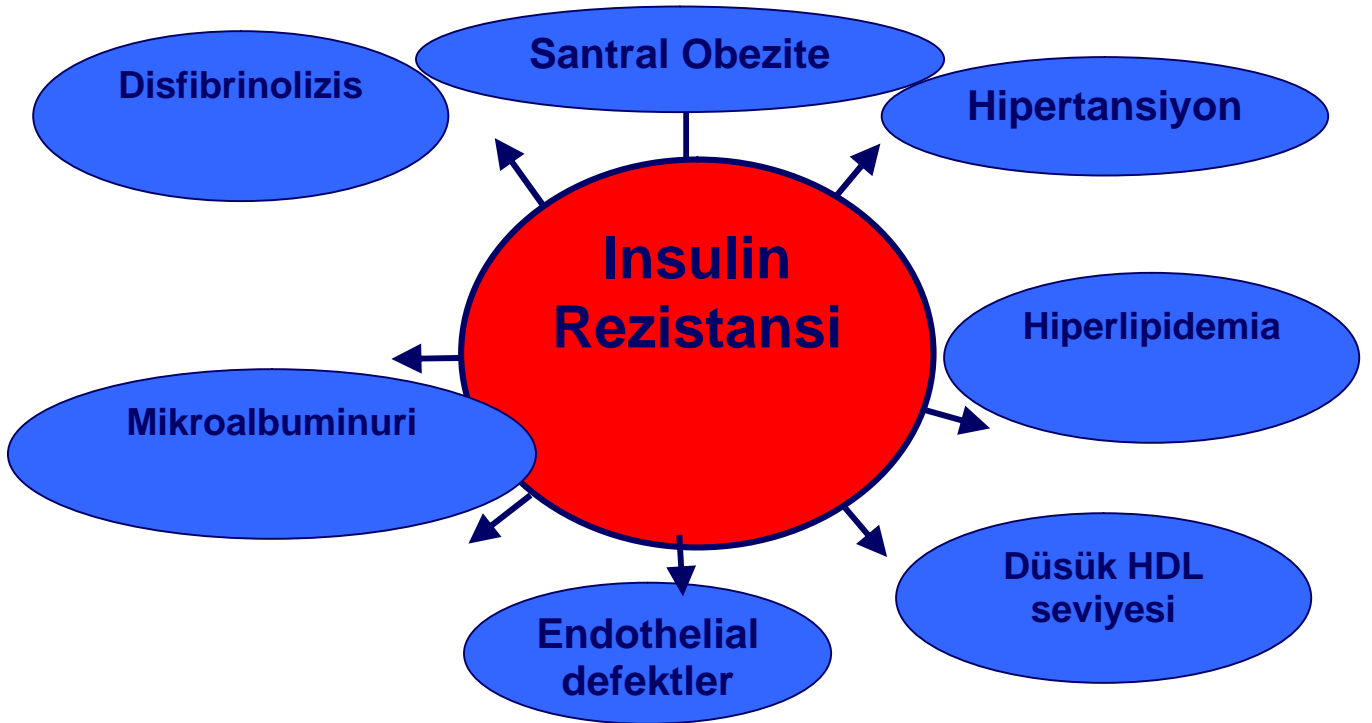
İnsan yaşamında kilo alımına eğiliminin arttığı veya kilo almanın görüldüğü dönemler ise şunlardır;

- gebelikte prenatal dönem

- 5-7 yaslar
- adölesan dönem
- menopoz
- erken eriskinlik dönemi (25-35 yaslar)
- kilo verme döneminin ardından gelen dönemler.

Tüm bu faktörler ve yasam tarzi ile genetik faktörlerin birlikteligi çocukluk çagi ve eriskin obezitesini olusturmaktadır. Obezitenin kalitsal boyutu yillardir bilinmektedir. Kalitimdan bagimsiz olarak enerji aliminin artmasi ve hareket azligi obezite gelismisini artirir. Kalitimin 35% rol oynadigi ve modifiye edici genlerin de 15% rol aldigi düşünülür ise geri kalan %50 oranda da çevresel faktörler ve yasam stilinin etkili oldugu ortaya çikmektedir (Colman 1998).

Genetik kökenli obezite en sik insülin rezistansi bazli olarak karsimiza çikmektedir. Birçok hayati önemde defekti birlikteliginde getiren insülin rezistansi obezite disinda hipertansiyon, damar duvar hasarlanmalari gibi kardiyovasküler risk getiren faktörleride indükler (Parsons, Power et al. 1999).



**Şekil 1.2. İnsülin Rezistansi ve Metabolik Sendrom**

### 1.1.3.Obezite ve Genetik:

Çocukluk çağı obezitesi kalıtsal etmenlerin yanısıra özellikle anne sütü ile beslenme ile önlenebilmektedir. Mama ile beslenen yenidoğanlarda obezite riskinin arttığı bilinmektedir. Çocuklukta başlayıp her yıl aynı miktarda kilo almayla karakterize ve 30'lu yaşlarda 140 kg' a kadar ulaşan obezite tipine progressif hiperfajik obezite ismi verilmektedir. Bu tip obezite mendeliyal kalıtıma uyan ailesel obezite örneklemesinde sık rastlanmaktadır (Ozata 2003).

Obezite, elbetteki her yaşta ortaya çıkabilir ve doğum kilosu obeziteyi tahminde güvenilir değildir. Bu asamada ailesel obezite öyküsü önem kazanır. Diabetik anneden doğanlarda obezite riski ve abdominal yağlanma fazladır. Infantlarda, baş çevresi küçük olanlarda obezite riskinin fazla olduğunu bazı çalışmalar rapor edilmistir. Anne ve babası asiri kilolu çocukların %80'inde, anne ve babasının birisinde asiri kiloluluk olan çocukların %40'ında, anne ve babası normal kilolu olanların ise %10'unda erişkin dönemde obezite görülmektedir. 3-10 yaş arasında asiri kilolu olan çocukların %50'sinde erişkin dönemde asiri kilolu olma riski bulunmaktadır. Adölesans dönemde asiri kilolu olan bireylerin ise %70- %80'inde ileri dönemlerde obezite tablosu ortaya çıkma riski bulunmaktadır (Barsh, Farooqi et al. 2000).

Dolayısıyla daha önce belirtildiği gibi multifaktöriyal bir hastalık olan obezitede epidemiyolojik çalışmalar vücut ağırlığındaki %30-70 oranındaki varyasyonların genetik faktörlere bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda monojenik (tek gen değişimine bağlı) sendromlar dışında mutlaka obezite ile sonuçlanan tek bir genetik defekt veya mutasyon tanımlanamamıştır. Diğer bir deyimle toplumda sıklığı giderek artan obezite polijenik kalıtım göstermektedir. Genel anlamda obezitede genetik katkinin %25-50 oranında olduğu rapor edilmektedir (Ozata 2003).

İnsan obezitesine neden olan genler henüz tam anlamıyla tanımlanamamıştır. Genom taramaları ile çalışmalar devam etmektedir. Bu taramalarda Quantative Trait Locus adı verilen obezitede aday kromozom gen yerleşim bölgeleri saptanmıştır. Bugüne kadar 5 farklı grup obezite için insan genom taraması çalışması yapmıştır. Fransız

ve Alman grupların çalışmalarının sonucunda vardıkları ortak nokta 10. kromozomun sentromere yakın belirli bölgeleri olmuştur. Ayrıca Amerikada sürdürölen çalışmalarda 2,3,5,10 ve 20. kromozomlarda QTL'lar tespit edilmiştir. Günümüzde yaklaşık 200 kadar üzerinde çalışılan obezite için aday gen bulunmaktadır (Cummings and Schwartz 2003).

### **Obezitede Aday Genlerin bir bölümü;**

- Beta3-AR
- Apolipoprotein D
- LDL reseptör
- İnsülin geni
- UCP1
- AcylCarrier Protein-1
- Ob geni
- ADD-1/SREBP-1c
- JNK gen mutasyonları
- Histamin 3 reseptör gen mutasyonları
- Apo B
- Lipoprotein lipaz
- TNF
- Plazminojen Aktivatör İnhibitör -1
- Interlökin- 6
- AP2 (FABP)
- IRS-1
- HOB-1 geni olarak sıralanabilir (Ozata 2003).

Bilinen Mendel geisli 24 hastalığın bir komponenti obezitedir. Bunların 9'u otozomal dominant, 10' u otozomal resesif ve 5' i X e bağlı kalıtım gösterir (Proenza, Poissonnet et al. 2000).

## **Obeziteye neden olan tekgen değisimleri ise ;**

- Leptin geni
- Prohormon konvertaz -1
- Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör gamma -2
- Melanokortin -3 reseptör geni
- Leptin reseptör
- Pro-opiomelanokortin geni
- Melanokortin- 4 reseptör geni
- SIM-1 mutasyonu olarak sıralanabilir(Clement 2005).

Yukarıda belirtilen tek gen değisimlerinin hepsinin leptin-melanokortin sinyal yolunda bulunması çok ilginçtir. Bu nedenle obezite çalışmaları leptin-melanokortin sinyal iletim yolları üzerinde yoğunlaşmıştır. Vücut ağırlığının devamında bu yolun primer rol oynadığı bugün kesin olarak ortaya konmuştur (Odabasi, Ozata et al. 2000; Uckaya, Ozata et al. 2000).

### **1.1.4. Obezite Tipleri:**

#### **1.1.4.1. Yağ Dağilimine Göre Obezite:**

##### **1.1.4.1.1. Santral veya visseral Obezite:**

Bu tip obezite abdominal, erkek tipi (android), kayis veya kemer üstü ve elma tipi obezite olarak tanımlanır. Santral obezite bir birime düşen yağ hücresi miktarı daha fazladır. Bu yağ dokusunda kan akımı, glukokortikoid ve androjen reseptörleri fazladır. Metabolik hastalıklar bu obezitede sık görülür. İnsülin rezistansı ve tip II diabetes mellitus, hipertansiyon, dislipidemi birlikteliği yani metabolik sendrom tablosu ortaya çıkar. Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve koroner arter ve serebral arter hastalığı (inme) yine bu tip obezitede sık görülmektedir.

#### **1.1.4.1.2. Subkutanöz Obezite:**

Kadin tipi, glutefemoral kemer tipi obezite yine erkek kemer tipi obezitesi özelliklerine sahiptir ve en iyi bel çevresi ile değerlendirilir (Norman, Thompson et al. 1997).

Diğer bir obezite tiplendirmesi ise şu şekilde yapılabilir:

#### **1.1.4.2.1. Hipersellüler Obezite:**

Çocukluk çağında görülen obezite tipi olarak tanımlanabilir. Adiposit sayısının artışıyla karakterizedir.

#### **1.1.4.2.2. Hiperplastik Obezite:**

Eriskin tip obezitedir. Adiposit hacminin artması ile karakterizedir. Hücre sayısı değişmez ancak bazı morbid obezlerde hipersellüler obezite görülebilir. Visseral veya abdominal yağlılık en iyi CT veya MRI ile yapılır ayrıca bel/kalça oranı ölçülerek değerlendirilebilir (Lean, Han et al. 1995).

Çocuklarda ve gençlerde obezite daha önce belirtilen persentillere göre hazırlanmış tablolardan hesaplanır. Cole ve arkadaşları tarafından 2000 yılında tanımlanan bu tablo en iyi 0-18 yaş obezitesi değerlendirme metodudur. Çocuklarda Bel/Kalça oranı ölçmenin klinik bir faydası yoktur. Ağırlığın 95 persentilin ve üzerinde olması boya göre beklenen ağırlığın %120' yi geçmesi anlamına gelmektedir. Aşağıda tabloda belirtilen BMI' ler obezite sınırında 95 ve üzeri persentile tekabül etmektedir (Cole, Bellizzi et al. 2000).

Yas (Yil)	Asiri Kilo Siniri BMI (kg/m <sup>2</sup> )		Obezite Siniri BMI (kg/m <sup>2</sup> )	
	Erkek	Kiz	Erkek	Kiz
2	18.4	18	20.1	20.1
2.5	18.1	17.8	19.8	19.5
3	17.9	17.6	19.6	19.4
3.5	17.7	17.4	19.4	19.2
4	17.6	17.3	19.3	19.1
4.5	17.5	17.2	19.3	19.1
5	17.6	17.1	19.3	19.2
5.5	17.5	17.2	19.5	19.3
6	17.4	17.3	19.8	19.7
6.5	17.7	17.5	20.2	20.1
7	17.9	17.8	20.6	20.5
7.5	18.2	18	21.1	20
8	18.4	18.3	21.6	21.6
8.5	18.8	18.7	22.2	22.2
9	19.1	19.1	22.8	22.8
9.5	19.5	19.5	23.4	23.5
10	19.8	19.9	24	24.1
10.5	20.2	20.3	24.6	24.8
11	20.6	20.7	25.1	25.4
11.5	20.9	21.2	25.6	26.1
12	21.2	21.7	26	26.7
12.5	21.6	22.1	26.4	27.2
13	21.9	22.6	26.8	27.8
13.5	22.3	23	27.2	28.2
14	22.6	23.3	27.6	28.6
14.5	23	23.7	28	28.9
15	23.3	23.9	28.3	29.1
15.5	23.6	24.2	28.6	29.3
16	23.9	24.4	28.9	29.4
16.5	24.2	24.5	29.2	29.6
17	24.5	24.7	29.4	29.7
17.5	24.7	24.8	29.7	29.8
18	25	25	30	30

**Tablo1.4. Yasa ve Cinsiyete göre BMI-Obezite iliskisi (Cole, Bellizzi et al. 2000)**



### 1.1.5. Yag Doku ve Adipogenezis:

Normal BMI'e sahip insan vücudunda total yag hücresi sayisi  $40 \times 10^9$ - $60 \times 10^9$  arasındadır. Çocuklukta obezite gelisir ise bu sayi 2-3 kat kadar artabilir. Daha önceleri sadece trigliserid depolayan bir hücre oldugu sanilirken son yillarda yapılan çalismalar ile yag hücrelerinin bir endokrin bez gibi çalistigi ve birçok peptid salgiladigi ortaya konmustur. Yag hücrelerinin vücutta önemli iki etkisi vardir;

1. Metabolizma üzerine olan etkileri
2. Immün sistem üzerine etkisi ve vücutta iki tür yag doku bulunmaktadır;
  - **Beyaz yag doku** : Enerji depolar.
  - **Kahverengi yag doku**: Enerji harcanmasini saglar. Sadece memelilerde bulunan kahverengi yag doku, insanda yalnızca yenidoğan döneminde saptanir(Camp, Ren et al. 2002).

**Yag hücreden salgılanan peptid ve diger substratlar;** leptin, adipsin, açilasyon stimüle edici protein, TNF -alpha, plazminogen aktivatör inhibitör -1, Interlökin- 6, serbest yag asitleri (FABP'lar, lipotransin, prostaglandinler, perilipin, monobutirin, fosfolipid transfer protein, anjiotensinojen, lipoprotein lipaz, laktat, rezistin ve adiponektin olarak sıralanabilir. Sıralanan bu peptid veya substratlardan sitokin yapısında olanlara (leptin, TNF-a, adiponektin, rezistin ve IL-6) adipositokinler veya adipokinler adi verilmektedir. Adiponektinler ise obezite ile insülin rezistansi arasındaki ilişkiyi kuran en önemli peptiddir. Adipokinler ile obeziteye ait birimler arasındaki ilişki aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Hotamisligil 2000),(Cummings and Schwartz 2003).

**Tablo 1.5. Adipokinlerin doku dagilimi ve obezite iliskisi (Ozata 2003)**

<b>Adipokinler</b>	<b>Doku dagilimi</b>	<b>Obezite</b>	<b>Insülin Rezistansi</b>	<b>Glukoz</b>
Leptin	Yag doku, mide, plasenta	?	?	?
TNF-a	Yag doku, makrofaj, lenfosit	?	?	?
adiponektin	Yag doku	?	?	?
Rezistin	Yag doku	?	?	?
IL-6	Yag doku, immün hücreler, fibroblast, endotel hüç., miyozit, endokrin hüç.	?	?	?

### **1.1.6. Adipositlerin Antisteatotik Fonksiyonlari:**

Adiposit hücreleri vücutta yag asitlerinin trigliserid olarak depolandigi tek hücre tipidir. Vücuttaki diger hücrelerde ise çok küçük miktrda trigliserid depolandiginda bu hücrelerin yapilari bozulur, fonksiyonlarini tam olarak yerine getiremez hale gelirler hatta eger asiri miktarda lipid depolanmak zorunda kalinirsa (steatozis) hücreler apoptozise giderler (Unger 2002; Unger and Orci 2002). Kolay besin saglanmasi durumunda enerji gerektiğinde kullanılmak üzere adipositlerde depolanir. Böylece adipositler diger hücrelerde lipid birikimini önleyerek onlari korurlar. Eger vücutta adiposit doku olmaz ise non-adipoz hücreler kalori fazlaligini dopolayarak yapi ve fonksiyonlari bozulduğu için islevlerini tam olarak yerine getiremezler. Örneğin yag dokunun olmadigi konjenital lipodistrofide yag dokusu; karacigerde, kalbde, kaslarda ve beta hücrelerinde biriktiginden hepatik steatozis, insülin rezistansi, siddetli tip II diabetes mellitus ve kardiyomyapati görülür (Oral, Simha et al. 2002).

### **1.1.7. Bu Doktora Tez Çalışmasında Analiz Edilen Pediatrik Obezitede Etkisi Olabilecek Gen Değişimleri:**

#### **1.1.7.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1:**

Plazminojen Aktivatör İnhibitör –1 Serin Proteaz İnhibitör ailesi üyesidir, doku tipi ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörleri (t-PA ve u-PA)'nin majör inhibitörüdür. PAI-1 sadece fibrinolizisi inhibe etmekle kalmaz aynı zaman sellüler matriks ile kompleks interaksiyonlar yaparak proteolizisi de inhibe etme özelliğindedir(Slivka and Loskutoff 1991; Fogo 2003). *in vivo*'da primer görevi doku tipi plazminojen aktivatörünün hızlı bir şekilde inhibisyonudur, yani t-PA'nin ve u-PA'nin fizyolojik inhibitörüdür. Plazminojenin proteolitik aktivatörüdür. Glikoprotein yapısındaki latent formu ve vitronektinle birlikte aktif form halinde bulunur. (Humphries, Green et al. 1992; Humphries, Lane et al. 1992). PAI-1 geni 7. kromozomun kısa kolunda q21.23-q22'de lokalize olmuştur, 9 ekzon ve 8 introndan oluşur ve yaklaşık 12.3 kb'lık bir alana yayılmıştır. İlk kez 1986 yılında Ny ve ark. tarafından klonlanmış tüm genin dizisi analizi yapılmıştır ve genin 379 aminoasit kodladığı gösterilmiştir (Ny, Sawdey et al. 1986).

Karaciğer, endotel hücreleri, trombositlerden, düz kas hücrelerinden, makrofaj ve adiposit hücrelerden salgınır(Juhan-Vague, Alessi et al. 2003; Berberoglu, Evliyaoglu et al. 2006). Özellikle endotel ve trombositlerden elde edilen PAI-1 lokalizasyonu yalnızca normal koagülasyon ve fibrinolizis için değil arteriosklerotik plaklar civarındaki trombotik olaylarda önemlidir. Plazma PAI-1 konsantrasyonu fibrinolitik aktivitenin önemli belirleyicilerindedir. Yüksek PAI-I düzeyinin angina pectoris, derin ven trombozu, diyabet, insülin rezistansı (IRS), miyokard enfarktüsü gibi çeşitli rahatsızlıklarla ilişkili ve 45 yaş altı erken miyokard enfarktüsünde bağımsız reinfarksiyon ajanı olduğu gösterilmiş ise de (Hamsten, Wiman et al. 1985) daha sonra yapılan iki çalışmada bu yıllarda plazma PAI-1 düzeylerini yükselten bir değişim olan 4G/5G polimorfizmiyle bir ilişkisi bulunamamıştır (Burzotta, Di Castelnuovo et al. 1997; Doggen, Bertina et al. 1999). Ancak IRS'in atherotrombotik komplikasyonlarının PAI-1 seviyesinin yükselmesine bağlı fibrinolizis bozuklukları olduğu bilinmektedir. Her ne kadar mekanizma tam anlamıyla aydınlatılmamış ise de, PAI-1 seviyesinin düşürülmesi ile obez farelerde adipogenezisin

düsürülmesi PAI-1'in yağ doku miktarini kontrol edebilecegini göstermektedir. (Schafer, Fujisawa et al. 2001; Berberoglu, Evliyaoglu et al. 2006)

Doku tipi ve ürokinaz tipi doku faktörlerinin inhibisyonunun hizli bir sekilde gerçekleştirilmesi PAI-1 tarafından saglanır. Reaktif peptid baglanma bölgesi Arg<sup>346</sup>-Met<sup>347</sup>, dir(Pannekoek, Veerman et al. 1986). Diger Serpin ailesi üyeleri gibi substrati olan proteinazların aktif Serin bölgeleri ile önce reversibl bir bag olan hidroksil grupları ile baglanır. Molekül yapısında reaktif merkez olarak görev yapan ve negatif yüklü 350-355. aminoasitleri ile t-PA'nin 296-304. ve u-PA'nin 179-184. pozitif yüklü aminoasitleri arasında kovalent bag olusturularak, inhibisyonları saglanmış olur (Kruithof, Tran-Thang et al. 1984).

PAI-I; TNF, IL-1, Transforming Growth Faktör  $\beta$ , Lipopolisakkaritler, Forbol Esterleri, Glukokortikoid hormonlar, VLDL, İnsülin gibi bazı ajanlar tarafından regüle edilir. Bu regülatör genlerin çoğu post-transkripsiyonel düzeyde etki etmektedirler. Örneğin insülin mRNA stabilitesini artırır. Sitokinlerin daha az düzeydeki etkileri sonucu PAI-1 gen transkripsiyonu düzenlenir (Laurin and Lundstrom 1987; Mayer, Lund et al. 1988; Riccio, Lund et al. 1988; de Boer, Abbink et al. 1991). Dolayısıyla PAI-1, vasküler hastalıklar ile ilişkisinin yani sıra grubumuz tarafından pediatrik yaş grubunda ilk olarak gerçekleştirilen 4G/5G polimorfizm çalışmasında da gösterildiği gibi inflamasyon ve obezite ile de ilişkili bir gen dir (Berberoglu, Evliyaoglu et al. 2006).

-675 4G/5G polimorfizmi eklenen veya çıkan bir Guanin nükleoti ile promotor bölgede -675 de lokalize 4G veya 5G genotipinin ortaya çıkmasını sağlar. PAI-1 geni promotorunda -675 pozisyonundaki transkripsiyon başlangıç noktasındaki aktivatör ve represör baglanma bölgesidir. İnsan karaciger hücre kültürü çalışmalarında elde edilen çekirdek proteinlerinin genin promotor bölgesindeki baglanmaları incelendiğinde, bu iki allelden 5G allelinin ek bir protein baglanma bölgesi içerdiği gösterilmiştir. Bu bölge 4G allelinde ortadan kalkmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda da bu doğrulanmış ve spesifik 5G allelini tanıyan ve bu bölgeye baglanan ilişkili NF $\kappa$ B grubu transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır (Dawson, Wiman et al. 1993).

4G/5G polimorfizminin transkripsiyondaki etkisi araştırıldığında, Hep G2 insan hepatoma hücrelerinin kısa süreli transfeksiyonunda oluşturulan kimerik yapıda PAI-1 promotörü ile bakteriyel kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) gen ürünü her iki alelik sekansta farklı miktarlarda olmuştur. Oluşturulan bu yapıda IL-1 stimülasyonu sonucu üretilen CAT mRNA miktarı ölçüldüğünde 4G allelinin 5G aleline oranla 6 kat fazla mRNA oluşturduğu görülmüştür (Eriksson and Saldeen 1995). Temel şartlar gözönüne alındığında bir nükleotidik insersiyon / delesyon sonucu oluşan alleller arasında bir fark bulunamamıştır. Bu değişiklik fonksiyoneldir -675 noktasında IL-1 stimülasyonu altında PAI-1 transkripsiyonunu hızlandırır. Bu akut faz cevabının asıl düzenleyicisidir (Eriksson, Kallin et al. 1995). IL-1 stimülasyonu olmadan da 4G allelinin daha yüksek promotor aktivitesi gösterebilir mi sorusuna bu tez çalışması kapsamında hücre kültürü çalışmaları ile cevap verilmiştir (Ozel D. 2006).

Yüksek promotor aktivitesi yani 4G alleli ile artan PAI-1 düzeyleriyle miyokard enfarktüsü, hastalarda ve sağlıklı kontrollerde yapılan çalışmalarda anlamlı bulunmuştur (34%-16%) ve bu gözlemler birçok çalışmayla desteklenmiştir oranlar 20% ile 6% arasındadır. Bu çalışmalarda PAI-1 4G/5G genotipinin düzenleyicisi olduğu plazma PAI-1 düzeylerinin hastalarda sağlıklı kontrol grubundan daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır (Dawson, Wiman et al. 1993).

Fonksiyonel promotör -675 PAI-1 4G/5G polimorfizmi genin transkripsiyonunu düzenleyen nükleer proteinlerin bağlanmasını etkilemektedir. Bir çok yayında metabolik sendrom ile ilişkili bulunmuştur. Son çalışmalar insülin rezistansinin inflamasyona yol açtığını, inflamasyonun da insülin rezistansini indüklediğini göstermektedir. Inflamasyon kemokinleri ise başlıca; monosit kemoatrakt protein-1 (MCP-1), sitokinler ve en önemlisi metaloproteaz inhibitörleri olan plazminojen aktivatör-1 ve mitojen aktivatör protein kinazlardır. Interlökin-1, tümör nekrozis faktör- $\alpha$ , adiponektin ve rezistin ve PAI-1 adipöz dokudan yüksek miktarda eksprese edilirler ve TNF- $\alpha$  PAI-1 seviyesini artırmaktadır. Dolayısıyla inflamasyon-obezite etkileşiminde PAI-1 seviyesi en az diğer sitokinler kadar önem teşkil etmektedir (Saltiel 2001; Banerjee, Rangwala et al. 2004; Combs, Pajvani et al. 2004).

Sonuç olarak 4G/5G polimorfizmi PAI-1 promotorunda aktivasyonda ve gen ekspresyonunda fonksiyonel olarak önemlidir. 4G alleli bireysel kardiyovasküler riskleri ve obezite riskini artırır. PAI-1 düzeyi akut faz durumlarında fibrinolizisin düzenlenmesi ile trombotik hastalıklarda ve obezitede 4G/5G genotipine bağlı olarak düzenlenen plazma seviyesi sonucunda genotipe bağlı olarak bir major risk faktörü görevi görür (Eriksson and Saldeen 1995).

#### **1.1.7.2. Melanokortin 4 Reseptör Geni:**

Melanokortin 4 Reseptör (MC4R) geni 1993'de Gantz ve ark. tarafından kromozomal in-situ hibridizasyon yöntemiyle 18q21.3 de lokalize bir gen olarak tanımlanmıştır. 1994'de Magenis ve ark. tarafından yapılan floresan in-situ hibridizasyon (FISH) çalışmaları ile 18q22 'de lokalize olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra Sundaramurthy ve ark. da bu veriyi teyit etmiştir.

7 transmembran G-protein reseptör ailesinin 4. üyesidir. RNA blot ve in-situ hibridizasyon yöntemleri ile beyinde primer sentez edildiği, adrenal kortekste, melanositlerde ve plasentada ekspresyonunun olmadığı bulunmuştur. 333 amino-asitten oluşan MC4R proteini tek ekson tarafından kodlanmaktadır (Gantz, Konda et al. 1993; Gantz, Miwa et al. 1993).

MC4R'ü gıda alimında, enerji harcanmasında erektil fonksiyonda rol oynayan bir reseptördür. Alfa-Melanin sitümüle edici hormon, bu reseptörü stimüle ederken agouti ilişkili peptid (AgRP) inhibe eder. Yapılan çalışmalarda obezlerde en fazla saptanan gen mutasyonları MC4R da bulunmaktadır. Tek gen mutasyonuna bağlı obezitede endokrin defektin ortaya çıkmadığı tek gen MC4R genidir. Vücut kütle indeksinin yüksek olması durumunda yani obezitede kalitimin rolü büyük olsada sık görülen ve tek gen değişimi ile direkt olarak defektin ortaya çıkmasına neden tek gen MC4R genidir. Türkiye'den rapor edilen yeni tanımlanmış MC4R gen değişimlerinin yer aldığı çalışmada sadece 40 obez olgunun çalışmaya alınmasıyla defektin tanımlanması MC4R mutasyonlarının Türkiye'de belirli bir sıklıkta olduğunu düşündürmüştür (Mergen, Mergen et al. 2001).

1998'de UK ve Fransa gruplari tarafından rapor edilen dominant kalitim örneği gösteren heterozigot MC4R mutasyonlu aileler bulunmaktadır. Bu iki grup tarafından ilk rapor edilen heterozigot MC4R mutasyonlari otozomal dominant erken dönem obezitesi ile ilişkilendirilmiş çerçeve mutasyonlaridir. Bu yıllardan sonra 70 den fazla MC4R mutasyonu farklı etnik gruplarda rapor edilmiştir (Vaisse, Clement et al. 1998; Yeo, Farooqi et al. 1998). MC4R mutasyon sikligi erişkin obez grub için % 0.5-1 ve çocukluk çağı obezitesinde ise % 6 olarak bildirilmektedir. Ayrıca MC4R gen defektlerinin frajil X sendromu, prader-willi sendromu gibi sendromlarda anlamlı olduğu bilinmektedir. Bazı çalışmalar MC4R heterozigot defektli probandlarda %100 penetrans ile erken dönem obezitesinin görüldüğünü rapor ederken bazı çalışmalarda zorunlu taşıyıcılar ile obez olmayan bireyler bildirilmiştir (Farooqi, Keogh et al. 2003; Tao 2005).

### **1.1.7.3. Tümör Nekrozis Faktör Alpha (TNF-a):**

Tümör nekrozis faktör alfa multifaktoriyal bir proinflamator sitokindir. Lipid metabolizması üzerine, koagülasyona, insülin rezistansı ve endotel fonksiyonuna etkilidir. Genel olarak antitümör etkisi ile bilinen TNF-a, kardiovasküler hastalıklarda da koagülasyondaki etkilerinden dolayı önemlidir. Özellikle miyokardiyal iskemilerde kronik kalp hasarlanmaları ve ateroskleroziste endotel kaynaklı vasodilatasyonu indüklemesi ve oksidatif stresi artırarak NO salınımını azaltmasından dolayı önemlidir (Thirunavukkarasu, Watkins et al. 2006).

TNF, fare ve tavşan denemeleri ile *Mycobacterium bovis*, *Bacillus calmette-guerin* ve daha sonrada endotoksin ile enfeksiyon sonrası bulunmuştur. Hayvanların serumlarında hemorajik nekroz yaratan transplante edilmiş tümörleri baskılayan bir faktör tespit edilmiştir (Pennica, Nedwin et al. 1984), daha sonra yapılan cDNA klonlaması ile gen tanımlanmıştır (Wang, Creasey et al. 1985).

TNF-a ve beta biyolojik aktiviteleri açısından benzerlik gösterir. TNF beta ile %30 a.a homolojisine sahiptir. 4 exonluk prekürsör TNF-a 230 a.a.'i kodlar. Lider dizi çıkarıldığında olgun TNF 157 a.a.'den oluşur (Old 1985).

TNF-a ve TNF- $\beta$  tümör hücre yüzeyinde ortak bir reseptöre bağlanırlar. In-vitro çalışmalarından bu yüzey reseptörünün  $\gamma$ -interferon ile upregüle edildiği bilinmektedir. Bir çok interferonun TNF 'in anti-tümör etkisine sinerjik etki mekanizması bu regülasyonu açıklamaktadır (Aggarwal and Kohr 1985).

Brenner ve ark. 1989 yılında yaptıkları çalışma ile TNF-a'nin JUN onkogeninin ekspresyonunu stimüle ederek uzun dönem etkisini sürdürmesini sağladığını göstermişlerdir. JUN onkogenleri AP-1 transkripsiyon faktörünü kodlarlar. AP-1 de kollojenaz gen transkripsiyonunu stimüle eder.(Brenner, Rippe et al. 1989)

TNF-a 'nin tümör baskılanmasına etkisini aynı zamanda bir tümör markiri olan seramide ile de göstermek mümkün olmuştur. Yapılan çalışmalarda ortama TNF-a ilave edildikten 10 dak. sonra intraselüler seramid konsantrasyonunun %45 arttığı tespit edilmiştir. Seramide DNA fragmanlarını indükleyerek apoptozisin başladığını gösteren erken apoptozis isaretleyicisi olması nedeniyle TNF-a'in tümör baskılayıcı etki mekanizmasını göstermektedir (Obeid and Emery 1993).

641 miyokard enfarktüsli hasta ve 710 kontrol grubundan oluşan çalışma ile TNF-a -308 promoter G/A polimorfizminin koroner kalp hastalıkları ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Hermann, Wildgrube et al. 1998).

İnsan ve kemirgen obezite çalışmalarında adipoz dokudan TNF-a ekspresyonunun artmış olduğu rapor edilmiştir. Dolayısıyla TNF-a obezitede aday gen halini almıştır. Hindistan'dan bildirilen ilk obezite çalışmalarında TNF-a yakınındaki (10kb) 3 dinükleotid tekrarlarından oluşan polimorfizm çalışılmıştır. P: 0.002 olacak şekilde BMI ile TNF-a yakınındaki polimorfizimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. -308 GA değişimi ise farklı gruplar tarafından çalışılmış ve insülin, glukoz ve lipid metabolizmaları ile dolasımdaki hormonal dengeyi etkileyerek obezitede önemli olduğu rapor edilmiştir (Norman, Thompson et al. 1997).

TNF-a'nin normalden fazla eksprese olması NAD(P)H oksidazın aktivasyonunu indükler. Metabolik sendromda endothel disfonksiyonuna neden olan serbest halde  $O_2^-$  ortaya çıkar. TNF-a bu özelliği ile metabolik sendromda endotel disfonksiyonu yapar.



Nötralizasyon antikor çalışmaları ile TNF- $\alpha$ 'nin metabolik sendromda fonksiyonu test edilmiştir. TNF- $\alpha$  ve NAD(P)H oksidaz alt ünitelerinin mRNA'larının ekspresyonu metabolik sendromda artmaktadır. Obez fare deneylerinde metabolik sendrom tablosunda TNF- $\alpha$  mRNA'sinin 5 kat, plazma konsantrasyonunun 8 kat ve protein ekspresyonunun 3 kat arttığı rapor edilmiştir (Picchi, Gao et al. 2006).

#### **1.1.7.4. Yağ Asiti Bağlanma Proteini 4 (FABP-4, aP2):**

Baxa ve ark. tarafından 1989'da H-ALBP olarak tanımlanmıştır. 15 kD'luk aP2 proteini insan adipoz doku total sitosolik proteinlerinin yaklaşık %1'ini oluşturur. Aynı grup tarafından 132 a.a.'lik polipeptidi kodlayan FABP4 tüm cDNA'ı klonlanmış ve tirozil kinaz fosforilasyon konsensus dizisi aydınlatılmıştır (Baxa, Sha et al. 1989). Sitoplazmik lipid bağlanma protein ailesinin bir üyesidir. Adipositlerden ve makrofajlardan ekspresyon edilir. Yapılan hayvan deneylerinde aP2 geni defektlerinin obezite, obezite ile uyarılmış insülin rezistansı ve tip II diabetes için dirençlilik oluşturduğu bildirilmektedir. aP2 defektli farelerde trigliseritler anlamlı derecede düşer ve aterosklerozis için koruyucudur. 1996 yılında aP2 genin fonksiyonu homolog rekombinasyon ile oluşturulan murin mutasyon çalışması ile aydınlatılmıştır. Yapılan mutant hayvan deneylerinde aP2 defektli hayvanların gelişimsel ve metabolik bozuklukları olmadığı görülmüştür. aP2<sup>-/-</sup> fareler yüksek yağlı ve kalorili diyetle sokulduklarında ise kontrol farelerine göre daha fazla kilo almalarına rağmen ilginç bir şekilde insülin rezistansı veya diabetes görülmemiştir (Hotamisligil, Johnson et al. 1996). aP2<sup>-/-</sup> çalışma grubu TNF alfa açısından değerlendirildiğinde ise yağ dokudan TNF- $\alpha$  ekspresyon etmedikleri tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak aP2 geninin obezite-insülin rezistansı yolunda temel rol oynayan genlerden biri olduğu anlaşılmıştır (Hotamisligil, Johnson et al. 1996).

1997'de ise FABP4 geninin 4 eksondan kodlandığı tespit edilmiştir (Prinsen, Weghuis et al. 1997). Somatik hücre PCR'i ile hibrid panel ve floresan in-situ hibridizasyon yöntemleriyle 1997'de FABP4 geninin 8q21'de lokalize bir gen olduğu anlaşılmıştır (Prinsen, de Bruijn et al. 1997; Prinsen, Weghuis et al. 1997).

Geçmiş yıllardan bugüne inflamasyon ile obezitenin ilişkili olduğu bilinmektedir. Kronik ve lokal inflamasyon, tip II diabetes gibi potansiyel metabolik hastalıklarla

iliskilidir. Deneysel modeller adipositlerden ve makrofajlardan salinan FABP ailesinin metabolizmadan ve inflamasyondan sorumlu yolakta etkili oldugunu göstermistir (Saltiel 2000; Saltiel 2000).

Sitoplazmik lipid sapheronlari olan FABP ailesi üyeleri fonksiyonel hedef dokulara interaksiyon için yag asitlerinin ve lipid sinyallerinin sellüler geçisini düzenlerler. Adipositler ve makrofajlar FABP ailesinin ayni iki üyesini eksprese ederler. FABP-4 (aP2) ve FABP-5 (mal 1)(Stewart 2000; Haunerland and Spener 2004). Adipositlerde FABP ailesinden aP2 predominant olarak bulunur, mal1 ise minor izoformudur. Ancak aktive makrofajlarda iki izoformda benzer seviyede eksprese edilirler ve inflamasyon ve metabolik mediatörler tarafından regüle edilirler (Makowski, Boord et al. 2001; Fu, Luo et al. 2002).

Deneysel hiperkolestrollü aP2 defektli hayvan modelleri de düşük trigliserit, obeziteyle gelen yükselmis insülin sensitivitesi ve aterosklerozdan korunum tespit edilmistir(Makowski, Brittingham et al. 2005; Makowski and Hotamisligil 2005). Hücre kültürü çalismalarindan alinan verilere göre ise T-87C promoter degisimi aP2'nin C/EBPa'nin tanima bölgesine baglanmasini azaltir ve anlamlı derecede aP2 promotorunun transkripsiyonel aktivasyonunu bozar. Dolayisiyla T-87C promoter degisimi aP2geni ekspresyonu negatif baskilar(Tuncman, Erbay et al. 2006).

Insan adipoz doku biyopsi çalismalarinda ise T-87C promoter degisimini tasiyan bireylerde normal bireylere göre adipoz dokunun %63 az oldugu görülmüstür. aP2 mRNA ekspresyonu T-87C pozitif bireylerde daha düşük bulunmustur (Tuncman, Erbay et al. 2006).

#### **1.1.7.5. Interlökin-6 Geni:**

Interferon beta-2; IFNB2, Beta hücre diferansiyasyon faktörü, B-hücre uyarici faktör-2, hepatosit stimülatör faktör, hibridoma büyüme faktörü gibi birçok alternatif adlandirmasi yapilan gen 7p21'de lokalizedir. 1986 yilinda Sehgal ve ark. tarafından blot-hibridizasyon cDNA klonlari ile yapilan insan-kemirgen somatik hücre hibrid çalismasiyla haritalanmistir (Sehgal, Zilberstein et al. 1986). Ayni yil Zilberstein ve ark. 1.3 kb'lik

IL-6 RNA'si için cDNA'i klonlamislardir. Ekspresyon çalismalari kemirgen hücre serilerinde IFN-beta-2'dan 21 kD'luk protein salindigini ve bu proteinin insan IFN-beta-1 proteini antikori ile nötralize edildigini ancak alfa veya gama interferon ile uyumsuz oldugunu göstermistir (Zilberstein, Ruggieri et al. 1986). INF-beta- 2, INF-beta-1'in indüklenmedigi metabolik stres kosullarinda uyarilir. Ayni zamanda IL-1 ve TNF tarafından uyarildigi için otokrin görev yapar, inflamasyonda sitokinleri, akut faz reaktanlarini ve hücre proliferasyonunu regüle eder (Sehgal, Zilberstein et al. 1986).

INFB2'nin Beta hücre farklılaşma faktörü 2 (BSF2) ile es olduğu bilinmektedir. Hibrid-plazmasitoma hücrelerinde proliferasyonu artırıcı etki yapmaktadır. 1986'da Hirano ve ark. tarafından BSF2 cDNA'i ile genin yapı ve fonksiyonu açıklanmıştır. 184 a.a.'i bulunmaktadır ve diğer interlökinlerden gen haritası üzerinde uzakta bulunur. Antiviral aktivitesinin yanı sıra beta-2 interferon karaciğerde akut fazdan sorumludur. (Hirano, Yasukawa et al. 1986)

1988'de Chen ve Ferguson-Smith grubları tarafından cDNA problemleri kullanılarak IFNB2 geni insitu hibridizasyon ile 7p21-p15'de haritalanmıştır (Ferguson-Smith, Chen et al. 1988; Chen, Shulman et al. 1991). Somatik hücre hibridlerinin southern blot yöntemi ile harita kesinleştirilmiştir. Aynı yıl EBV ile enfekte B hücrelerinin büyümesini başlatan monosit kaynaklı faktörün IFNB2 olduğu anlaşılmıştır (Tosato and Pike 1988). Bowcock grubu ise linkage çalismalari ile IL-6'nin 7p21'de lokalize oldugunu, Sutherland grubu ise 7p15'de lokalize oldugunu rapor etmişlerdir (Bowcock, Kidd et al. 1988; Sutherland, Baker et al. 1988).

IL-6 bir immünoregülatör sitokindir. Hücre yüzey sinyal iletim elemanlarını ve gp130 sinyal reseptörünü aktive eder. 2003 yılında 3.65 çözünürlükte ekstraselüler sinyal kompleksinin kristal yapısı çözülmüştür. Kristal yapı termodinamik olarak 10 simetrik arabirimden oluşan heksamerik bir yapıdır (Boulanger, Chow et al. 2003).

IL-6 aynı zamanda osteoporoz çalismalarında hedef gen olarak seçilmiştir. IL-6 hücre yüzey reseptörüne (IL6R) bağlanmayı uyararak osteoklastları indükler ve kemik hücre yıkımını artırır. Dinükleotidlik tekrarlarından oluşan polimorfizimlerle osteoporoz

arasında ilişki kuran çalışmalar istatistiksel olarak çok anlamlı bulunmuştur (Ota, Hunt et al. 1999).

Dolayısıyla yer alan IL-6'nin 1/3'ü adipoz dokudan salınır. -572 ve -174 G/C değişimleri haplotiptir. -174G/C polimorfizmi ile obezite arasında ilişki tespit edilmiştir. BMI'leri 28 ve üzeri olan kilolu bireylerde CC genotip sıklığının anlamlı olduğu ve 5 kat kadar IL-6 serum seviyelerinin arttığı rapor edilmektedir. Obezite, adipoz doku miktarının arttığı insülin rezistansı ve kardiovasküler risk artışı ile karakterizedir (Mohlig, Boeing et al. 2004). Adipoz dokudan önemli miktarda salınan IL-6, Fransa'da yapılan bir çalışmada IL-6 ekspresyonunu artıran -174 G/C promoter polimorfizmi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Berthier, Paradis et al. 2003). Beyaz ırka ait çalışmalarda CC genotipinin glukoz seviyesini düşürdüğü, Amerika grubunda GG genotipinin diabete riski artırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Fernandez-Real, Broch et al. 2000). Buna karşın GG genotipinin, tip II diabete karşı koruyucu olduğu ve CC genotipinde IL-6 seviyesinin arttığı, dolayısıyla obezitede ve diabete anlamlı olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır. IL-6 ve insülin rezistansı, diabetes ilişkisi, etnik kökene özgü olabilecek şekilde etnik gruplara göre çelişik sonuçlar vermektedir (Fernandez-Real, Broch et al. 2000).

### **1.1.8. Gen Değişimlerinin Taranmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler:**

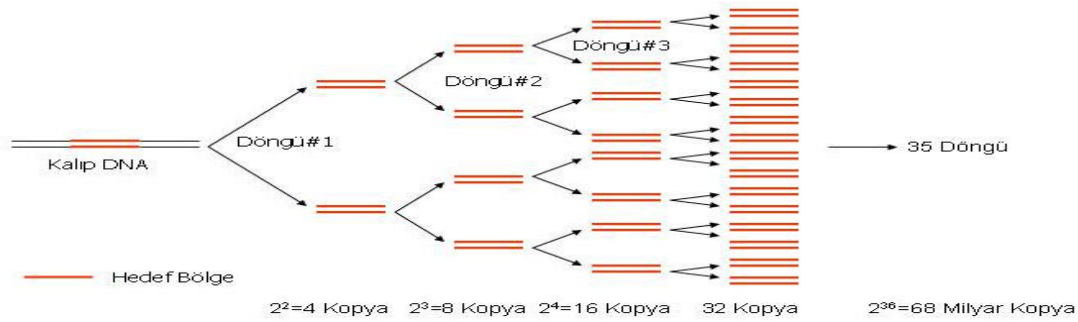
#### **1.1.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu:**

Moleküler Biyoloji alanında önemli yer tutan ve bir in-vitro nükleik asit çoğaltma metodu olan Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ilk kez 1985'de Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından bilim dünyasına sunulmuştur. Bu bulusundan dolayı K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülüne hak kazanmıştır.

Hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda tanıya yeni bir çığır açan PZR' u geniş uygulama alanı olan bir moleküler tekniktir. Metod basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır. (Saiki, Scharf et al. 1985).

Polimeraz zincir reaksiyonu belirli bir nükleik asit dizisinin, in vitro olarak amplifikasyonu yani belirli bir DNA bölgesinin klonlanmasıdır. Bu işlemler için istenilen nükleik asit dizisinin her bir zincirinin 3` ucuna tutunacak ve 5` yönünde uzayarak sentezlenecek DNA dizisini sınırlayan iki kısa nükleotid dizisi, oligonükleotid dizini (primer, 18-25 baz), uzamayı sağlayacak olan DNA polimeraz enzimi, yeni zincirlerin yapısında yer alacak nükleotidler (dNTPs) ve reaksiyon için gerekli tuzu içeren tampon solusyonundan oluşan bir karışım hazırlanarak tüp içerisinde in-vitro olarak sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezi gerçekleştirilir (Akar 1999).

DNA'nın çift sarmal yapısını bozup, tek zincir haline getirmek (denatürasyon) için 95-98°C, oligonükleotidlerin hedef bölgeye tutunması (hibridizasyon) için 37-68°C, zincirin uzaması (polimerizasyon) ve çift zincirli DNA'nın oluşturulması için 72 °C sıcaklık gerekmektedir. Bu üç farklı siklusun ardarda 25-35 kez tekrarlanması termal blok adı verilen cihazlar ile sağlanabilmektedir. Primerler ile uzama safhasında sentezlenen ürünler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bu sayede hedef DNA kopya sayısı her döngüde yaklaşık olarak iki katına çıkar. Böylece 35 döngü sonunda polimeraz zincir reaksiyonu milyarlarca kat ( $2^{36}$ ) ürün verir. Bu teknikle; bir DNA hedefini  $10^6$ - $10^{12}$  logaritmik çoğaltmak mümkündür (Akar 1999).



**Sekil 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile hedef DNA dizinin logaritmik olarak çoğaltılması**

### **1.1.8.1.1. PZR 'u KOMPONENTLERI:**

#### **1.1.8.1.1.1. Polimeraz Enzimi:**

Taq Polimeraz; Polimeraz zincir reaksiyonunda enzim seçimi reaksiyon sonunda klonlanan bölgenin doğruluğu açısından önemlidir. Saflastırılmış DNA polimerazları içerisinde polimeraz zincir reaksiyonunda en çok kaplıcalar gibi sıcak yaşam alanlarına adapte olmuş *Thermus aquaticus* bakterisinden saflastırılmış Taq polimeraz kullanılır. Denatürasyon basamağında yüksek sıcaklıkta aktivitesini koruması açısından tercih edilir (Akar 1999).

#### **1.1.8.1.1.2. PZR'da Kullanılan Tamponlar:**

Standart PZR tamponu 50 mM KCl, 10 mM Tris.Cl (oda ısısında pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ihtiva eder. Bazı tamponlarda BSA (Bovine Serum Albumine) veya gliserol'de bulunabilir. Mg<sup>+2</sup>'un optimal konsantrasyonu oldukça düşük olduğundan (1.5 mM); DNA hazırlama aşamasında Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) gibi yüksek konsantrasyonda selasyon yapıcı ajanların bulunmaması gerekir. Mg<sup>+2</sup> içermeyen tampon kullanılıyor ise son konsantrasyon 1,5 -2 mM olacak şekilde 25-50 mM 'lik stok Mg<sup>+2</sup> 'dan eklenir (Akar 1999).

#### **1.1.8.1.1.3. dNTP'ler:**

Serbest deoksiribonükleotid trifosfatlara Polimeraz zincir reaksiyonunun uzama safhasında ihtiyaç bulunmaktadır. dNTP'lerin, bir PZR reaksiyonu sırasında, optimal özgüllüğü sağlamak üzere konsantrasyonu 0,2- 0,25 mM düzeyinde olmalıdır (Akar 1999).

#### **1.1.8.1.1.4.Sentetik Oligonükleotidler:**

Primerler yani hibridasyon aşamasında görevli oligonükleotidler gene özgü olarak dizayn edilirler. Amplifiye edilmesi istenilen gen dizisini sağdan ve soldan sınırlayacak şekilde hazırlanırlar. İleri ve geri oligonükleotidler böylece PZR'unun hibridasyon aşamasında gene bağlanarak amplifikasyonu başlatırlar (Akar 1999).

### **1.1.8.2. Restriksiyon Endonükleaz Fragman Uzunluk Polimorfizm Analiz (RFLP) Yöntemi:**

Restriksiyon Endonükleaz enzimler moleküler biyolojide en sık kullanılan, en önemli enzimler arasında yer alırlar. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç farklı tanıma bölgesine sahip restriksiyon endonükleaz enzimleri sentezlerler. Bu enzimlerin esas görevleri dışardan bakteriye giren yabancı genetik materyalleri mutasyonlara mani olmak ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumak için etkisiz hale getirmektir. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin çalışma prensibi DNA çift zincirini spesifik dizilerden endonükleaz aktivitesiyle kesilmesine dayanır. Ancak bu enzimlerin en büyük özellikleri çift sarmal DNA' yi belirli dizilerden kesme özelliğinde olmalarına rağmen bu enzim aktivasyonunun sadece metillenmemiş DNA dizilerinin her iki zincirden fosfodiesteraz aktivitesi ile kesilmesine dayanmasıdır (Akar 1999).

Dolayısıyla organizmalar kendi DNA' larını sahip oldukları restriksiyon endonükleazlarının tanıma bölgelerini metilleyerek korumaktadırlar. Ancak yabancı organizmalara ait DNA' lar bu restriksiyon endonükleazları için tanıma bölgesi metillenmiş olmadıklarından hedef haline alır ve fosfodiester bağları kırılarak kesilir. Bu enzimlerin bir çoğunun tanıdığı bölge palindromiktir. Yeni oluşan parçalar birbirine iki yönlü olarak simetriklerdir. İzosizomer restriksiyon endonükleaz enzimler ise; farklı mikroorganizmalardan elde edilip, DNA üzerinde aynı diziyi tanıyıp kesim yapan enzimlerdir (Beauchamp, Daly et al. 1994; Rolfs, Kallisch et al. 1994; Rolfs and Weber 1994; Akar 1999). Bakterilere ait restriksiyon endonükleaz enzimleri bu özellikleri kullanılarak mutasyon analizinden klonlamaya, kriminolojiden genetik haritalamaya kadar birçok moleküler biyolojik analizde çok sık kullanılan tekniklerden biridir (Akar 1999).

### **1.1.8.3. Sanger Yöntemi ile DNA Dizi Analizi:**

DNA dizi analizi hedef DNA bölgesinin nükleotid dizisinin saptanma yöntemidir. İlk dizi analizi, 1960'lerin başında 75-80 nükleotidi kapsayan küçük tRNA' lar ile gerçekleştirilmiştir. Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar, Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ve Sanger dideoksi enzimatik

yöntemdir. İki yönteminde uygulanabilirliği için öncelikle taranacak gen bölgesinin PZR‘u sonrasında serbest oligonükleotidlerin ve dNTP‘lerin ortamdan uzaklaştırılması için temizleme işlemi yapılması gerekmektedir. DNA örnekleri hazırlandıktan sonra dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirilir ve yüksek voltaj jel elektroforezi ile sonuçlandırılır (Akar 1999).

#### **1.1.8.3.1.Maxam-Gilbert Yöntemi:**

Hedef DNA dizi bir uçtan P32 ile işaretlenir. İşaretli DNA dizisi dört örneğe bölünür. Her örneğe, DNA ‘daki bazlardan birini tahrip edecek kimyasal eklenir. Piperidine kullanılarak hasarlanmış bölgelerden DNA fosfodiester bağları kırılarak kesilir. Böylece P32 ile işaretlenmiş kısa-uzunlu DNA parçaları elde edilir. Elektroforez sonrası otoradyografik olarak DNA dizileri analiz edilir (Akar 1999).

#### **1.1.8.3.2.Sanger DNA dizi analizi Yöntemi:**

En sık kullanılan DNA dizi analizi yöntemi Sanger yöntemidir. Asimetrik amplifikasyon ile elde edilmiş tek iplikçikli DNA polimeraz enzimi ile ddNTP‘ler ile reaksiyona sokulur. ddNTP‘lerden biri floresan boya ile ya da P32 veya S35 gibi radyoaktiflerle işaretlenir. 2‘,3‘ dideoksinükleotidtrifosfatların klasik dNTP‘lerden farklılığı 3‘ ucunda bir hidroksil grubunun bulunmamasıdır. 5‘ trifosfat grubundan uzayan DNA dizisinde ddNTP‘lerin bağlandığı bölgede dNTP‘ler ile fosfodiester bağı engellenir. Dört farklı ddNTP reaksiyonu sonucu oluşan farklı uzunluktaki DNA dizileri floresan boya ya da radyoaktif isimaya göre analiz edilirler (Akar 1999).

#### **1.1.8.4. Klonlama Yöntemi:**

Basitçe moleküler klonlama istenilen DNA dizisinin izole edilmesi ve bunun bir başka taşıyıcı organizma içinde çok sayıda kopyasının elde edilmesi anlamına gelmektedir. Genellikle bakteriler bu amaç için kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılacak DNA dizisi bu yolla daha ileri incelemeler için yeterli miktarda elde edilebilir. Klonlama yöntemi için istenilen DNA dizisinin çoğaltılması amacı ile daha önce belirtilen PZR kullanılır.



Restriksiyon endonükleazları ile klonlamaya hazırlanan DNA örnekleri ligazlar ile vektörler içerisine sokulur (genetik 2003).

#### **1.1.8.4.1. VEKTÖRLER**

"Vektör" terimi, İngilizcede taşıyıcı anlamında kullanılmaktadır. 1970'lerde ise, DNA klonlamasında ki araçlar anlamında kullanılmıştır. Klonlamada sıkça kullanılan plazmidlerinde içinde bulunduğu vektör ailesi farklı dört tip içerir; Plazmidler, bakteriofaj lambda, kosmidler ve YAC kromozomları. Vektörler genel anlamda konakçı organizmada, konakçı organizmadan bağımsız olarak çoğalma özelliklerinden dolayı "REPLİKON" olarak da isimlendirilirler. Konakçılar bakteriler veya maya hücreleri olabilir. Bakteri ve mayalar laboratuvar ortamında rahatlıkla üretilen ve klonlama ile istenilen DNA dizilerinin yer aldığı vektörler ile enfekte edilmeleri sonucu çalışmaya uygun DNA miktarının sağlanabilmesine olanak sağlayan organizmalardır (genetik 2003).

##### **1.1.8.4.1.1. Plazmidler:**

Plazmidler, çoğu bakteri türünde bulunan, ancak her susta bulunmayan halkasal veya süper sarmalli DNA molekülleridir. Plazmitler, küçük moleküllerdir; bu açıdan bir karşılaştırma yapılırsa, bakteriyel kromozomun %20'si ile %4'ü arasında büyüklüklerde olduğu görülür. Plazmidler, bazı üreme koşullarında konakçı hücre için mutlaka taşınması gereken yapılar değildir. Bununla birlikte, pek çok plazmid, özel koşullara uyum sağlamak için önemli olan genler içerir (genetik 2003).

Bu genler, çoğu kez bakterinin plazmidi taşıdığına dair temel işaret olurlar. Örneğin rezistans gen içeren plazmid taşıyıp, çeşitli antibiyotiklere dirençli olan bakteriler, aynı plazmidi taşımayan bakterilerin yaşayamadığı antibiyotikli ortamlarda yaşayarak diğerlerinden ayrılırlar. Bu özellikleri ile plazmidler klonlama sonrası selektif hücre kültürü ile stabil hücre kolonilerinin oluşturulmasında kullanılırlar (genetik 2003).

Plazmidler aynı zamanda bir bakteriden diğerine (bakteriyel kromozoma entegre olabilenler) geçebilir. Plazmid DNAsi, Ca<sup>2+</sup>'li ortamda, plazmidi olmayan bakteriye

aktarilip; çok sayıda plazmid elde edilebilir. Dolayısı ile klonlamada elde edilen, istenilen DNA dizisini içeren plazmidler çalışmaya uygun miktarda çoğaltılabilirler. Klonlama için birkaç kb-100 kb arasında değişik büyüklükteki plazmidler kullanılmaktadır (genetik 2003).

Klonlama için plazmid seçimi yaparken; bir bakteri içinde replikasyon sırasında oluşturduğu kopya sayısı önem kazanmaktadır. Genel olarak plazmid ne kadar küçükse ve kopya sayısı ne kadar yüksek ise klonlamada o kadar başarılı olur. Bir plazmid genel olarak polilinker adı verilen klonlamanın yapılabileceği restriksiyon endonükleaz enzim tanıma bölgesi, antibiyotik rezistans bölgesi ve ORI adı verilen konakçı içinde proliferasyonu sağlayan replikasyon orijininin oluşur .

#### **1.1.8.4.1.2. Kosmidler:**

Kosmidler bir faj partikülü içine sokulmuş plazmid DNA yapısıdır. Sirküler DNA ihtiva ederler. Bir büyük plazmid gibi davranarak replike olurlar. Antibiyotik direnç genleri, değişik RE kesim noktaları ve faj lambda'nın cos noktasını taşıyan (cohesive end sites / Yapışkan son uç noktaları). COS bölgesi hedef DNA'nın lambda vektöre girmesine olanak sağlar. 45 kb büyüklüğüne kadar DNA parçalarının kosmidlerde klonlanması önemli bir avantajdır. Lambda faj ve plazmidler büyüklük açısından 25 kb ile sınırlıdır. Ayrıca kosmidlerin klonlamadaki diğer avantajları da transformasyon verimliliklerinin lambda faj ve plazmidlere oranla oldukça yüksek olmasıdır (genetik 2003).

#### **1.1.8.4.1.3. Bakteriofaj Lambda:**

Bakteriofaj Lambda yani faj'lar bakteriyi enfekte edebilen virüslerdir. Her fajın bir baş bir de kuyruğu vardır. DNA'yi taşıyan bir protein ile kaplıdır. Faj DNA'si iki ucu ile sirkülerize olur. Bu iki ucu cos noktaları (cohesive end sites / Yapışkan son uç noktaları) ismi verilir. COS dizileri 12 nükleotitten oluşur. İki uçtaki bu diziler birbirine komplementerdir. Birbirlerine bağlanıp konkamer yapısını oluşturabilirler ya da iki uç birlikte sirküler DNA yapısını oluştururlar. Lambda virion Nu1 ve A proteinlerini içerir. Bu proteinler COS dizilerini tanıyarak baş kısmına hedef DNA'nın girmesini sağlar ve

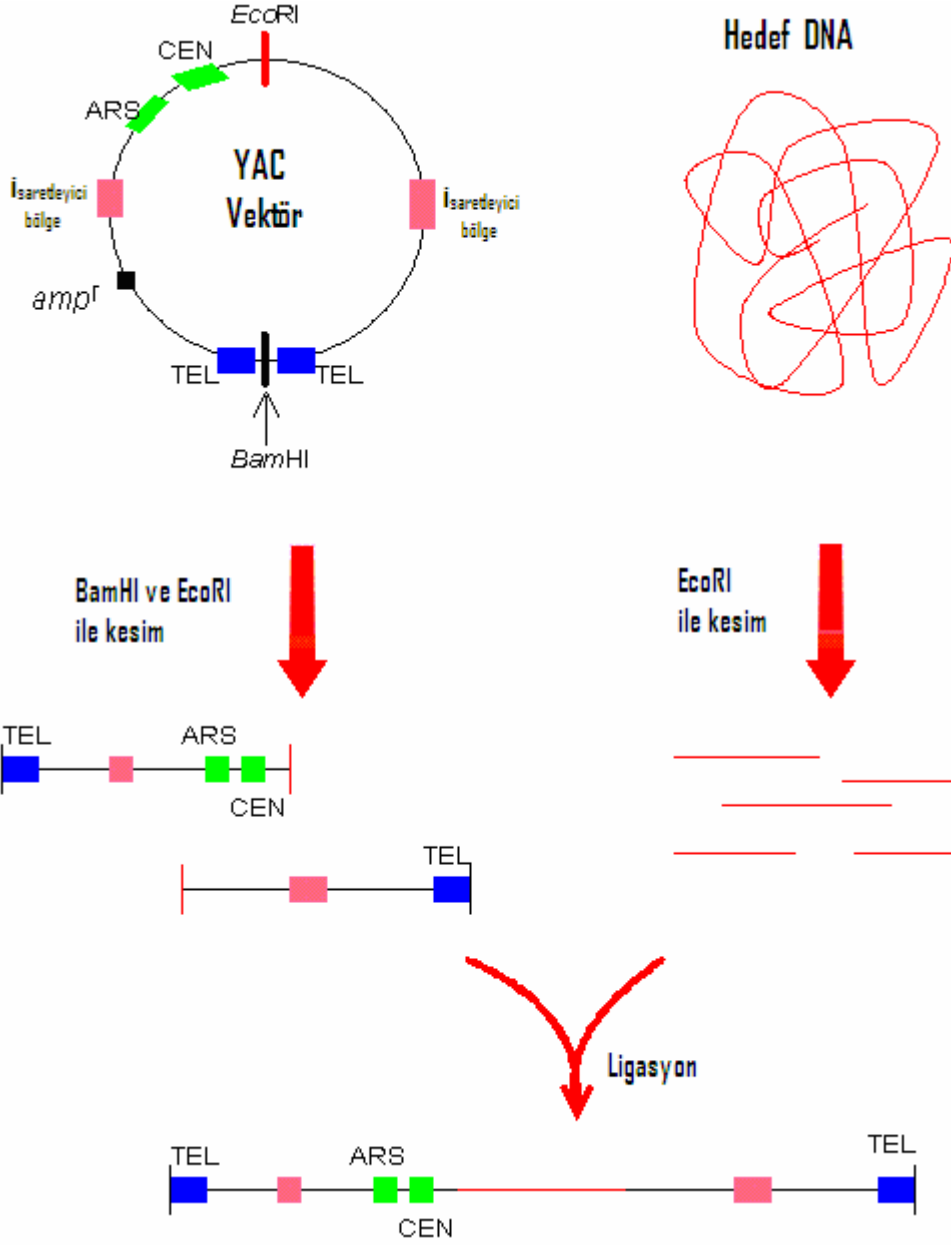
tamamlanmış lambda virion oluşur. En iyi araştırılan faj, lambda faj olup 60 kadar haritalanmış geni bulunmaktadır. Tümü 49.000 bp'lik olan bir diziyeye sahiptir ve 25 kb. yabancı DNA taşıyabilirler.

Yakın geçmişte bir çok tek iplikçikli DNA fajları klonlanma vektörleri olarak geliştirilmiştir. Bunlar M13 vektörü olarak isimlendirilirler ve tek iplikçikli olduklarından, SANGER yöntemi ile DNA dizi analizi yapmak için uygundur (genetik 2003).

#### **1.1.8.4.1.4. YAC Kromozomları (Yapay Maya Kromozomları):**

Gen klonlanmasında veya gen haritalanmasında; en önemli nokta, olabildiğince uzun insan kromozomlarının izole edilebilmesidir. 1980'lerin ortalarına kadar kosmid vektörler, en büyük klonlama araçlarıydı. 1987'de Olson ve arkadaşları geliştirdikleri yeni teknik ile konakçı olarak *Saccharomyces cerevisiae* kullanmış ve daha uzun insan kromozomlarının klonlanmasının mümkün olduğunu göstermişlerdir. Bu yapay maya kromozomlarının, diğer maya kromozomları gibi sentromer ve telomerleri bulunmaktadır. 2Mb. uzunluğuna kadar DNA parçalarının izolasyonu ve klonlanması mümkün olabilmektedir.

Antibiyotik rezistans genlerinden başka tanıma bölgeleri TRP1 ve URA 3 bölgesi içerirler. Hedef DNA EcoRI enzimi ile kesilir, YAC vektörü EcoRI ve BamH I enzimleri ile kesilerek klonlamaya hazırlanır. Ligasyon ile hedef DNA ve YAC entegre edilip transformasyon ile mayaya sokulur. YAC'in bir avantajı da, mikrosatellitlerin klonlanmasında başlangıç için en iyi yaklaşım olmasıdır. Bir YAC klonu, 400 kbp'lik bir inserti taşıırken; içinde çok sayıda mikrosatelliti de içerir. Bu da genetik çalışmalara, o bölge için ışık tutmaktadır (genetik 2003).

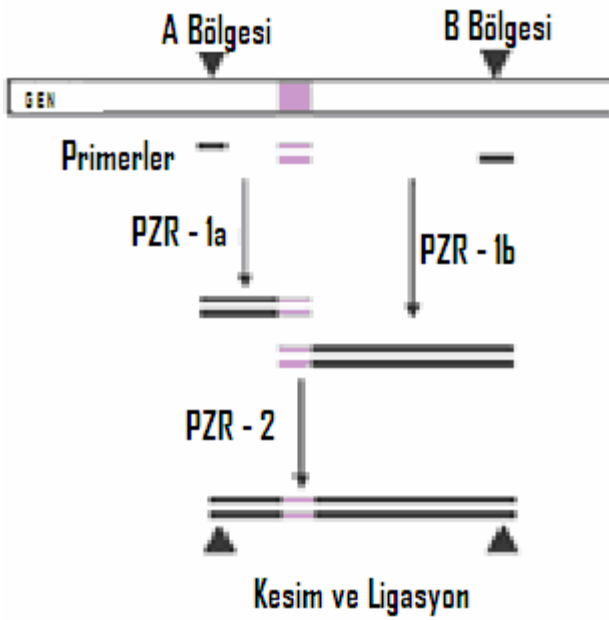


Sekil 1.4. Hedef DNA'nin YAC vektörü ile aktarimi.

#### 1.1.8.5. Site-directed mutagenesis:

Bu yöntem temel olarak üç PZR'na dayanır. İstenilen gen bölgesi için dizayn edilen sentetik oligonükleotidler haricinde mutasyon yaratmak amacıyla mutan oligonükleotidler de kullanılır. I. PZR'u sonucu oluşan amplifiye ürün ve II. PZR'u sonucu oluşan ürün birbirlerine overlap uçlar ile yapışır. Güçlü bir yapışma sağlanabilmesi için PZR'ları

ve geri primer dizilerinin birbirlerine yapisma bölgelerindeki uç kısımlarına komplementer diziler eklenir. Site-directed mutagenesis yöntemi ile oluşturulan mutasyonların aktivite veya fonksiyon analizi çalışmalarında kullanılabilmesi için plazmidler içine yerleştirilirler. Plazmid içerisine ligasyon için PZR'u ileri ve geri primer dizilerinin açıkta kalan plazmid ile yapisma bölgelerinin uç kısımlarına enzimle kesim dizileri eklenir. Her enzimin aktivasyonu için kendine özgü overlap ek dizileri bulunur bu diziler bulunarak enzim kesim dizilerinin bas kısmına eklenir (Eberhard 1995).

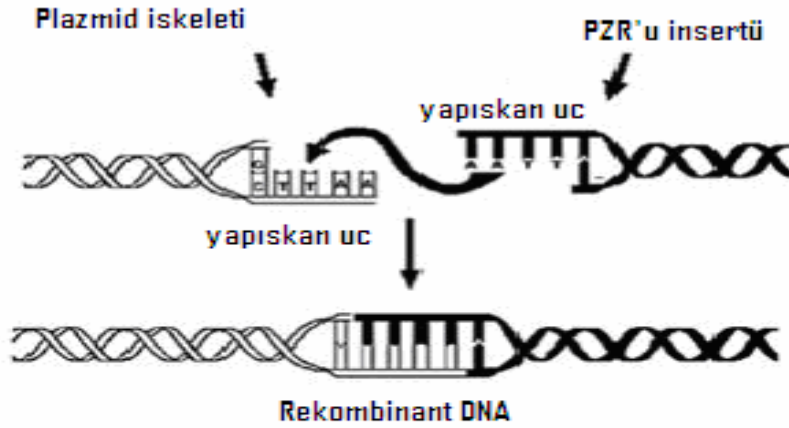


Sekil 1.5. Site-Directed Mutagenesis ile mutasyon oluşturulması

#### 1.1.8.6. Ligasyon:

Ligasyon işlemi; T4 ligaz enzimi ve klonlamaya RFLP yöntemi ile hazırlanan ve agaroz jelden purifiye edilmiş hedef PZR ürünü ve plazmid kullanılarak gerçekleştirilen birleştirme işlemidir. Tüp içerisinde klonlanacak PZR ile amplifiye edilmiş DNA dizisinin klonlamada aracı vektör olarak kullanılacak plazmid DNA' sinin içine kovalent bağ

olusturularak sokulması ile gerçekleştirilir. Ligasyon reaksiyonu belirtilen tampon ve T4 ligaz enzimi ile toplam hacim genel itibarıyla 10-20 µl olacak şekilde 16 °C'de 16 saat süre ile inkübasyona tabi tutularak gerçekleştirilir (Eberhard 1995).



Sekil 1.6. Ligasyon işlemi

#### 1.1.8.7. Klonların Transformasyon ile Sub-Klon Bakteriye aktarılması:

Transformasyon ligasyon işlemi ile birbirine kovalent bağ ile bağlanan vektör ve PZR ile amplifiye edilmiş klonlanacak DNA dizininin bakteriler kullanılarak çoğaltılmasıdır. Bu işlem ile farklı kit uygulamaları için farklı hacimlerde Luria Bertani tampon (LB) içerisinde klonları almış bakteri kültürü yapılır.

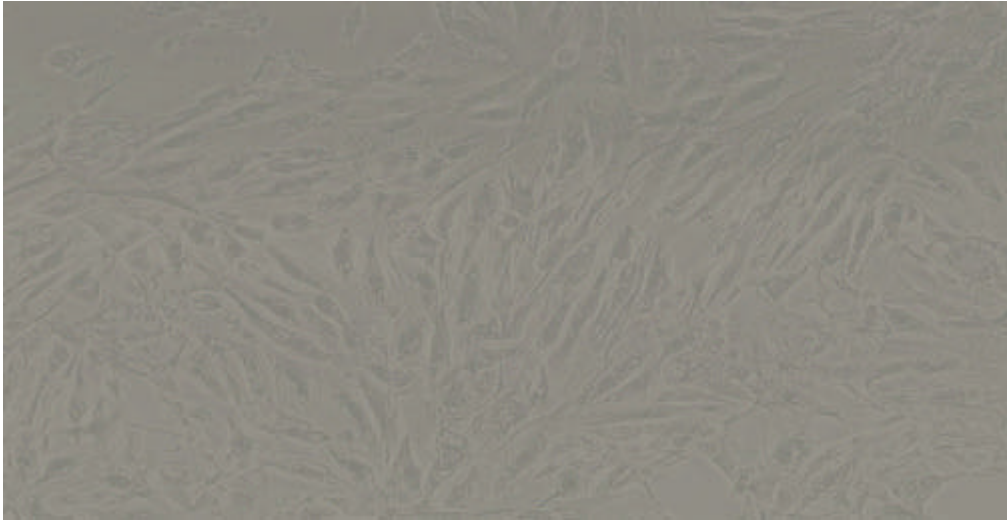
#### 1.1.8.8. Klonların Aktarıldığı Bakteri Hücrelerinden Tekrar Amplifiye edilen Pozitif Plazmidlerin İzolasyonu için İnokülasyon:

Transformasyon işlemi sonrası plazmidlerin sahip oldukları antibiyotik rezistansından yararlanılarak ayrılan ve tek koloni düşürülen pozitif koloniler inokülasyon işlemi ile

üretirler, bu sayede klonları içerisine alan pozitif koloniler elde edilir.

#### **1.1.8.9. Hücre Kültürü:**

Hücre ya da doku kültürü çalışmaları aktivite ve fonksiyon deneylerinde tercih edilmektedir. Hayvan deneylerine hazırlık aşamasında özellikle güvenilir ön veri oluşturmaktadır.



**Sekil 1.7. Preadiposit hücre serisi**

#### **1.1.8.10. Hazırlanan Klonların Hücrelere Transfeksiyon ile Enfekte Edilmesi:**

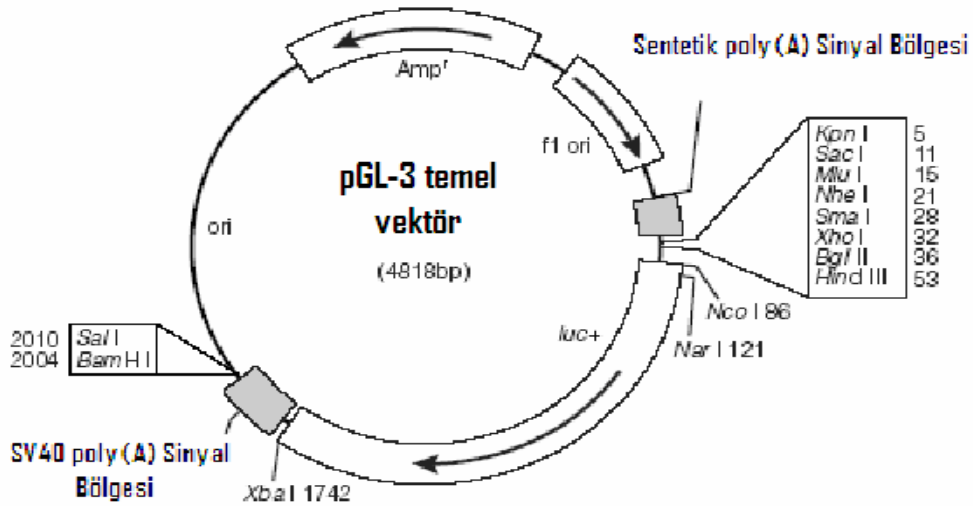
Transfeksiyon genel anlamıyla hazırlanan klonların içerisinde bulunduğu plazmidlerin hücre serilerine sokulması olarak tanımlanabilir. Transfeksiyonda en sık ve başarılı bir şekilde kullanılan vektörler plazmidlerdir. Transfeksiyon; promotor bölge aktivasyon çalışmalarına, gen ekspresyon çalışmalarına, hücre içi sinyal yollarının araştırılmasına ve buna benzer fonksiyon çalışmalarına olanak sağlamaktadır. Transfeksiyon iki farklı temel tipte gerçekleştirilebilir; (C.Rader 2006)

1- **Transin transfeksiyon**, olarak tanımlanan ve genellikle aktivasyon tayin çalışmalarında kullanılan transfeksiyon. Bu tip enfeksiyonda hazırlanan klonlar plazmid yardımı ile hücre içerisine sokulur ve aktivasyon tayin çalışması süresince devamlılığını korur ancak bir üst aşamada hayvan deneyleri ya da fonksiyon çalışması yapılacak ise uygun değildir.

2- **Stabil transfeksiyon**, ise tek bir plazmid ile sadece klonların hücrelere sokulması işlemi olan transien transfeksiyondan farklı olarak eliminasyonu yani enfekte olmuş plazmid açısından pozitif hücrelerin seçiliminde içerir. Dolayısıyla stabil transfeksiyon ile hücreler iki farklı plazmid ile enfekte edilirler. Bir plazmid istenilen klonu tasırken diğer plazmid bir antibiyotik rezistansı tasir. Böylelikle sadece pozitif hücreler hayatta kalırken plazmid içine almayan hücreler büyüme ortamına eklenen antibiyotik ile sonlandırılır.

#### 1.1.8.11. Dual-Glo Lusiferaz Klon Analiz Sistemi :

Transfekte olan hücre serilerinde aktivasyon tayini için Dual-Glo lusiferaz yöntemi kullanılmıştır. Dual-Glo Lusiferaz aktivite tayin yöntemi iki vektör plazmid kullanımına dayanan ve floresan ışık yayılım esasına göre çalışan bir tekniktir. pGL-3 plazmid içeriğine klonlanan gen dizisinin önünde yer alan firefly ışık veren floresan isima yapan proteine ait dizi bulunmaktadır. Dolayısıyla kantitatif olarak isima miktarına göre genin ekspresyonu veya promoter bölge çalışmalarında gen aktivasyonu tayini bu yöntem ile yapılabilmektedir (manual 2006).

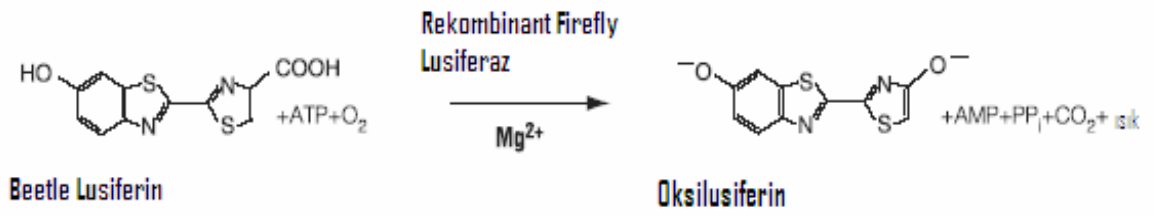


Şekil 1.8. pGL-3 temel vektörünün halkasal yapısı

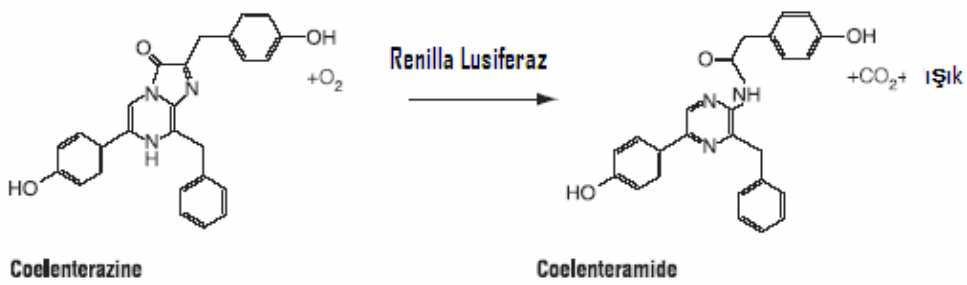


Klonlama temel prensiplerine bagli kalinarak plazmid ve içeri sokulacak gen dizisinin enzim haritalari çikarilmistir. Klonlanan gen dizisi içerisinde yer almayan plazmid origin bölgesinde tanima bölgesi bulunan enzimler tercih edilerek DNA dizileri pGL-3 plazmidi içerisinde sokulur.

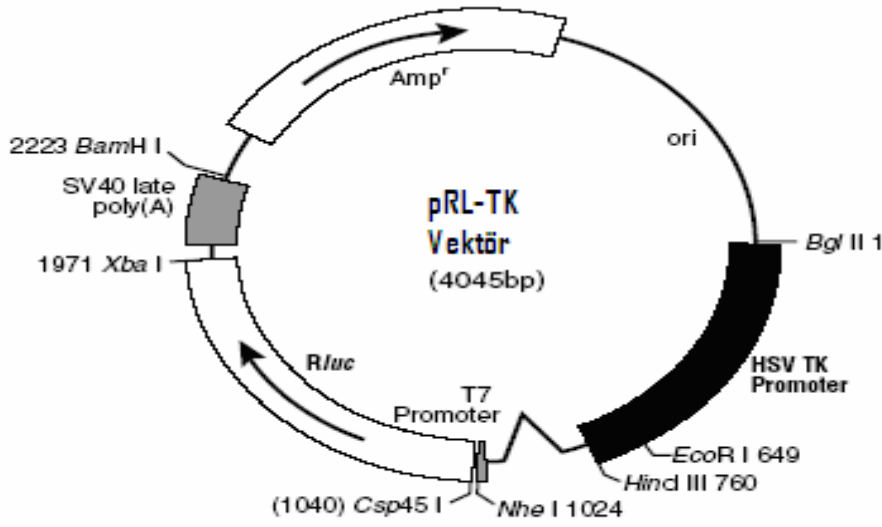
Duol-Glo lusiferaz sisteminde kullanılan iki temel plazmid bulunmaktadır. Bu vektörler içerdikleri isima veren iki floresan protein dizisi içerirler. Firefly ve renilla floresanlari kimyasal reaksiyon mekanizmasi ile isama vermnektedir.



Sekil 1.9. Duol-Glo Lusiferaz klonlamam firefly lusiferaz plazmidi isima mekanizmasi



Sekil 1.10. Duol-Glo Lusiferaz klonlamam renilla lusiferaz plazmidi isima mekanizmasi



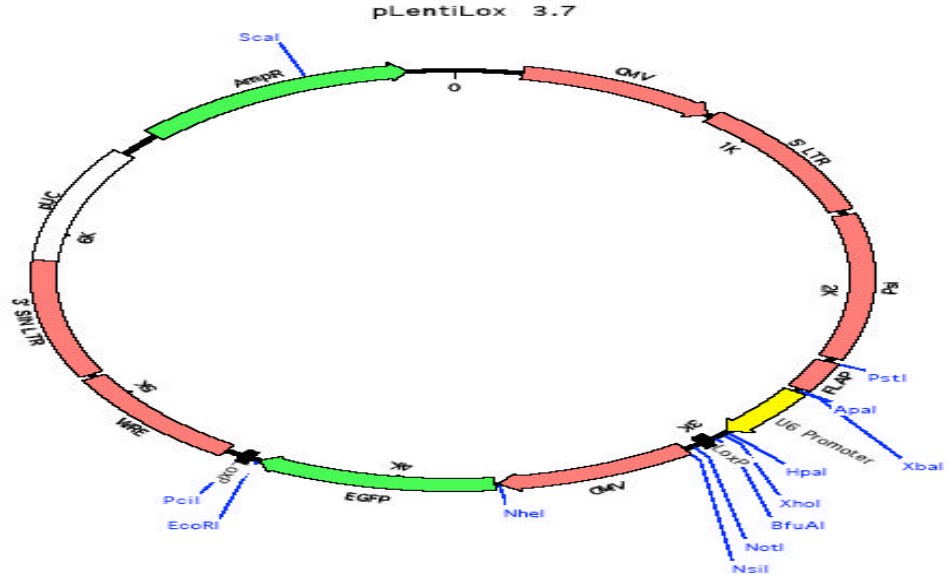
Duol-Glo lusiferaz sisteminde pRL-TK renilla adi verilen firefly klon isimasından farklı bir isim veren floresan protein dizisi içeren vektör kullanılmıştır. Bu kontrol plazmidinde herhangi bir klon içeri sokulmadan renilla proteini sürekli sentez halindedir. Elde edilen veriler ile PGL3 klon plazmidinden alınan firefly isimasının renillaya oranlanması sonucunda aktivite tayini yapılır (manual 2006).

#### 1.1.8.12. Western Blot:

Western blot moleküler biyolojide protein varlığını ya da yokluğunu ortaya koyma amacıyla ve varsa miktarını tayin veya karşılaştırma amacı ile kullanılır. SDS-PAGE uygulamasından sonra elektroblot yöntemi ile proteinler membrana aktarılır. Membranların birincil ve ikincil antibodiler ile muamele edilmesiyle nicel olarak proteinler tayin edilir.

#### 1.1.8.13. Gen Ekspresyonunun siRNA Yöntemi ile Durdurulması:

Interfering küçük RNA yöntemi viral klonlara yerleştirilen oligonükleotidler ile gen ekspresyonunun durdurulması esasına dayanır. RNA dizisinin içine sokulacağı vektör virüs pLentiLox 3.7 kullanılmıştır. LOCUS LL3.7 7650 bp halkasal DNA SYN olarak gen bankasında yer almaktadır (Brummelkamp, Bernards et al. 2002).



Sekil 1.11. siRNA gen susturma yönteminde kullanılan pLentiLox 3.7'in sematik görünümü

#### 1.1.8.13.1. siRNA dizayni:

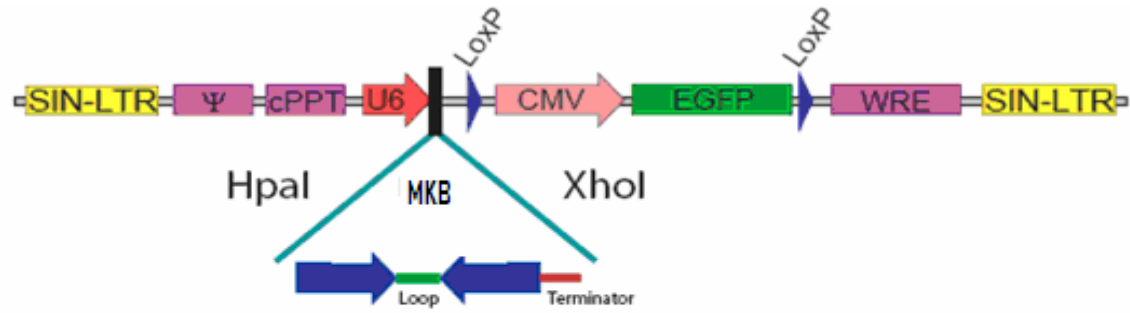
Sense ve antisense iki oligo dizayn edilmistir. siRNA için dizayn edilen sense oligonükleotidler için su frmülasyon kullanilmistir;

Sense oligo: 5'T-(GN18)-(TTCAAGAGA)-(81NC)-TTTTTC

Antisense oligo ise sense oligo dizisine komplementer olarak dizayn edilmistir ancak farkli olarak 5'ucuna XhoI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi ile overlap uç yaratilmistir. U6 promoter bölgeye tekrar -1 yaratmak amaciyla G(N18) dizisini baslangicina T nükleotidi eklenmistir. TTCAAGAGA dizisi ise loop olusturabilmek için eklenmistir. 3' ucuna sonlandirma dizisi olarak 6 T nükleotidi eklenmistir (Brummelkamp, Bernards et al. 2002).



siRNA dizaynında dikkat edilen diğer bir unsur ise klonlamada ligasyon işleminin gerçekleştirilmesi için pLL3.7 vektörünün 5' ucuna Hpa I restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi ile kör uç, 3' ucuna ise XhoI tanıma bölgesi ile yapışkan uç oluşturulmuş olmasıdır (Brummelkamp, Bernards et al. 2002).

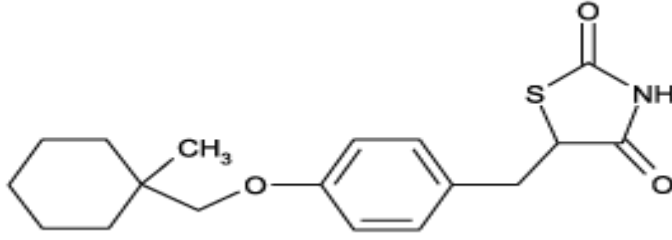


Sekil 1. 12. siRNA pLentilox 3.7 vektörü- <http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi/html/rnai.html>.

#### 1.1.8.14. Aktivite Tayin Yönteminde Kullanılan İlaçlar:

##### 1.1.8.14.1. Ciglitazone:

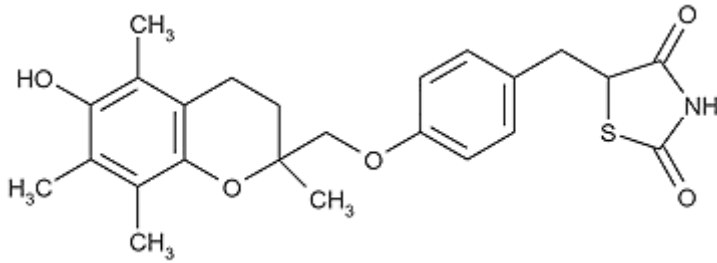
Thiadolizones ailesine ait bir ilaçtır. Günümüzde PPAR agonisti olarak antidiabetik ilaçlar arasında yer almaktadır. (+)-5-[4-(1-Methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione U-63287 sinonimidir. Genel kimyasal formülü  $C_{18}H_{23}NO_3S$  olarak bilinmektedir. Moleküler ağırlığı 333.5'dir (Kobayashi 1983).



Sekil 1.13. Ciglitazone biyokimyasal formülasyonu

#### 1.1.8.14.2.Troglitazone:

Thiadolizones ailesine ait bir diger üye ise troglitazondur. Günümüzde PPAR agonisti olarak antidiabetik ilaçlar arasında yer almaktadır. 5-[[4-[(3,4-Dihidro-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopyran-2 yl)methoxy] phenyl] methyl]-2,4-thiazolidinedione sinonimidir. Genel kimyasal formülü  $C_{24}H_{27}NO_5S$  olarak bilinmektedir. Moleküler ağırlığı: 441.5'dir (Kobayashi 1983).



Sekil 1.14. Troglitazone biyokimyasal formülasyonu

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Temel olarak deneysel ve klinik çalışmaların birlikteliği ile oluşturulmuştur. Pediatrik obezite grubu hastalarına ait kan örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Endokrinoloji Bilim Dalından sağlanarak çalışmaya alınmıştır. Bu doktora tez çalışmasında, klinik olarak obezite tanısı almış 175 pediatrik olgu ve yapılan düşük ve yüksek sosyo-ekonomik düzeyli okul çalışmasından 96 çocuk bu tez çalışması kapsamında obezitede anlamlı olabilecek hedef gen değişimleri açısından araştırılmıştır. Hasta grubunda yaş aralığı 1-17'dir, 72'si erkek (% 36), 128'i (%64) ise kızıdır.

### 2.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu:

Kan örnekleri 1 ml 0.5 M EDTA'li (Etilendiamintetraasetik asit, Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 ml hasta kanı (1/10 EDTA) olacak şekilde alınmıştır. 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılan kan örnekleri üzerine 25ml RBC (Red Blood Cell) lizis Solüsyonu; amonyum klorür (Merck, Darmstadt, Almanya), potasyum bikarbonat (Merck, Darmstadt, Almanya), Etilen Diamin Tetra asetik asit (Sigma, ABD) 1:2,5 oranında ilave edilir ve ~15 dk buz içinde bekletilir (eritrositler tam olarak lize olana kadar). Buz üzerinde inkübasyonu takiben, kan örnekleri +4°C, 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir (Hettich, Almanya). Santrifüj işlemi sonucu oluşan süpernatant atılır ve bu işleme tüm eritrositler lize edilene kadar devam edilir. Kırmızı küreler elimine edildikten sonra pelletin yani beyaz kürelerin üzerine 20 µl Proteinaz K (20mg/ml stok; Quantum, Montreuil-Fransa), son konsantrasyon % 0.5 olacak şekilde 10%'luk sodyum dodesyl sülfat (SDS; Sigma, ABD) ve toplam hacimin 2.5 kati kadar STE; Tris- HCl, Tris Base (Owl Scientific, ABD), HCl (Merck, Almanya), NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), EDTA (Sigma, ABD) ilave edilerek bir gece 37°C' de su banyosunda (Kottermann, Almanya) inkübe edilir. Inkübasyon sonrasında 1/1 oranında alkol 25:24:1 oranlarında sirasiyla; Fenol (Merck; Almanya) : Kloroform (Merck; Almanya) : izoamilalkol (Merck; Almanya) ilave edilerek 10 dakika elde çalkalanır. Çalkalama işlemi takiben örnekler 15 dakika buz üzerinde inkübasyona tabi tutulur. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir.

Süpernatant başka bir tüpe aktarılır ve 1/10'u kadar 2M Sodyum asetat (Sigma;ABD). ve toplam hacimin 2 kati kadar %95'lik etil alkol (Tekel, Türkiye) ilave edilir ve DNA görünür hale getirilir. Presipitasyonun tam olarak gerçekleşmesi için -20°C'de örnekler bir gece bekletilir. Ertesi gün +4°C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. DNA 70%'lik etil alkol ile yıkanır. +4°C'de 4000rpm'de 15 dakika tekrar santrifüj edilir. Çökelek halinde olan DNA, alkol tamamen uçurulana kadar kurutulduktan sonra elde edilen DNA miktarına bağlı olarak 50-700 µl TE çözeltisi ilave edilerek, bir gece 37 °C' de inkübe edilir ve DNA çözünür hale getirilir.

### **2.1.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler**

#### **2.1.1.1. Kırmızı Kan Hücrelerini Lize eden Tampon (RBC Lizis çözeltisi):**

(son konsantrasyon)

150 mM NH<sub>4</sub>Cl

10mM NaHCO<sub>3</sub>

0,1 M EDTA

#### **2.1.1.2. STE çözeltisi:**

(son konsantrasyon)

10mM Tris-HCl

400mM NaCl

2mM EDTA

#### **2.1.1.3. Fenol:Kloroform:Izoamilalkol karisimi (25:24:1):**

Fenol 65°C su banyosunda sıvı hale gelinceye kadar beklendikten sonra

500 ml Fenol

480 ml Kloroform

20 ml Izoamilalkol karisimi üzerine 1:1 oranında 100mM Tris-HCl pH:7.4 (1000 ml) ilave

edilerek iyice çalkalanir. +4°C’de bir gece bekletildikten sonra kullanilir.

#### **2.1.1.4. TE Çözeltisi:**

(son konsantrasyonu)

10mM Tris-HCl

1mM EDTA

#### **2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu:**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile hedef gen bölgeleri amplifiye edilmistir. Temel olarak bu tez çalismasi için gerçekleştirilen PZR’u bileşenleri aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

	Son Konsantrasyon
(ddH <sub>2</sub> O) distile Su	-
10x PCR Tamponu	1x
dNTP Karisimi	0.2 mM
Primer Karisimi	20-30 pmol
MgCl <sub>2</sub> / MgSO <sub>4</sub>	1.5 mM
Taq DNA Polimeraz	1 ünite
DNA	200-300 ng

**Tablo 2.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve kullanılan miktarları.**

#### **2.3. Restriksiyon Endonükleaz Uzunluk Polimerfizm Analizi (RFLP) Yöntemi:**

Hedef gen bölgeleri PZR yöntemi ile amplifiye edildikten sonra taranacak gen değişimleri için RFLP yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.



### 2.3.1. Gen değisimlerine ait PZR ve RFLP Kosullari:

#### 2.3.1.1. Plazminogen Aktivatör Inhibitör-1 4G/5G polimorphizminin tanimlanmasi:

Plazminojen aktivatör inhibitör I 4G/5G polimorphizminin taranmasi amaci ile asagida belirtilen promoter dizide koyu renkle isaretlenmis ileri ve geri oligonükleotid dizileri kullanilarak 5G alleli için 99 bp. 4G alleli için 98 bp.'lik PZR ürünleri elde edilmistir. BseL1 Restriksiyon endonükleaz enzimi ile RFLP yöntemi ile elde edilen amplifiye ürünlerin kesimi sonrası; 5G alleli için 77bp./22bp.'lik ürünler elde edilmistir, 4G/5G alleli için ise 98bp./77bp./22bp.'lik ürünler elde edilmistir.

RFLP Reaksiyonu gerçekleştirilirken:

17µl PCR ürünü + 2 µl tampon + 1µl BseL1 (10 ünite) = 20 µl toplam hacim olmak üzere gerçekleştirilmiştir. 55°C'de su banyosunda bir gece inkübe edilir.

Plazminojen aktivatör inhibitör I 4G/5G polimorphizminin taranmasi amaci ile BseL1 Restriksiyon endonükleaz enzimi sonrası oluşan ürünler %3.5'luk agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

aagcttacca tggtaacccc tggccccgtt cagccaccac caccaccacc agcacacctc caac  
ctcagccagaca aggttggtgacaca agagagccctcagggg **cacagagagagtctggcc**  
**acgt gggg** agtcagccgtgtat catcggagg cggcc gggcacatgg cagggatgaggg  
aa **agaccaagagtcctctgttgg** gcccaagtc ctagacaga caaacctagacaatcac  
gtggctggctgca tgcctg tggctgttgg gctgggcagg aggagggagg ggcgctcttt cctggag  
gtggccagagcac cgggtggac agccctgggg gaaaacttc acgtttgat ggaggttatc tttgata  
actccacagtgacc tggc tcgcc aaaggaaaag caggcaacgt gagctgtttt tttttctccaagctga  
acacta ggggtccta ggcttttgggtcacc g gcatggcaga cagtcaacct ggcaggacatccgg

Şekil 2.1.. PAI-1 promoter dizisi, koyu yazılmış diziler ileri ve geri primerleri, italik yazılmış dizi ise gen değisimini göstermektedir.

### 2.3.1.2. Yag Asiti Baglanma Proteini (FABP4) promoter -87 T/C degisimi :

Serbest Yag Asiti Baglanma Proteini -87 T/C degisiminin taranmasi amaci ile asagida belirtilen promoter dizide koyu renkle isaretlenmis ileri ve geri oligonükleotid dizileri kullanilarak 396 bp.'lik PZR ürünleri elde edilmistir. Mun I Restriksiyon endonükleaz enzimi ile RFLP yöntemi ile elde edilen amplifiye ürünlerin kesimi sonrasi; 247 bp./99 bp.'lik ürünler elde edilmistir.

RFLP Reaksiyonu gerçekleştirilirken:

17µl PCR ürünü + 2 µl tampon + 1µl Mun I (10 ünite) = 20 µl toplam hacim olmak üzere gerçekleştirilmiştir. 37°C'de su banyosunda bir gece inkübe edilir.

Yag Asiti Baglanma Proteini -87 T/C degisiminin taranmasi amaci ile Mun I Restriksiyon endonükleaz enzimi sonrasi olusan ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

tgaggaaagt attttagaat aaggcctatt ttcaaagga tctgtggaaa tcaatgctat gctctcatt  
aggagatgga aagagtgagg ttaaattatc attcgatta aatctacagt ccagattact ggtggatgaa  
ttgaatgtac tttttatc atataaaaca ttgaaatca gaaatctgga gtacttttaa atcccattatttttg  
tttaatcgcca ggtaattcct gagacaggag tgccccgaag agcctttgca attatgtaag aatctccgag  
gcagttctttgttcctcaa ttcaaaagaa ccacataact gcaatttaa taacacccca cacacacacaaaa  
taaggtc gaagtttate taaaataat ttcccctctc **gggcttccagacattgctataaac** tacact  
ggga taaatatgta taggaataat aggggggaaat tcagtgcact gagcattaag ctgtcaaacagga  
atgtttaa aatattcct gttagtgggt taaaataat ttgtacteta agtccagtga ctattgcccaggaga  
accaagtg agaaatttctatta aaaacatgac tcagagaaaa aatgcagag gccggtaatg aaggaa  
atgattgat ctattcccaa **T/C** tggtcattccta agatcacatgttctgagcat cttaaaaggaag  
ttatctggact caagag ggtcacagca cctcctgaa **atttctcaactttggttctccc** aac

Sekil 2.2.. FABP 4 promoter dizisi, koyu yazilmis diziler ieri ve geri primerleri, italik yazilmis dizi ise gen degisimini göstermektedir.

### 2.3.1.3. Interlökin 6 -174 G/C Promoter degisimi :

Interlökin 6 -174 G/C promoter polimorphizminin taranmasi amaci ile asagida belirtilen promoter dizide koyu renkle isaretlenmis ileri ve geri oligonükleotid dizileri kullanilarak 431bp.'lik PZR ürünleri elde edilmistir. Nla III Restriksiyon endonükleaz enzimi ile RFLP yöntemi ile elde edilen amplifiye ürünlerin kesimi sonrasi; 229bp./173bp./29bp.'lik ürünler elde edilmistir.

RFLP Reaksiyonu gerçekleştirilirken:

17µl PCR ürünü + 2 µl tampon + 1µl Nla III (10 ünite) = 20 µl toplam hacim olmak üzere gerçekleştirilmiştir. 37°C'de su banyosunda bir gece inkübe edilir.

Interlökin 6 -174 G/C promoter polimorphizminin taranmasi amaci ile Nla III Restriksiyon endonükleaz enzimi sonrasi olusan ürünler %3.5'luk agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

ctgaagcagg tgaagaaagt ggcagaagcc acgcggtggc aaaaaggagt cacacactccacctg  
gagacgccttgaagt aactgcacga aatttgaggg tggccaggca gttctacaac agccctcacagg  
gagagcc agaaca **cagaagaactcagatgact** ggtagtattacctt tcataatcccaggc  
ttggggg gctgcat ggagtcagag gaaactcagt tcagaacatc tttggtttt acaaatacaaattaac  
tggaacgctaaatt ctagcctgtt aatctggtea ctgaaaaaaaa aaatttttt tttcaaaaaa catagcttta  
gcttattttt tttctctttg taaaacttcg tgcattgactt cagctttactctttgtcaag acat **G/C** ccaaa  
gtgctg agtcactaataaaa gaaaaaaaaa aagtaaagga agagtggttc tgcttcttagcgctagcc  
tcaat gacgacc taagctgcac ttttccccct agttgtgtct tgcgatgcta aaggacgtca cattgc  
acaa tcttaataa **ggtttccaatcagccccac** ccgctctggccc caccctaccctccaac  
aaagatttatcaa atgtgggatt ttccatgag tctcaatatt agagtctcaa ccccaataa atataggact  
ggagatgtct gaggctcatt ctgccctega gccaccggg aacgaaagag aagctctatctcccctcc

Şekil 2.3. IL-6 promoter dizisi, koyu yazılmış diziler ileri ve geri primerleri, italik yazılmış dizi ise gen degisimini göstermektedir.

### 2.3.1.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa -308 G/A deşisimi :

Tümör nekrozis faktör alfa -308 G/A polimorphizminin taranması amacı ile aşağıda belirtilen promoter dizide koyu renkle işaretlenmiş ileri ve geri oligonükleotid dizileri kullanılarak 116 bp'lik PZR ürünleri elde edilmiştir. BspH1 Restriksiyon endonükleaz enzimi ile RFLP yöntemi ile elde edilen amplifiye ürünlerin kesimi sonrası; AA alleli için 90bp./20bp.'lik ürünler elde edilmiştir, AG alleli için ise 116bp./96bp./20bp.'lik ürünler elde edilmiştir.

RFLP Reaksiyonu gerçekleştirilirken:

17µl PCR ürünü + 2 µl tampon + 1µl BspH1 (10 ünite) = 20 µl toplam hacim olmak üzere gerçekleştirilmiştir. 37°C'de su banyosunda bir gece inkübe edilir.

Tümör nekrozis faktör alfa -308 G/A polimorphizminin taranması amacı ile BspH1 Restriksiyon endonükleaz enzimi sonrası oluşan ürünler %3'lük agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir.

tacaggggacgtt taagaagata tggccacaca ctggggccct gagaagtgag agcttcatgaaaaaaaa  
tcagggacccaga gttccttggga agccaagact gaaaccagca ttatgagtct ccgggtcagaatgaa  
agaag aaggcctgcc ccagtggctct gtgaattccc ggggggtgatt tcaactcccc ggctgtcccaggc  
ttgtccc tgetaccccc acccagcctt tctgaggcc tcaagctgcc accaagcccc cagctccttctc  
cccgcaga cccaaacaca ggcctcagga ctcaacacag ctttccctc caaccccggtt ttctctccctca  
aggactca gctttctgaa gcccctccca gttctagttc tatcttttc ctgcatcctg tctggaagttagaagg  
aaacagaccacaga cctggtcccc aaaaga **aatggaaataggttttgaggg tcatgg g**  
gacgggggttcagc ctccagggtc ctacacacaa atcagtcagt ggcccagaag acccccctcgga  
tcggagc agggaggatg gggagtgtga ggggtatcct tgatgcttgt gtgtcccaa ctttcaaattc  
cgcccc **gcgatggagaagaaccgaga** cagaaggtg cagggccac taccgcttcc  
tccagatgag cttatgggtt tctccacaa ggaagtttc cgctggttga atgattctt cccgcctc  
ctctgcccc agggacatat aaaggcagtt gttggcacac ccagccagca gacgctccctcagcaag

Sekil 2.4.. TNF promoter dizisi, koyu yazılmış diziler ileri ve geri primerleri, italik yazılmış dizi ise gen

degisimini göstermektedir.

### 2.3.1.5. Melanokortin 4 Reseptör Geni :

Melanokortin 4 reseptör genin taranması amacı ile tek eksonlu gen aşağıda dizide belirtilen koyu renkle işaretlenmiş ileri ve geri oligonükleotid dizileri kullanılarak iki farklı PZR reaksiyonu ile tüm ekson için taranmıştır. I. bölge PZR'u ile 600bp., II. Bölge PZR'u ile 620 bp.'lik amplifiye ürün elde edilmiştir. Elde edilen PZR'u ürünleri iki farklı sekans reaksiyonu ile tüm ekson için gerçekleştirilmiştir.

cgactccctg acccaggaggttaa **atcaattcagggggacactg** gaattctctgccagcatg  
gtgaact ccaccaccg tgggatgcac acttctctgc acctctggaa ccgcagcagttacagactgca  
cagcaatgc cagtgagtcc cttggaaaag gctactctga tggagggtgc tacgagcaac ttttctctc  
tctgaggtg tttgtgactc tgggtgtcat cagcttggtg gagaatatct tagtgattgt ggcaatagcc  
aagaacaaga atctgcattc accatgtac ttttcatct gcagcttggc tgtggctgat atgctggtga  
gcgtttcaaa tggatcagaa accattgtca tcacctatt aaacagtaca gatacggatg cacagagttt  
cacagtgaat attgataatg tcattgactc ggtgatctgt agtccttgc ttgcatccat ttgcagcctg  
ctttcaattg cagtggacag gtactttactatcttct **atgctctccagtaccataaca** ttatgaca  
gttaagcgggttg gatcatcata agttgtatct gggcagcttg cacggttca ggcattttgt tcatcatt  
**actcagatagtagtgctgctc** atcatctgcct caccaccatg ttcttacca tgctggctctcatg  
gcttctctctatgtcc acatgttct gatggccagg cttcacatta agaggattgc tgctctccccggcac  
tgggtg ccatccgcca agtgccaat atgaaggag cgattacctt gaccatctg attggcgtctttg  
ttgtctgctgggccccca ttcttctcc acttaatat ctacatctct tgcctcaga atccatattg tgtgtg  
cttcatgtctcact ttaacttgta tctcactg atcatgtgta attcaatcat cgatctctg ttatgcactcc  
ggagtcaagaactgagg aaaaccttca aagatcat ctgttgctat ccctgggag gcctttgtga  
cttgctagcagatattaaa tggggacaga gcacgcaat ataggaacatgcataag agac ttttctc  
ttacccta **cctgaatattgtacttctgca**

Sekil 2.5. MC4R ekson dizisi, koyu yazılmış diziler ileri ve geri primerleri göstermektedir

Gen	Restriksiyon Endonükleaz Tanima Dizisi	Restriksiyon Endonükleaz Inkübasyon Sicakligi	PZR'u Primer Tm Sicakligi
PAI-1	5' CCNNNNN/NNGG 3' 5' GGNN/NNNNNCC 3'	55 <sup>0</sup> C	60 <sup>0</sup> C
TNF-Alpha	5' T/CATGA 3' 5' AGTAC/T 3'	37 <sup>0</sup> C	55 <sup>0</sup> C
FABP4	5' C/AATTG 3' 5' GTTAA/C 3'	37 <sup>0</sup> C	55 <sup>0</sup> C
IL-6	5'....CATG/.....3' 5'.... GTAC/.....3'	37 <sup>0</sup> C	57 <sup>0</sup> C

**Tablo 2.2. Çalışmaya alınan gen değişimlerinin tanımlanmasında kullanılan PZR'u ve RFLP koşulları.**

#### **2.4. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile PZR ve RFLP örneklerinin görüntülenmesi:**

Elektroforez yöntemi hem agaroz jeller için hem de poliakrilamid jeller için kullanılan DNA' nin negatif yükünden yararlanılarak DNA örneklerinin elektrik akiminin geçişine izin verecek tampon çözeltiler (TBE) aracılığı ile negatif yüklü kutuptan pozitif yüklü kutuba doğru kosturulması işlemidir. Bu teknik kullanılarak DNA dizilerinin moleküler büyüklüklerine göre ayrımı yapılmış olur. Farklı konsantrasyondaki jeller kullanılarak farklı büyüklükteki DNA dizileri kolaylıkla tanımlanabilir. DNA dizilerinin ultraviyole ışık altında görüntülenmesi için çift sarmal DNA dizisi içinde yer alan karşılıklı bazların arasına giren ve U.V. ile ışık veren etidiyum bromit kullanılır. Farklı konsantrasyondaki agaroz jeller 1X TBE tamponu ile agaroz ağırlık/ hacim 1X TBE olarak farklı yüzdelerde hazırlanır. Agaroz jelle yüklenen RFLP, klon plazmid veya PZR örnekleri elektroforez tankinin hacmine ve örneklerin özelliklerine bağlı olarak 50-150 V akımda 30-45 dk yürütülür. U.V. üzerinde görüntülenerek fotoğraflanır.

## **2.4.1. Agaroz Jel Elektroforezinin Komponentleri:**

### **2.4.1.1. 5X TBE çözeltisi:**

Tris 54 gr;

Borik asit 27.5 gr.

20 ml. 0.5 M EDTA karisimi 1 lt' ye deiyonize su ile tamamlanir.

### **2.4.1.2. 1X TBE çözeltisi:**

5X TBE çözeltisi deiyonize su ile 1/ 5 oraninda seyreltilerek 1X TBE çözeltisi hazirlanir.

### **2.4.1.3. Ethidiyum Bromit:**

Toz halindeki ethidiyum bromit boyasi %0,5'lik olacak sekilde agirlik/hacim oranina göre sulandirilir.

## **2.5. Sanger Yöntemi ile MC4R Geninin taranması:**

MC4R geni tek eksonlu bir gen dir ve iki farkli PZR'u ile iki bölgeye ayrilarak sekans u ile taranmistir. DNA dizi analizi, sanger yöntemine uygun olarak kapiller sistem otomatik sekans cihazı ile gerçekleştirilmiştir (CEQ800XL, Beckman Coulter, USA). PZR'u sonrasında serbest oligonükleotidlerin ve dNTP'lerin ortamdan uzaklaştırılması için ethanol çöktürmesi ile PZR' ürünleri çöktürülüp alkol ile yikanir. Temizlenen ürünler 0,2 ml'lik, 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak sekanslanmıştır. 12 µl sekans karisimi (2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karisimi, 2µl ddUTP, 2µl ddGTP, 2µl ddCTP, 2µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi), 6µl temizlenmiş PZR ürünü, 20 pmol primer kullanılarak termocycler cihazında sekans islemi gerçekleştirilmiştir (Biometra, Almanya). PZR'u kosullari; 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20 s denatürasyon, 50°C'de 20 s yapisma ve 60°C'de 4 dk'lik uzama evresi olacak sekilde programlanmıştır. Reaksiyon sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucugun içine 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, 50 mM EDTA, 20 mg/ml'lik Glikojen) eklenmiştir. Üzerine 60 µl %95'lik soguk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama islemi gerçekleştirilmiştir. Üstteki kısım

dökülerek 200 µl %70'lik alkol ile +4°C'de 4000 rpm'de 2 dk santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan Plak, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilip yüksek vakum altında kurutulmuştur. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid sölüsyonu konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlanarak cihaza yüklenmiştir.

## **2.6. PAI-1 aktivite tayin yöntemi için 4G/4G ve 5G/5G Klonların Hazırlanması:**

### **2.6.1. Klonlama için Primer Dizayni:**

Bu tez çalışmasında klonlama yöntemi PAI-1 -675 4G/5G promotor değişimi için kullanılmıştır. İleriki bölümde bahsedilecek lusiferaz aktivite analizi için öncelikle klonlanacak PAI-1 -675 4G ve 5G alleleri site-directed mutagenesis yöntemi ile hazırlanmıştır.

#### **2.6.1.1. Site-directed mutagenesis:**

Bu yöntem temel üç PZR'na dayanır. İstenilen gen bölgesi, -675 PAI-1 promoter bölgesi için dizayn edilen sentetik oligonükleotidler haricinde mutasyon yaratmak amacı ile mutant oligonükleotidler kullanılmıştır. PAI-1 promoter dizisi için -829, + 36 bölgelerini içeren PZR reaksiyonu için ve -675 promoter dizisine özgü delesyon yaratmak amacı ile mutant ileri ve geri sentetik oligonükleotidler dizayn edilmiştir. F, ileri sentetik oligonükleotid dizisi Kpn I restriksiyon endonükleaz enzim tanıma dizisine sahiptir. Her enzimin kendine özgü overlap ek dizi içermesi gerektiğinden enzim aktivasyonu için GGTAC?C dizisinin önüne GG nükleotidleri eklenmiştir. R, geri sentetik oligonükleotid dizisi ise Xho I restriksiyon endonükleaz enzim tanıma dizisine sahiptir. Enzim aktivasyonu için C?TCGAG dizisinin önüne CCGG nükleotidleri eklenmiştir.

■ F: 5'GGGGTACCCGTTGGTCTCCTGTTTCCTTACCAAGC 3'

■ MF:5'GAGTCTGGACACGTGGGGAGTCAGCCGT 3'

■ R:5' CCGGCTCGAGGACAGCGCTCTTGGCCCTGCAGCCA 3'

■ MR: 5' ACGGCTGACTCCCCACGTGTCCAGACTC3'



İlk Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları, (F/ MutantR sentetik oligonükleotid çifti kullanılarak yapılmıştır): 94°C' de 7 dk, 94°C' de 1 dk 60°C' de 1 dk 35 siklus ve bunu takiben 72°C' de 1 dk ve son uzama basamağı 72°C' de 7 dk olarak gerçekleştirilmiştir.

İkinci Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları, (MutantF/ R sentetik oligonükleotid çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir): 94°C' de 7 dk, 94°C' de 1 dk 60°C' de 1 dk 35 siklus ve bunu takiben 72°C' de 1 dk ve son uzama basamağı 72°C' de 7 dk olarak gerçekleştirilmiştir.

Birinci ve ikinci PZR'u sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek jelden tek bant olarak pürifiye edilmiştir (Qiagen,USA). Pürifiye edilen ürünler hedef DNA olarak kullanılmış ve üçüncü PZR'u gerçekleştirilmiştir.

Son Polimeraz zincir reaksiyonu ise, ( F/ R sentetik oligonükleotid çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir): 94°C' de 7 dk, 94°C' de 1 dk 60°C' de 1 dk 35 siklus ve bunu takiben 72°C' de 1 dk ve son uzama basamağı 72°C' de 7 dk olarak gerçekleştirilmiştir.

## **2.6.2. RFLP Yöntemi ile Plazmid ve Klonlanacak Gen Dizilerinin Hazırlanması:**

Bu tez çalışmasında klonlama yöntemi PAI-1 -675 4G/5G promotor değişimi için kullanılmıştır. İleriki bölümde bahsedilecek lusiferaz aktivite analizi için öncelikle klonlanacak PAI-1 -675 4G ve 5G alleleri site-directed mutagenesis yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan -675 5G ve bir guanin delesyonu içeren 4G promoter dizileri -829, +36 promoter dizileri şeklinde klonlama için amplifiye edilmiştir. -829 ileri sentetik oligonükleotidi Kpn I restriksiyon endonükleaz enzim tanıma bölgesi overlap dizisi içermektedir. +36 geri sentetik oligonükleotidi ise XhoI restriksiyon endonükleaz enzim tanıma bölgesi overlap dizisi içermektedir.

KpnI



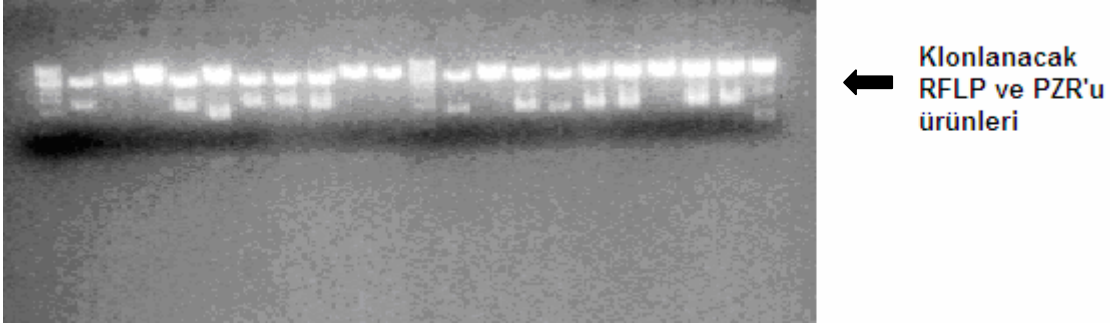
XhoI



Kpn I ve XhoI restriksiyon endonükleaz enzim tanıma bölgeleri kullanılarak PZR'u ürünleri klonlama için daha önce RFLP yöntemi olarak tariflenen metod ile 37°C'de bir gece inkübasyon ile hazırlanmıştır.

### 2.6.3. Klonlama için RFLP Yöntemi ile Hazırlanan örneklerinin Purifikasyonu:

Bu tez çalışmasında tüm klonlamada kullanılacak PZR ve RFLP ürünleri agroz jelde yürütüldükten sonra jelden tek bant olarak tekrar edilmiş ve elde edilen özgül ürünler ile çalışmaya devam edilmiştir.



Şekil 2.6. RFLP ve PZR'u ürünlerinin ve jelden kesim ile tekrar izolasyon sonrası agroz jelde görünümü.

#### 2.6.3.1. Agroz Jelden DNA Purifikasyonu:

Bu tez çalışmasında tüm agroz jelden DNA izolasyonları kit ile yapılmıştır (Qiagen, USA). Agroz jelde yürütülen PZR ve RFLP ürünleri üç aşamalı purifikasyon ile izole edilmiştir. Agroz jelden UV altında çıkarılan ürünlerin 50°C'de 10 dak. inkübasyonu ile jel tekrar çözünür hale getirilmiştir. DNA ürünlerinin solüsyona geçişini sağlayan tampon ile inkübasyonundan sonra (1:3 hacim), üç aşamalı izolasyon işlemi ile saflaştırılır.

**I. Asama:** Elde edilen DNA ürünlerini içeren solüsyonun 70bp.-10kb. hassasiyetinde özel hazırlanmış filtreden santrifüj işlemi (13.000 rpm, 1 dak.) yardımı ile geçirilerek DNA ürünlerinin filtreye bağlanmasının sağlanması, **II. Asama:** Filtreye bağlanan DNA örneklerinin 750µl 96-100 % etil alkol eklenen yıkama tamponu ile santrifüj edilmesi (13.000 rpm, 1 dak.). **III. Asama:** Filtreye bağlanan ve yıkama tamponu ile kimyasallardan arındırılmış DNA ürünlerinin 50µl 10 mM Tris·Cl, pH 8.5 veya deiyonize su ile çözünür hale getirilmesi (13.000 rpm, 1 dak. santrifüj işlemi ).

#### Filtreye Bağlanma Asaması:



#### Yıkama Asaması:



#### Sulandırma Asaması:



Sekil 2.7. Agaroz jelden DNA elde edilmesi.

#### 2.6.4. Klonlama için Plazmid Hazırlanma Asaması ve Gen Ligasyonu:

Daha önce PZR ve RFLP yöntemi ile klonların hazırlanış bölümlerinde açıklandığı gibi klonlanacak gen dizisi ve klonların sokulacağı plazmid (vektör) RFLP metoduyla birbirine ligasyona hazırlanır. Daha sonra ligasyon işlemi ile istenilen gen plazmide sokularak klonlanır.

##### 2.6.4.1. Ligasyon:

Ligasyon işlemi için ;

10X ligasyon tamponu: 300mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT ve 10mM ATP, T4 ligaz enzimi ve klonlamaya RFLP yöntemi ile hazırlanan ve agaroz jelden daha önce tariflendiği gibi pürifiye edilmiş hedef PZR ürünü ve plazmid kullanılır.

Ligasyon işlemi; tüp içerisinde klonlanacak PZR ile amplifiye edilmiş DNA dizisinin klonlamada aracı vektör olarak kullanılacak plazmid DNA' sinin içine kovalent bağ oluşturularak sokulması işlemidir. Ligasyon reaksiyonu belirtilen tampon ve T4 ligaz enzimi aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda karıştırılıp toplam hacim genel itibarıyla 10-20 µl olacak şekilde 16 °C'de 16 saat süre ile inkübasyona tabi tutularak gerçekleştirilir.

	Son Konsantrasyon
(ddH <sub>2</sub> O) Nuclease-Free distile Su	-
10x Ligasyon tamponu	1x
Hedef gen dizini içeren DNA	
Plazmid DNA	
Toplam DNA miktarı	50-400 ng
T4 DNA Ligaz	0,1-1 ünite

**Tablo 2.3. Ligasyon yöntemi komponentleri**

### **2.6.5.Klonların Transformasyon ile Sub-Klon Bakteriye aktarılması:**

Ligasyon işlemi ile birbirine kovalent bağ ile bağlanan vektör ve PZR ile amplifiye edilmiş klonlanacak DNA dizini bakteriler kullanılarak çoğaltılmaya çalışılmıştır. Bu işlem için BRL catalog #: 8265SA numaralı DH 5 alpha sub klonlamaya uygun bakteri serisi kullanılmıştır. Transformasyonda uygulanan protokol ;

1. -70°C dondurucularda muhafaza edilen stok bakteri hücreleri buz üzerinde çözünür.
2. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine nazikçe karıştırılan stoktan 50'er µl olacak şekilde bölünür.
3. Hazırlanan tüpler öncelikle soğuk su banyosuna veya etanol ile soğuk muameleden sonra tekrar -70°C de dondurulur ve her kullanımda sadece 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpünde 50 µl bakteri hücresi kullanılır.
4. -70°C den çıkarılan 50 µl bakteri hücresi buz üzerinde 10 dak. inkübe edilir.
5. 2 ng DNA (plazmid) ilave edilir ve iyice karıştırılır.
6. 30 dak. Buz üzerinde inkübe edilir.
7. 37°C' de 20-30 saniye sıcaklık farkı ile hücreler soka tabi tutulur.
8. Tekrar buz üzerinde 2 dak. inkübe edilir.
9. Oda ısısındaki LB tamponundan 950 µl. ilave edilir.
10. 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra LB agarlı plakelere kültüre edilir. (LB agarlı plate hazırlanırken klonlamada kullanılan plazmidlerin sahip olduğu antibiyotik rezistansına uygun antibiyotik besiy ortamına ilave edilir).
11. 37°C'lik etüvde gece boyunca inkübasyona tabi tutulur.

#### **2.6.5.1. Transformasyonda kullanılan LB Tampon Hazırlanışı:**

1. Tripton 10g/Lt
2. Maya Ekstraktı 5 g./Lt.
3. NaCl 10g./Lt. olacak şekilde karışım hazırlanır ve mutlaka otoklavlanır.

### **2.6.5. 2.Transformasyonda kullanılan LB Agar Hazirlanisi:**

1. Tripton 10g/Lt
2. Maya Ekstrakti 5 g/Lt.
- 3.NaCl 10g./lt.
4. Bakto Agar 10g./Lt.
5. Plazmidin sahip oldugu rezistansa göre antibiyotik cinsine göre miktarı ayarlanan antibiyotik ilave edilerek hazirlanir ve mutlaka otoklavlanir.

### **2.6.6. Klonların Aktarıldığı Bakteri Hücrelerinden Tekrar Amplifiye edilen Pozitif Plazmidlerin İzolasyonu için İnokülasyon:**

Transformasyon işlemi sonrası plazmidlerin sahip oldukları antibiyotik rezistansından yararlanılarak ayrılan ve tek koloni düşürülen pozitif koloniler inokülasyon işlemi ile üretilirler;

1. İnokülasyon işlemi sırasında kontaminasyon riski yüksek olduğundan mutlaka bek alevi etrafında çalışılmalıdır, öncelikle yeterli sterilitede ortam hazirlanir.
2. İnokülasyon tüplerine oda isisindeki LB tamponundan 5 ml. konur.
3. Antibiyotikli LB agarlı kaplarda kültüre edilen plazmidler tek koloni düşürmüş olduklarından direkt olarak inokülasyona alınırlar, steril pipet uçları yardımı ile koloniler LB tamponlu tüplere aktarilir.
4. 37°C'lik çalkalayıcı etüvde gece boyunca inkübasyona tabi tutulur.

### **2.6.7. İnokülasyon Ürünlerinden Plazmid İzolasyonu:**

Elde edilen inokülasyon ürünlerinden pozitif olan amplifiye olmuş plazmid DNA' ları (Qiaprep miniprep, Qiagen, USA) kit ile izole edilmistir. Kullanılan kit yöntemi kolomlara plazmid DNA'sinin bağlanması ve daha sonraki yıkama aşamaları ile kolomdan tekrar temiz tüplere aktarılması prensibine dayanan bir tekniktir. Daha önceki bölümde kit ile DNA örneklerinin jelden izolasyonuna benzer temel prensip ile kültür ortamından plazmid

DNA' lari izole edilmistir.

### **2.6.8.Plazmidlerin Klon Açısından Degerlendirilmesi:**

Inokülasyon ile bakteriyal ortamda üretilen vektörler hücre kültürüne geçilmeden yani hücre serileri plazmidler ile enfekte edilmeden önce pozitiflik açısından degerlendirilmistir.

#### **2.6.8.1.PZR ile Plazmid- Klon Degerlendirilmesi:**

Inokülasyon ürünleri içerdikleri plazmidlerin içine sokmayı hedefledigimiz dogru gen bölgelerini içerip içermediklerinin teyidi için miniprep kit yöntemi ile izolasyondan önce direkt olarak kalıp DNA olarak kullanilip PZR u ile degerlendirilmistir. Miniprep yöntemi, hazirlanan Luria Bertani (LB) agarli plateler üzerine ekim yapilmis klonlu plazmidlerin sub-klon bakteriler ile ekimi ile gerçekleştirilir. LB pletleri plazmidin rezistans oldugu antibiyotik içerdiginden plazmid ile enfekte olmus bakteri kolonileri olusur. Tek koloni düşürülerek steril iğne uçlu öze yardimi ile bu koloniler LB tamponu içerisine alinarak 37 °C'de bir gece inkübasyon uygulanir. Bizim çalışmamızda Miniprep (Promega,USA) kolon yöntemi ile pozitif plazmidler öncelikle kolona yapistirilip daha sonra yıkama solüsyonlari ile yikanip saf halde elde edilmistir. Miniprep yöntemi ile plazmid DNA izolasyonuna sadece PZR da pozitiflik gösteren LB'de inkübe olmus örnekler ile devam edilmistir.

#### **2.6.8.2.RFLP Yöntemi ile Plazmid- Klon Degerlendirilmesi:**

PZR sonucunda pozitif olduğu düşünölen plazmid örneklerinin bir sonraki asamada, inokülasyon ürünlerinden plazmid eldesi sirasinda kaybedilme olasiligi bulunmaktadir. Koloma baglanan plazmidlerin solüsyonlar ile yıkama asamasinda kaybedilmesi durumunda ya da kit yönteminin son asamasi olan kolomdan tekrar solüsyona geçirilmesi asamasinda plazmidin kolomda bagli kalarak kaybedilmesi olasiliklari düşünölerek PZR sonucu pozitif olan plazmid örneklerine ait inokülasyon örneklerinden DNA izolasyonu sonrasinda plazmidler RFLP yöntemi kullanilark plazmid içine sokulan gen dizilerinin kesim bölgeleri ile kontrol edilmistir.

■ F:5'GATC GGATCC tgaattgacactctgtttctatccctt3'

■ R:5' TGCA CTGCAG tgctctcctgcagtcacccctagggcagg 3'

Yukarıda belirtilen ileri ve geri oligonükleotidler dizayn edilirken oluşturulan overlap bölgelerinin önüne KpnI ve XhoI restriksiyon endonükleazlar enzimlerinin kesim tanıma bölgeleri eklenmiştir. Overlap dizileri ileri oligonükleotid için 5' ucunda GATC ve geri oligonükleotid için 5' ucunda TGCA olarak dizayn edilmiştir. Bu diziler kullanılan restriksiyon endonükleazlarının tanıma bölgelerinden plazmidi kesebilmesi için gerekli aktivasyon dizileridir.

KpnI

```
5'...GGTACC...3'
3'...CCATGG...5'
```

XhoI

```
5'...CTCGAG...3'
3'...GAGCTC...5'
```

Enzim tipine göre değişen overlap dizileri ile tamamlanan tanıma bölgeleri kullanılarak içeriye sokulan dizilerin kesimi ile pozitiflik kontrol edilmiştir.

## 2.7. Hücre Kültürü:

Bu doktora tez çalışmasında hazırlanan PAI-1 4G/5G klonlarının obezite üzerindeki etki mekanizmasının anlaşılması amacıyla preadiposit hücre serisinden yağ hücre serisi oluşturulmuştur. Preadipositlerden adipositlere farklılaşma sırasında klonlar ile enfekte edilen hücre serileri takibi ile yağ oluşumu ile PAI-1- 4G/5G genotip farklılığı ilişkisi ortaya konmuştur. 3T3L1 preadiposit hücre serisi (American Type Culture Collection, Manassas, VA) normal büyüme ortamları;



- DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium,Gibco,USA, Kat No: 12800)
- 10% fetal bovine serum, (Hyclone ,USA, Kat No: 1115-L)
- 2 mM L-glutamine,
- 50 U/ml of penicilin ve 50 µg/ml streptomycin (Gibco,USA, Kat No: 15070) mediumu içerisinde ve 37 °C 5% CO2 ortam olarak gerçekleştirilmiştir.



**Sekil 2.8. Preadiposit hücre serisi**

### **2.7.1. Preadiposit Adiposit hücre farklılaşması:**

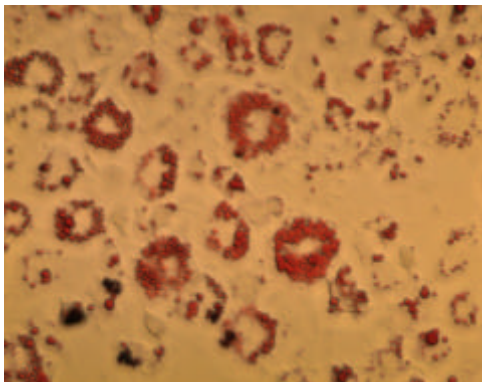
İki gün sonra plate yeterli derecede hücre yoğunluğuna sahipken adipogenic hormonal kokteyl (1 ug/ml insulin, 0.25 uM dexamethasone, and 0.5 mM isobutylmethylxanthine and 1mM TZD ) ilave edildi.

- 2 gün bu şekilde hücreler farklılaşma mediumu ile inkübe edildikten sonra insülin miktarı değiştirilerek farklılaşma protokolüne devam edildi.
- DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium,Gibco,USA, Kat No: 12800) ve 10% FBS ile 0.1% P/S karışımı medium içerisinde ilave edilen kokteylin içerdiği insülin miktarı sırasıyla;

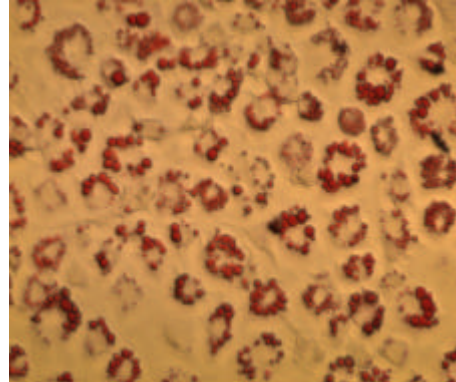
- insulin (1 µg/ml) iki gün süre ile uygulandı
- 0,5 ug/ml insulin ile differensiyasyona devam edildi.
- intraselüler lipid damlacıkları ilk 4 ile 6 gün arasında gözlemlenmeye başlandı.
- Farklılaşma ile preadipositlerden olgun adiposit hücreler elde edildiğinde yağ damlacıkları intraselüler yağ akümülyasyonlarının Oil red O tipi boyanması ile görüntülenebilir;

### 2.7.2. Oil Red O Boyama:

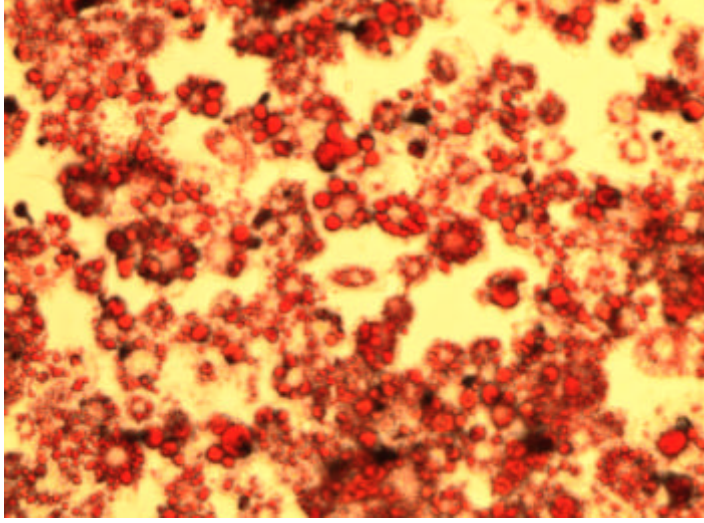
1. Görüntülenecek olan hücre serisi öncelikle yağ damlacıklarından dolayı yüzeye yapışkanlıklarını kaybetme eğilimindedirler. Bu nedenle öncelikle 4 %'lük formaldehid ile fiksasyon yapılarak hücreler ürettikleri plate ya da flask yüzeyine sabitlendi.
2. Fosfat içeren tuzlu tampon (PBS) ile 1 saat inkübe edilerek formaldehid uzaklaştırıldı.
3. Yikanan hücreler 0.4%'lük filtre edilmiş Oil red O boyası ile 30 dakika inkübe edildi.
4. 60 %'lik isopropanol ile 3 defa yıkandı.
5. PBS ile son yıkama yapıldıktan sonra görüntüleme yine PBS içerisinde yapıldı.
6. Oil red O pozitif olan hücrelerin negatif hücrelere yüzdesi ile farklılaşma oranı tanımlanmıştır ( 40X magnifikasyon kullanıldı).



(a)



(b)



(c)

**Sekil 2.9. (a) Oil Red O ile boyanmis Adipogenic hücreler 4. gün, (b) Oil Red O ile boyanmis Adipogenic hücreler 7.gün, (c) Oil Red O ile boyanmis Adipogenic hücreler 10. gün**

### **2.7.3. Hazirlanan Klonlarin Hücelere Tranfeksiyon ile Enfekte Edilmesi:**

Tranfeksiyon genel anlamıyla hazirlanan klonlarin içerisinde bulunduğu plazmidlerin hücre serilerine sokulmasi olarak tanimlanabilir. Tranfeksiyonda en sik ve basarili bir sekilde kullanılan vektörler plazmidlerdir. Bizim çalismamizda klonlamada Duol-Glo Lusiferaz sistemine ait iki plazmid kullanilmistir. pGL-3 : Hazirlanan klonlarin içerisinde sokulduğu temel plazmid ve pRL-TK: kontrol standart plazmidi ile klonlama gerçeklestirilmistir.

Plazmidler ile hücre enfeksiyonu farkli kimyasal yöntemler ile yapilabilmektedir. Bu doktora tez çalisma kapsamindaki PAI-1 4G/5G promoter polimorphizminin yag hücre farklılasmasina etkisinin arastirilmesi safhasinda yani obezite olusumundaki ilskisinin aydinlatilmasinda trasfeksiyon islemi kit yöntemi ile gerçeklestirilmistir (Qiagen, Effectin kiti, ABD).

### 2.7.3.1. Transfeksiyon Asamaları:

- 80-90 % kalabalıkta hücre serileri hazırlanır,
- Kit protokolünde tavsiye edilen oranlarda plazmid miktarı sağlanır,
- Plazmid örneği uygun miktardaki medium ve enhansir reaksiyon hızlandırıcısı ile muamele edilir
- Vortekslenerek karıştırılır,
- lipozomal olmayan lipid yapısındaki efektin adı verilen solüsyon uygun miktarda ilave edilir,
- 5-10 dakika oda ısısında inkübe edilir,
- Hücre mediumu değiştirilerek taze büyüme mediumu üzerine çok yavaş hazırlanan karışım ilave edilir. Aşağıda plazmid DNA miktarlarına göre solüsyonların oranları belirtilmiştir;

0.5	0.5 µg DNA 4 µl Enhancer 5 µl Effectene	0.5 µg DNA 4 µl Enhancer 12.5 µl Effectene	0.5 µg DNA 4 µl Enhancer 25 µl Effectene
1.0	1 µg DNA 8 µl Enhancer 10 µl Effectene	1 µg DNA 8 µl Enhancer 25 µl Effectene	1 µg DNA 8 µl Enhancer 50 µl Effectene
2.0	2 µg DNA 16 µl Enhancer 20 µl Effectene	2 µg DNA 16 µl Enhancer 50 µl Effectene	2 µg DNA 16 µl Enhancer 100 µl Effectene

**Tablo 2.4.. Transfeksiyonda kullanılan kimyasallar ve miktarları.**

**Efektin:** Lipozomal olmayan lipid formülasyonudur. Bu formülasyon 1987' lerde lipozomal yöntem olarak tanımlanmıştır. Missel yapısındadır. Pozitif yüklü misel yüzeyi nükleik asitlerin negatif yüklü fosfat isketine bağlanma eğilimindedir. Transfeksiyon sonunda oluşan kompleks pozitif yüküdür ve negatif yüklü hücre membranına bağlanır. Efektin bu asamada bağlanmayı sağlayan ajandır.

**Enhansir:** Enhansir öncelikle plazmid DNA'sına kondanse olur. Böylelikle efektin ile katotik lipidler ile sarılmış ve hücreye membrandan bağlanmış DNA molekülünün ökaryotik hücre serilerine sokulmasını sağlar.

### **2.7.3.2. Dual-Glo Lusiferaz Klon Analiz Sistemi :**

Transfekte olan hücre serilerinde aktivasyon tayini için Duol-Glo lusiferaz yöntemi kullanılmıştır. Klonlama temel prensiplerine bağlı olarak plazmid ve içeri sokulacak gen dizisinin enzim haritaları çıkarılmıştır. Klonlanan gen dizisi içerisinde yer almayan plazmid origin bölgesinde tanıma bölgesi bulunan enzimler tercih edilerek PAI-1 promotör dizisinin 4G/4G ve 5G/5G genotipleri pGL-3 plazmidine sokulmuştur. Duol-Glo lusiferaz sisteminde kullanılan iki temel plazmid bulunmaktadır. Bu vektörler içerdikleri isima veren iki floresan protein dizisi içerirler. Firefly ve renilla floresanları kimyasal reaksiyon mekanizması ile isima vermektedir.

<i>Acc I</i>	1	2011	<i>Eag I</i>	3	1755, 1759, 4651
<i>Acc III</i>	2	783, 1299	<i>EclHK I</i>	1	3153
<i>Acc65 I</i>	1	1	<i>Eco47 III</i>	1	2136
<i>Acy I</i>	4	95, 121, 1514, 3690	<i>Eco52 I</i>	3	1755, 1759, 4651
<i>Afl III</i>	3	15, 581, 2260	<i>EcoCR I</i>	1	9
<i>Alw26 I</i>	5	1111, 1343, 1409, 3214, 3990	<i>EcoN I</i>	3	645, 1045, 1705
<i>Alw44 I</i>	2	2574, 3820	<i>Ehe I</i>	1	122
<i>AlwN I</i>	1	2676	<i>Fse I</i>	1	1761
<i>AspH I</i>	5	11, 1553, 2578, 3739, 3824	<i>Fsp I</i>	2	3375, 4548
<i>Ava I</i>	3	26, 32, 1144	<i>Hinc II</i>	3	1392, 1902, 2012
<i>Ava II</i>	3	1267, 3291, 3513	<i>Hind II</i>	3	1392, 1902, 2012
<i>BamH I</i>	1	2004	<i>Hind III</i>	1	53
<i>Ban II</i>	4	11, 33, 1112, 4231	<i>Hpa I</i>	1	1902
<i>Bbe I</i>	1	124	<i>Hsp92 I</i>	4	95, 121, 1514, 3690
<i>Bbs I</i>	4	98, 1376, 1492, 2089	<i>Kas I</i>	1	120
<i>Bbu I</i>	1	751	<i>Kpn I(p)</i>	1	5
<i>Bcl I</i>	1	668	<i>Mlu I</i>	1	15
<i>Bgl I</i>	2	3273, 4541	<i>Nae I</i>	3	1759, 2130, 4199
<i>Bgl II</i>	1	36	<i>Nar I</i>	1	121
<i>Bsa I</i>	1	3214	<i>Nco I</i>	1	86
<i>BsaA I</i>	1	4302	<i>NgoM IV</i>	3	1757, 2128, 4197
<i>BsaB I</i>	1	2003	<i>Nhe I</i>	1	21
<i>BsaH I</i>	4	95, 121, 1514, 3690	<i>Not I</i>	1	4651
<i>BsaM I</i>	3	60, 1823, 1916	<i>Nsp I</i>	2	751, 2264
<i>Bsm I</i>	3	60, 1823, 1916	<i>PaeR7 I</i>	1	32
<i>BspH I</i>	3	671, 2980, 3988	<i>PpuM I</i>	1	1267
<i>BspM I</i>	3	1477, 1486, 4781	<i>PshA I</i>	1	2075
<i>BsrBR I</i>	1	2003	<i>Psp5 II</i>	1	1267
<i>BsrG I</i>	1	578	<i>PspA I</i>	1	26
<i>BssS I</i>	2	2433, 3817	<i>Pvu I</i>	2	3523, 4569
<i>BstZ I</i>	3	1755, 1759, 4651	<i>Sac I</i>	1	11
<i>Clal</i>	3	1997, 4709, 4813	<i>Sal I</i>	1	2010
<i>Csp45 I</i>	1	257	<i>Sca I</i>	3	253, 3633, 4716
<i>Dra I</i>	4	1963, 3019, 3038, 3730	<i>SgrA I</i>	1	1516
<i>Dra II</i>	1	1267	<i>Sin I</i>	3	1267, 3291, 3513
<i>Dra III</i>	1	4305	<i>Sma I</i>	1	28
<i>Drd I</i>	3	1489, 2368, 4349	<i>Sph I</i>	1	751
<i>Dsa I</i>	2	86, 458	<i>Srf I</i>	1	28
<i>Eae I</i>	4	1755, 1759, 3541, 4651	<i>Ssp I</i>	3	3957, 4510, 4625
			<i>Sty I</i>	1	86
			<i>Vsp I</i>	1	3325
			<i>Xba I</i>	1	1742
			<i>Xcm I</i>	1	823
			<i>Xho I</i>	1	32
			<i>Xma I</i>	1	26
			<i>Xmn I</i>	1	3752

Tablo 2.5. pGL 3 plazmid enzim haritasi.

Duol-Glo lusiferaz sisteminde pRL-TK renilla adi verilen firefly klon isimasindan farklı bir isim veren floresan protein dizisi içeren vektör kullanılmıştır. Bu kontrol plazmidinde herhangi bir klon içeri sokulmadan renilla proteini sürekli sentez halindedir. Elde edilen veriler ile PGL3 klon plazmidinden alınan firefly isimasinin renillaya oranlanması sonucunda PAI-1 4G/5G promoter polimorfizminin aktivasyon farklılığı preadiposit ve adiposit hücre serilerinde karşılaştırılmıştır.

## **2.8. Western Blot:**

Western blot moleküler biyolojide protein varlığını ya da yokluğunu ortaya koyma amacıyla ve varsa miktarını tayin veya karşılaştırma amacı ile kullanılır. SDS-PAGE uygulamasından sonra elektroblot yöntemi ile proteinler membrana aktarılır. Membranların birincil ve ikincil antibodiler ile muamele edilmesiyle nicel olarak proteinler tayin edilir.

### **2.8.1. SDS PAGE:**

Öncelikle transfeksiyon ile klonlanan plazmidlerin hücre içerisine sokulmasında sonra Duol-Glo lusiferaz aktivite tayin yöntemi ile PAI-1 4G/5G genotip farklılığı karşılaştırılmıştır, bu verilerin western blot analizi ile teyidi için SDS PAGE jelleri kullanılmıştır.

#### **2.8.1.1. Akrilamid-Bisakrilamid :**

%30'luk T/2.6%C 37.5:1, stoğu akrilamid-bisakrilamid PAGE solüsyonu kullanılarak kullanılmıştır.. 380 g Akrilamid (Merck, Almanya) ve 20 g N,N'-metilen-bisakrilamid (Sigma, Almanya) bir miktar distile su ile 37°C' de ısıtarak kimyasalların çözünmesi sağlanarak hacim distile su ile 1000ml' ye tamamlanmıştır (Sambrook 1989).

#### **2.8.1.2. TBE Tampon Çözeltisi:**

Tris 54 gr, Borik asit 27.5 gr, 0.5 M EDTA 20 ml alınarak 1 lt ye deiyonize su ile tamamlanmıştır. 5X TBE hazırlandıktan sonra distile su ile 1/5 oranında seyreltilerek 1X TBE çözeltisi jel yürütme tamponu olarak hazırlanmıştır.

### **2.8.1.3. APS Hazirlanisi:**

%10'luk Amonyum Persulfat, 1 gr Amonyum Persulfat 'in (AppliChem, Almanya) distile su ile 10 ml'lik hacime tamamlanmasi ile hazirlanmistir.

### **2.8.1.4. Tris-HCL:**

İki farkli yogunlukta jel hazirlanmasi amaci ile 1.5 M pH 8.8 ve 0.5 M pH 6.8 olacak sekilde Tris-HCL hazirlanmistir.

### **2.8.1.5.SDS:**

10% 'luk SDS hazirlanmistir.

### **2.8.2.Elektroforez Aparatinin Hazirlanmasi;**

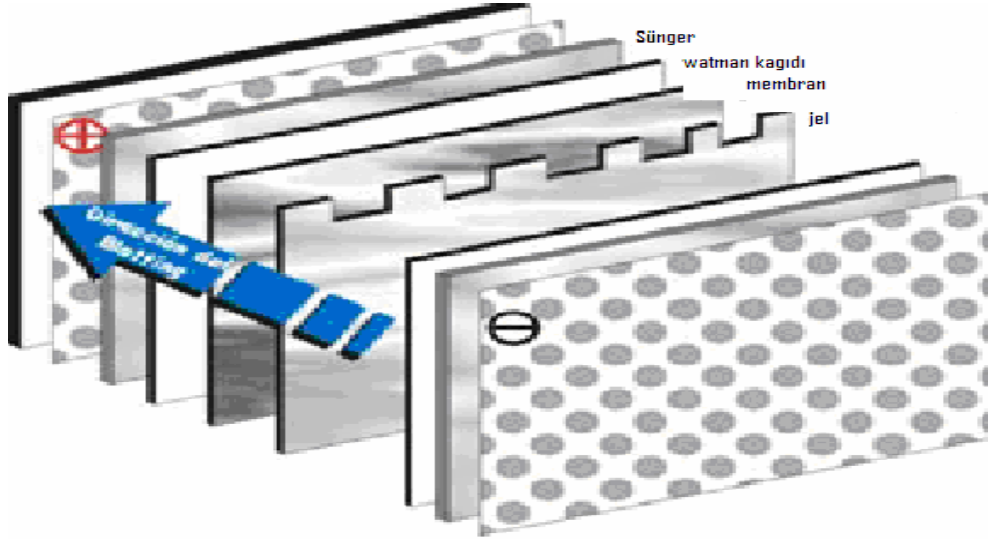
Camlar bol su ile iyice yikandiktan sonra deiyonize suyla durulanarak 70%'lik alkolle temizlenip kurutulmustur. Sonra camlar arasina 1 mm kalinliginda spacerler yerlestirilerek jel döküm asamasina hazirlanmistir.

**Daha sonra jel hazirlama asamasina geçilir;** 10cmx10 cm 'lik PAGE için %30'luk akrilamid-bisakrilamid stogundan 2.133 ml yürütme jeli için 267µl stacking jel için, distile sudan 3.743 ml yürütme jeli için, 1.201 ml. stacking jel için, Tris-HCL pH 8.8 1.5M yürütme jeli için 8 ml pH 6.8 0.5 M stacking jel için 2 ml kullanilmistir. Bu karisim üzerine 40µl %10'luk Amonyum Persulfat/10 µl , 80µl /20µl SDS ve TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamid) (Sigma, Almanya) eklenerak hazirlanmis jel, camlar arasina dökülmüştür. Jel döküldükten sonra 1 mm'lik taraklar camlar arasina yerlestirilip ve örneklerin yükleneci kuyular olusturulmustur.

Örnekler SDS PAGE ile yürütüldükten sonra elektroblot islemine geçilir. Bu islem sandviç yöntemi olarak da bilinir. Jel içinde sabitlanmis ve ayrilmis protein örneklerinin nitro selüloz membran üzerine geçirilmesi amaci ile transfer islemi gerçekleştirilmistir. Anot ve katot plakalari aüzerine süngerler ve aralarina watman kagtlarindan geçirgen bir



set yapilir. Üzerine jel konur jelin üzerine membran yerlestirilir. Ve yine watman kagidi ile geçirgenlik artirilir. Elektroforez ortaminda transfer saglanir.



Sekil 2.10. Western –blot yöntemi

Transfer islemi tamamlandıktan sonra PAI-1 ekspresyon miktar tayini için birincil keçi antikorları ve buna bağlanacak ikincil anti-keçi antikorları kullanılmıştır. PAI-1 ekspresyonunun western konfirmasyonu için aktin fare primer ve anti fare ikincil antikorları kullanılmıştır.

## 2.9. PAI-1 Gen Ekspresyonunun siRNA Yöntemi ile Azaltılması:

Interfering küçük RNA yöntemi viral klonlara yerleştirilen oligonükleotidler ile gen ekspresyonunun durdurulması esasına dayanır. Bu doktora tez çalışması kapsamında PAI-1 gen ekspresyonunun durdurulması amacı ile siRNA dizaynı yapılmıştır. RNA dizisinin içine sokulacağı vektör virüs pLentiLox 3.7 kullanılmıştır. LOCUS LL3.7 7650 bp halkasal DNA SYN olarak gen bankasında yer almaktadır.

### 2.9.1. siRNA dizayni:

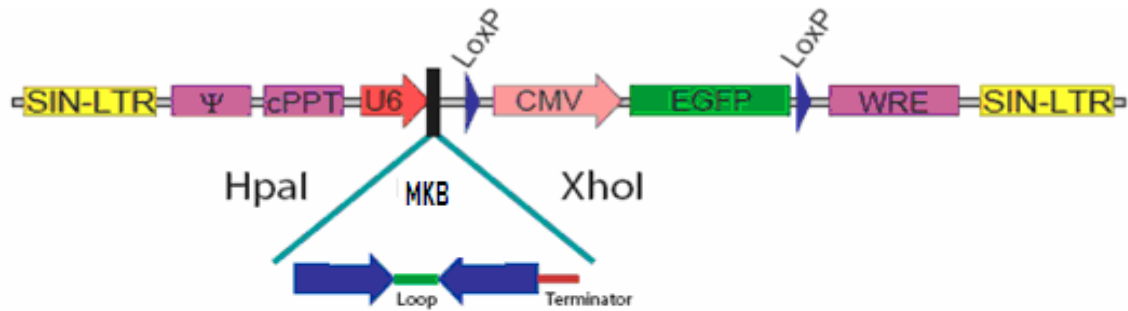
Sense ve antisense iki oligo dizayn edilmiştir.

Sense oligo: 5'T-(GN18)-(TTCAAGAGA)-(81NC)-TTTTTC

Antisense oligo olarak ise sense oligo dizisine komplementer olarak dizayn edilmiştir ancak farklı olarak 5' ucuna XhoI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi ile overlap uç yaratılmıştır. U6 promotor bölgeye tekrar -1 yaratmak amacıyla G(N18) dizisini başlangıcına T nükleotidi eklenmiştir. TTCAAGAGA dizisi ise loop oluşturabilmek için eklenmiştir. 3' ucuna sonlandırma dizisi olarak 6 T nükleotidi eklenmiştir.



siRNA dizaynında dikkat edilen diğer bir unsur ise klonlamada ligasyon işleminin gerçekleştirilmesi için pLL3.7 vektörünün 5' ucuna Hpa I restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi ile kör uç , 3' ucuna ise XhoI tanıma bölgesi ile yapışkan uç oluşturulmuş olmasıdır.



Şekil 2.11. siRNA yönteminde kullanılan pLentilox 3.7'nin sematik gösterimi.

Sonuç olarak olusturulan PAI-1 siRNA dizileri;

**Sens oligo dizi:** 5' AAC/TG/GGAAGAAACACCCTTTCA/TTCAAGAGA/A  
TGAAAGGGTGTTCCTTCCCA/TTTTTT/C3'

**Antisens oligo dizi :** 5' TCGAG/AAAAAA/TGGGAAGAAACACCCTTTCAT / TCT  
CTTGAA/ATGAAAGGGTGTTCCTTCCCA3' olarak dizayn edilmiştir.

siRNA ile adiposit hücre serilerinin transfeksiyonu daha önce tariflendiği şekilde yapılmıştır. siRNA li ortam real time PZR teknolojisi ile PAI-1 geni için dizayn edilmiş prob ve oligonükleotidler ile değerlendirilmiştir. PAI-1 real time PZR' ileri primeri 5' ggctgacttcacgagtctt tca3' PAI-1 real time PZR' geri primeri 5' aggcgctgcagaaagttaa prob: fam-5'accaagagcctctccacgtcgcg3'-tamra olarak dizayn edilmiştir. Kantitatif olarak PAI-1 ekspresyonu ve siRNA ile endogenous PAI-1 ekspresyonunun durdurulması ile ilaç denemeleri tez kapsamını alınmıştır. Böylelikle özellikle siRNA teknolojisi ile bu doktora tez çalışması ile aydınlatılan yağ oluşumunda PAI-1 gen etkileri adipogenezin takibi ile netleştirilmiştir.

## 2.10. Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Elektroforez Aparatının Hazırlanması: Camlar bol su ile iyice yıkandıktan sonra deiyonize suyla durulanır. 70%'lik alkolle temizlenir ve kurulanır. 0.8 mm'lik spacerlar yardımıyla arada 0.8 mm boşluk bırakılması sağlanır ve klemplerle sabitlenir. Jel döküldükten sonra yine 0.8mm'lik tarak oturtulur.

**%6'lik Jelin Hazırlanması:** %30'luk akrilamidten 15 ml, TBE 5X tamponundan 15 ml, 450µl 10%'luk Amonyum Persulfat (Sigma, ABD), 35µl TEMED (Tetra Etil Metilen Diamin) (Sigma, ABD) konularak 44 ml deiyonize suyla 75 ml'ye tamamlanır. Sabit 150 V, 15 mA'de , soğutma yapılmaksızın 3 saat süreyle olacak şekilde akıma tabi tutulur. Bantlar etidyum bromürle boyanarak Ultraviyole aydınlatmasıyla görünür hale getirilir.

## 2.11. Real Time PZR:

Real time PZR'u ile kantitatif analiz yapılabilmesi için farklılaşmayı takiben adiposit hücre serisinde ve kontrol grubu 3T3L1 hücre serilerinde total RNA izolasyonu yapılmıştır (Promega, USA). Hücreler 2000 g de 5 dak. Santrifüj edilmiş ve oluşan pellet üzerine lize atme tamponu ilave edilmiştir. DNA kontaminasyonun önlenmesi amacıyla RNA örnekleri 15 U DNaseI ; (Promega,USA) ile muamele edilmiştir. Son asamada 25 µl steril dd su ile sulandırılmıştır. RNA konsantrasyonları Nano Drop (ND-1000, 3.2.1.) ile hesaplandıktan sonra 1µg RNA kullanılarak cDNA reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Gene Amp. RNA PCR kit ,Perkin Elmer Cetus,USA). Elde edilen cDNA' ler ile PAI-1 ekspresyonu kontrol ve adipojenik hücre serilerinden LightCycler (Roche, Mannheim, Germany) cihazı ile RT PZR ile kantitatif olarak tayin edilmiştir (Brogren, Karlsson et al. 2004).

gttctgccca agttctccct ggagactgaa gtcgacctca ggaagcccct agagaacctg  
ggaatgaccg acatgttcag acagtttca **ggctgacttcacgagtctttca** g  
accaagagcctctccacgtcgcg c aggcgctgcagaaagtgaa gatcg aggtgaacga

Koyu yazılan diziler ileri ve geri primer dizileri, italik yazılan altı çizili dizi 5'ucu FAM, 3' ucu TAMRA ile işaretli Real time PZR'unda kullanılan oligoları göstermektedir. Kontrol grubu ve adipojenik hücreler PAI-1 ekspresyonu için kantitatif olarak real time PZR'u ile karşılaştırılarak klonlama ve aktivite analiz verileri konfirme edilmiştir.

## 2.12. İstatistiksel Analiz:

Bütün veriler “Hasta Takip” data düzenleyici bilgisayar programı kullanılarak kaydedilmiştir. Sikliklar Yüzde (%), yas ortalamasi median (range), karsilastirma ve risk degerlendirmeleri olasilik oranlari (Odds Ratio=OR) ve Güven Araligi (Confidence Interval) hesaplari 95% güvenilirlik düzeyinde hesaplanmıştır. Testler sonucunda elde edilen, kontrol ve hasta grubu verileri dagilimlari arasindaki iliskinin incelenmesi için istatistiksel bir metod olan “P degeri” “TAD POLE” bilgisayar programinda, verilerin hastalarda kontrollere oranla nasıl bir risk faktörü olup olmadigini belirlemek için “Odds Ratio” = Olasilik Oranlari ise manuel olarak hesaplanmıştır. Farklilasma-aktivite klon deney sonuçlari firefly ve renilla isimlerinin oranlanması esasina dayanarak standart sapmaları hesaplanarak degerlendirilmiştir.

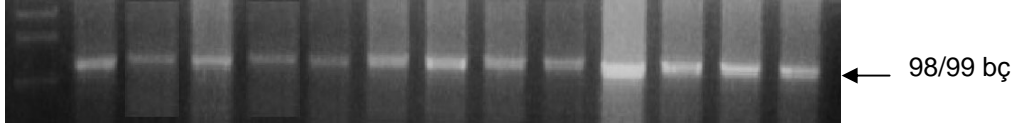
### 3. BULGULAR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Genetik B.D.'da gerçekleştirilen bu doktora tez çalışmasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Endokrinoloji A.B.D. poliklinigine gelen 175 klinik olarak obez tanısı almış olgu ve Sosyal Pediatri bölümünün katkılarıyla yapılan düşük ve yüksek sosyo-ekonomik düzeyli okul çalışmasından 96 çocuk çalışmaya alınarak obezitede anlamlı olabilecek hedef gen değişimleri açısından araştırılmıştır.

#### 3.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 –675 4G/5G Polimorfizmi:

##### 3.1.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 –675 4G/5G Polimorfizminin tanımlanması için PZR:

Plazminojen Aktivatör inhibitör-1'in promotorundan yapılan polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 98-99 bp uzunluğunda oligonükleotit ürünler elde edilmiştir.



Sekil 3.1. PAI-1 98/99 bp. geni promotor bölgesinin PCR görüntüsü.

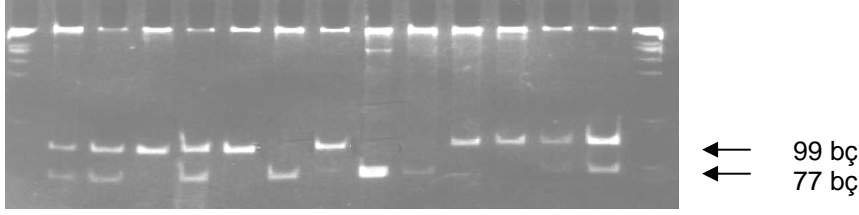
##### 3.1.2. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 –675 4G/5G Polimorfizmini Tanımlamak İçin BseL 1 Restriksiyon Endonükleazi İle Kesim:

Plazminojen Aktivatör inhibitör-1 –675 4G/5G polimorfizmini tanımlamak için BseL 1 restriksiyon endonükleazi ile kesim yapılır. BseL I restriksiyon enzimi 5'-CCNNNNN↓NNGG-3' dizisini tanır ve keser. Enzim 5G genotipi taşıyan bireyi kesecektir. Kesim sonucunda

Homozigot 5G bireyler: 77+22 bp

Heterozigot bireyler: 98/99 +77+21/22 bp

Homozigot 4G bireyler: 98 bp bantları izlenir.



**Sekil 3.2. Plazminojen aktivator inhibitör-1 geni promotor bölgesi -675 4G/5G polimorfizminin BseL1 restriksiyon endonükleazi kullanılarak gösterilmesi**

PAI-1	Yüksek Sosyo-ekonomik Okul	Düşük Sosyo-ekonomik Okul	OR	CI	P
5G/5G	12	13	1		
4G/5G	5	29	5	1.5-18	0.012
4G/4G	10	24	2.3	0.7-6.5	0.14
n	27	64			

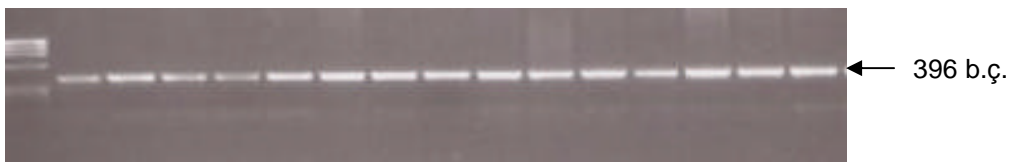
PAI-1	Kontrol	Obez	OR	CI	P
5G/5G	33	26	1		
4G/5G	67	71	1.4	0.7-2.3	0.05
4G/4G	30	67	2.8	1.5-5.5	0.0025
n	130	165			

**Tablo 3.1. PAI-1 -675 4G/5G gen değişiminin hasta-kontrol grupları arasında değerlendirilmesi.**

### 3.2. Adiposit Yağ Asiti Bağlanma Proteini (FABP4, ap2) -87 promotor T/C Polimorfizmi:

#### 3.2.1. Adiposit Yağ Asiti Bağlanma Proteini (FABP4, ap2) -87 promotor T/C Polimorfizminin tanımlanması için PZR:

FABP4 -87 promotor bölgeyi kapsayan polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 396 bp. uzunluğunda oligonükleotit ürünler elde edilmiştir.



**Sekil 3.3. FABP4 geni promotor bölgesinin 396 bp.'lik PCR görüntüsü.**

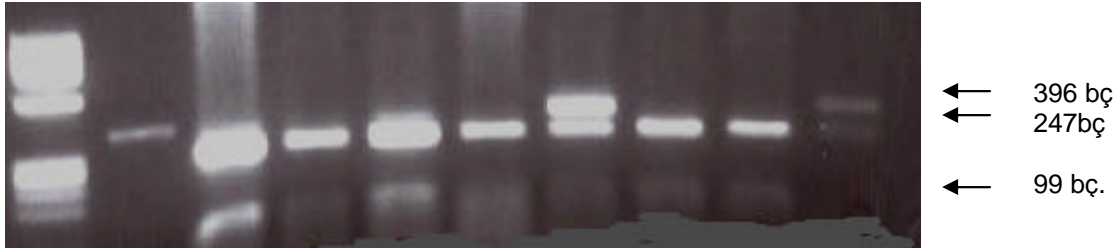
### 3.2.2. Adiposit Yag Asiti Baglanma Proteini (FABP4, ap2) -87 promoter T/C Polimorfizminin tanimlanmasi için Mun 1 Restriksiyon Endonükleazi Ile Kesim:

FABP4 –87 T /C polimorfizmini tanımlamak için Mun 1 restriksiyon endonükleazi ile kesim yapılır. Mun 1 restriksiyon enzimi 5'-C/AATTG-3' dizisini tanır ve keser. Enzim normal diziyi keser. Kesim sonucunda ;

Homozigot normal bireyler: 247/99b.ç.

Heterozigot bireyler: 396/247/99 bç

Homozigot degisim tasiyan bireylerde ise : 396 bç'lik bantlar izlenir.



Şekil 3.4. FABP4 –87 T /C polimorfizminin Mun 1 restriksiyon endonükleazi kullanılarak gösterilmesi.

FABP4	Yüksek Sosyo-ekonomik Okul	Düşük Sosyo-ekonomik Okul	OR	CI	P
TT	27	63	1		
TC	-	1	0.86	0.02-26	0.6
CC	-	-	-	-	
n	27	64			

FABP-4	Kontrol	Obez	OR	CI	P
TT	72	90	1		
TC	33	3	0.07	0.02-0.2	0.00001
CC	1	-	0.4	0.01-12	0.7
n	106	90			

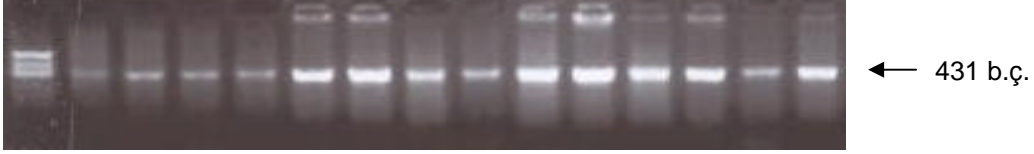
Tablo 3.2. FABP 4 -87 T/C gen degisiminin hasta-kontrol gruplari arasinda degerlendirilmesi.



### 3.3. Interlökin 6 (IL-6) -174 G/C değisimi:

#### 3.3.1. Interlökin 6 -174 G/C değisiminin tanımlanması için PZR:

Interlökin-6 -174 promoter bölgeyi kapsayan polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 431bç. uzunlugunda oligonükleotit ürünler elde edilmiştir.



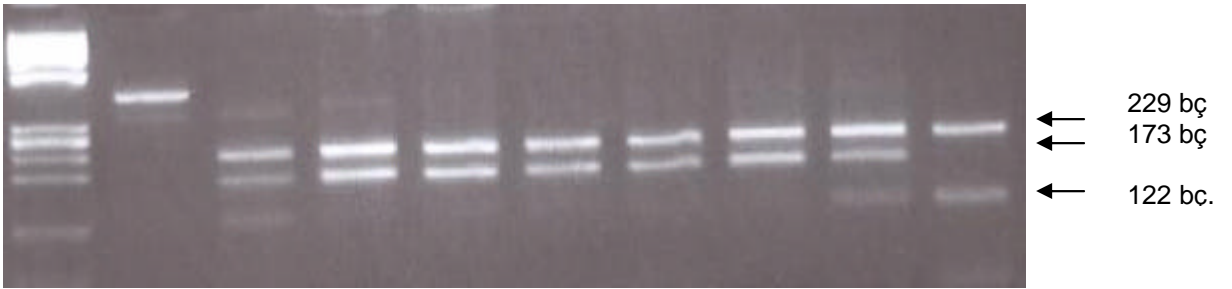
Sekil 3.5. IL-6 geni promoter bölgesinin 431bç.'lik PCR görüntüsü.

#### 3.3.2. Interlökin 6 -174 G/C değisiminin tanımlanması için Nla III Restriksiyon Endonükleazi İle Kesim:

Interlökin 6 -174 G/C değisiminin tanımlanması için Nla III restriksiyon endonükleazi ile kesim yapılır. Nla III restriksiyon enzimi 5'-...CATG/...-3' dizisini tanır ve keser. Kesim sonucunda;

C alleli için: 229/122/51/29 bç

G alleli için ise: 229/173/29 bç bantları izlenir.



Sekil 3.6 Interlökin 6 -174 G/C değisiminin Nla III restriksiyon endonükleazi kullanılarak gösterilmesi.

IL-6-174	Yüksek Sosyo-ekonomik Okul	Düşük Sosyo-ekonomik Okul	OR	CI	P
GG	27	44	1		
GC	-	17	20	1.2-361	0.01
CC	-	3	3.6	0.2-76	0.7
n	27	64			

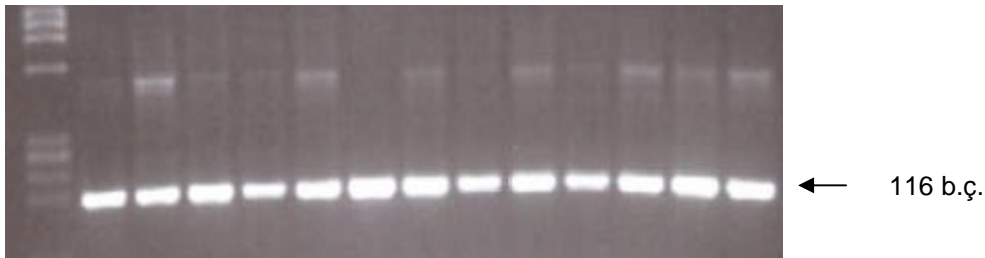
IL-6-174	Kontrol	Obez	OR	CI	P
GG	62	79	1		
GC	27	1	0.03	0.004-0.2	0.00001
CC	6	2	0.3	0.05-1.3	0.1
n	95	82			

Tablo 3.3. IL-6 -174 G/C gen değisiminin hasta-kontrol grupları arasında değerlendirilmesi.

### 3.4. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa -308 G/A değisimi:

#### 3.4.1. Tümör Nekrozis Faktör-Alfa -308 G/A değisiminin tanımlanması için PZR:

Tümör Nekrozis faktör-alfa -308 promotor bölgeyi kapsayan polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 116bç. uzunlugunda oligonükleotit ürünler elde edilmiştir.



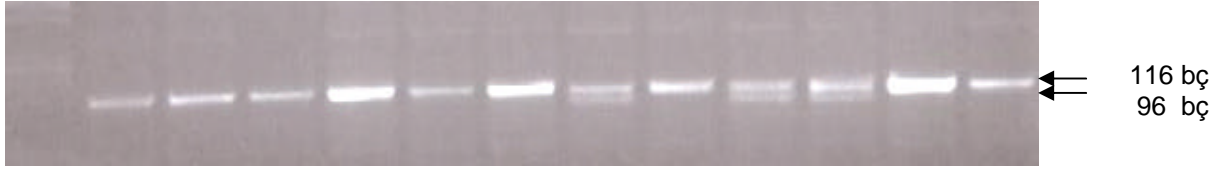
Şekil 3.7. TNF-a -308 G/A promotor bölgesinin 116 bç.'lik PCR görüntüsü.

### 3.4.2. TNF-alfa -308 G/A değisiminin tanimlanmasi için BspH I Restriksiyon Endonükleazi ile Kesim:

TNF-a -308 G/A değisiminin tanimlanmasi için BspH I restriksiyon endonükleazi ile kesim yapilir. BspH I restriksiyon enzimi 5'-T/CATGA-3' dizisini tanir ve keser. Kesim sonucunda;

AA alleli için: 96/20 bç

AG alleli için ise: 116/96/20 bç bantlari izlenir.



Sekil 3.8. TNF-a -308 G/A değisiminin BspH I restriksiyon endonükleazi kullanilarak gösterilmesi

TNF-a	Yüksek Sosyo-ekonomik Okul	Düşük Sosyo-ekonomik Okul	OR	CI	P
GG	26	57	1		
GA	1	7	3	0.3-27	0.5
AA	-	-	-	-	
n	27	64			

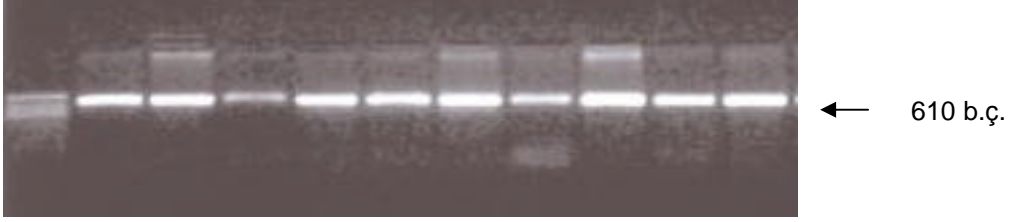
TNF-a	Kontrol	Obez	OR	CI	P
GG	79	123	1		
GA	16	12	0.5	0.2-1	0.066
AA	1	-	0.3	0.01-9.7	0.8
n	96	135			

Tablo 3.4. TNF-a -308 G/A gen değisiminin hasta-kontrol gruplari arasinda değerlendirilmesi.

### 3.5 Melanokortin 4 reseptör geni (MC4R) :

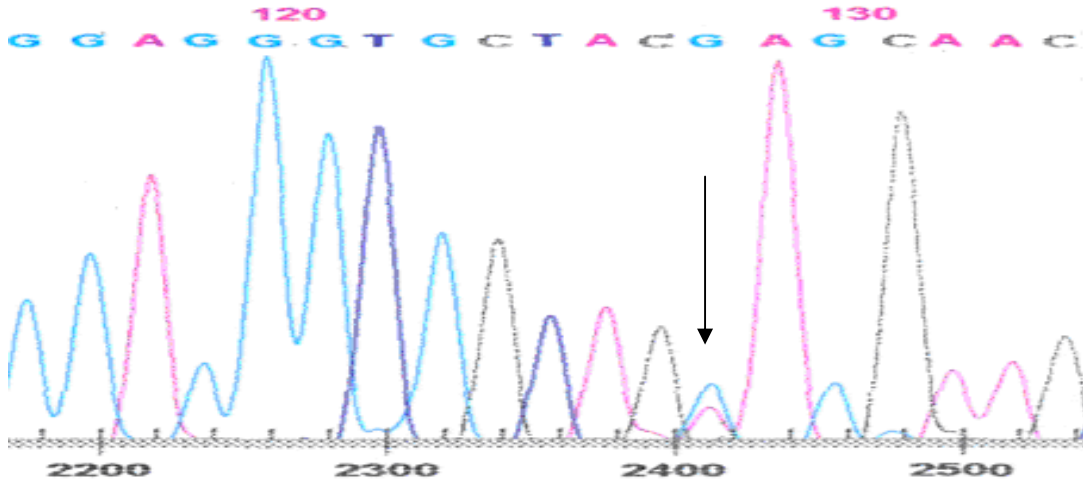
#### 3.5.1. Melanokortin 4 reseptör geninin DNA dizi analizi yöntemi ile taraması için ekson içi I. bölge PZR:

Melanokortin 4 reseptör geni tüm eksonu iki bölgeye ayrılarak PCR'u ile amplifiye edilmiştir. I. bölge polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 610bç. uzunluğunda oligonükleotit ürünler elde edilmiştir.

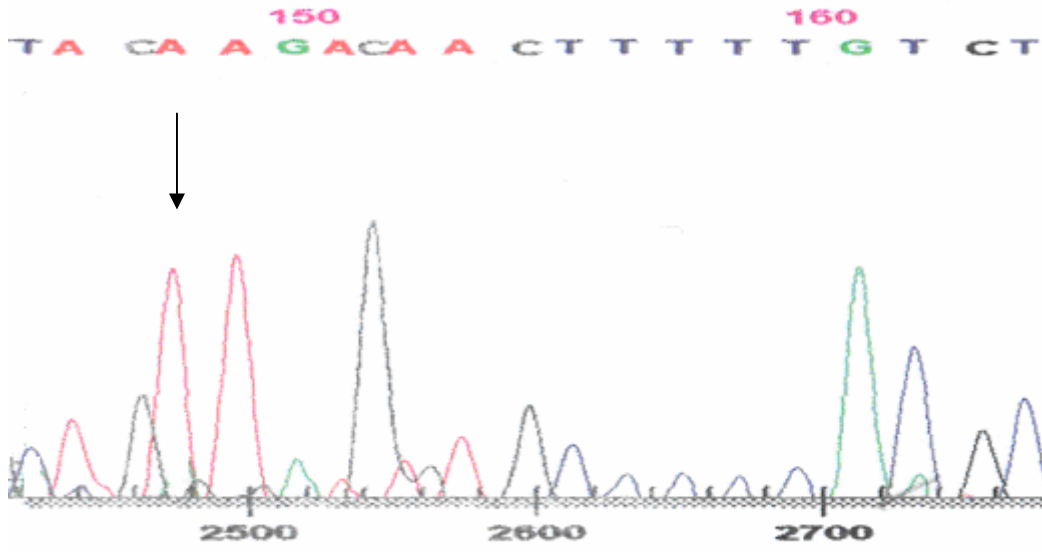


Sekil 3.9. MC4R geni ekson içi I. bölge 610 bç.'lik PCR görüntüsü.

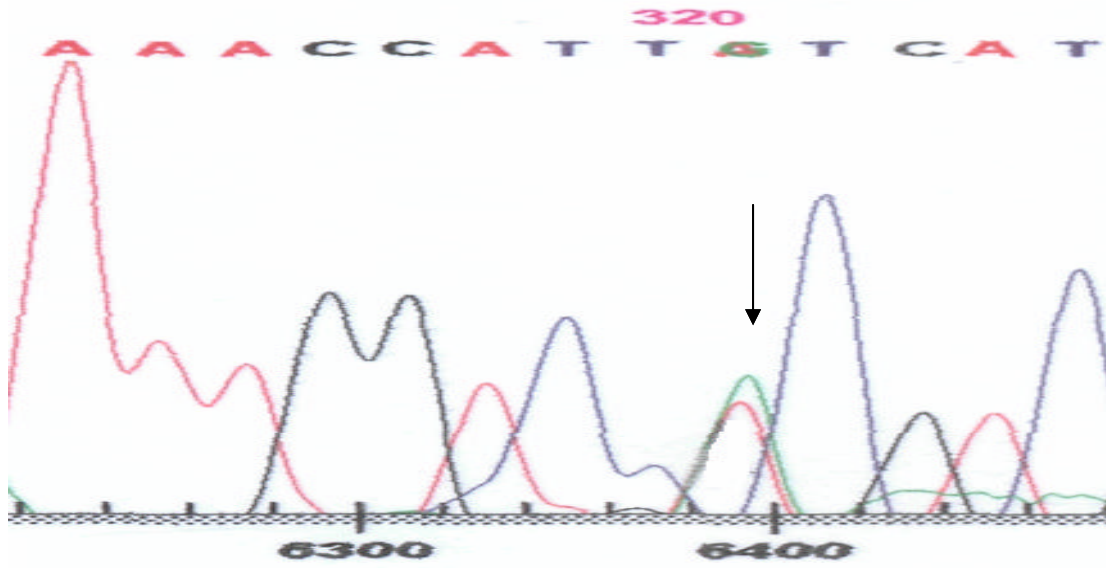
#### 3.5.2. Melanokortin 4 reseptör geni ekson içi I. bölge DNA dizi analizi:



Sekil 3.10. MC4R ekson içi 124 G/A değişimi, heterozigot.



Sekil 3.11. MC4R ekson içi 124 G/A değisimi, homozigot.



Sekil 3.12. MC4R ekson içi 307 G/A değisimi, heterozigot.

124 G/A → 42. aa. E (Glutamik asid) → K (Lizin)

307 G/A → 103. aa. V (Valin) → I (Izolösin)

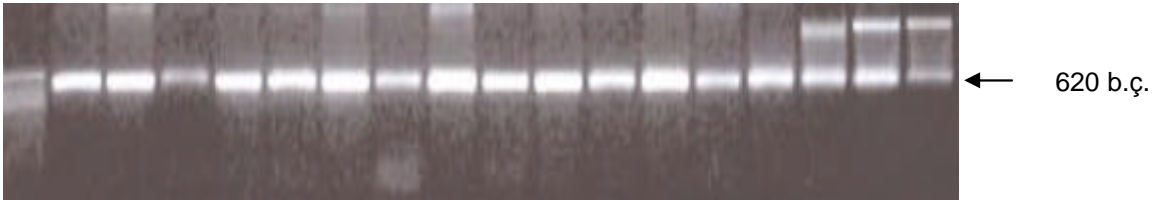
- 11 obez bireyde 124 GA değisimi heterozigot,
- 1 obez bireyde 124 GA değisimi homozigot,
- 6 obez bireyde 307 GA varyanti heterozigot olarak tespit edilmistir.

MVNSTHRGMHTSLHLWNRSSYRLHSNASESLGKGYSDGGCYEQLFVSPEVFTLVISLL  
ENILVIVAI AKNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETI VITLLNSTDTDAQSFTVN  
IDNVIDSVICSSLLASICSLLSIAVDRYFTIFYALQYHNIMTVKRVGIIISCIWA ACTVSG  
ILFIIYSDSSAVIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLMARLHIKRIAVLPGTGAIRQGANMK  
GAITLTILIGVFVVCWAPFFLHLIFYISCPQNPYCVCFM SHFNLYLILIMCNSIIDPLIYA  
LRSQELRKT FKEIICCYPLGGLCDLSSRY

Sekil 3.13. MC4R geni aa. Sekansi, E; 42. aa., Glutamik asid, V; 103. aa. Valin.

### 3.5.2.1. Melanokortin 4 reseptör geninin DNA dizi analizi yöntemi ile taraması için II. bölge PZR:

Melanokortin 4 reseptör geni tüm eksonu iki bölgeye ayrılarak PCR'u ile amplifiye edilmiştir. II. bölge polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 620bç. uzunluğunda oligonükleotit ürünler elde edilmiştir.



Sekil 3.14. MC4R geni ekson içi II. bölge 620 bç.'lik PCR görüntüsü.

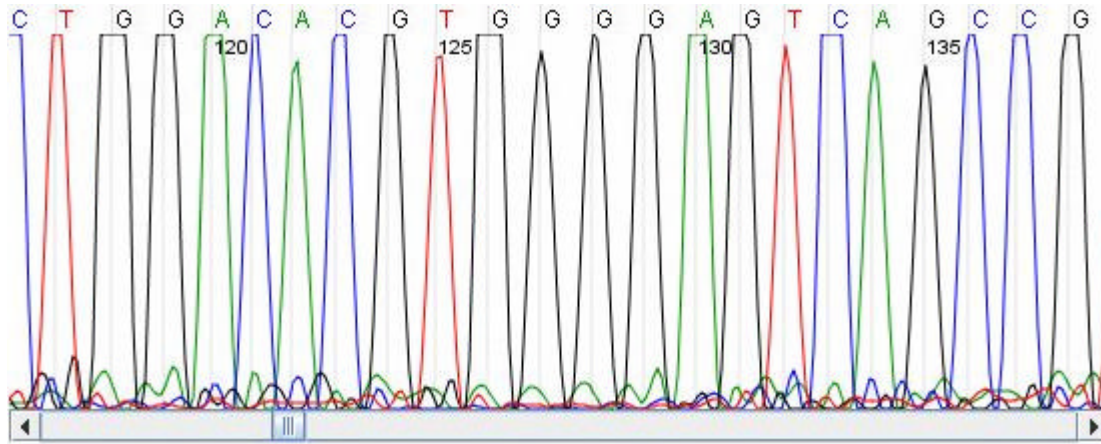
### 3.5.2. Melanokortin 4 reseptör geni ekson içi II. bölge DNA dizi analizi:

MC4R ekson içi taramasında II. bölgede çalışılan olgularda herhangi bir gen değişimi saptanamamıştır.

### 3.6. Plazminojen aktivatör inhibitör-1 -675 4G/5G polimorfizmi aktivasyon tayini:

#### 3.6.1. Site-directed mutagenesis ile 4G/5G polimorfizminin olusturulmasi:

Site-directed mutagenesis yöntemi ile plazmid içerisine sokarak aktivasyon tayini için olusturulacak hedef dizi delesyona ugratilmistir. Bu yöntem ile istenilen baz çifti kadar nükleotidin DNA dizisi içerisine sokulmasi veya diziden çikarilmasi mümkündür. Bu tez çalismasi PAI-1 4G/5G aktivasyon tayini için 4G/4G homozigot delesyonu tasiyan dizi olusturulmustur. Elde edilen PAI-1 -675 promoter diziyi içeren PAI-1 promoter bölgesi DNA dizi analizi yöntemi ile delesyon için kontrol edilmistir.



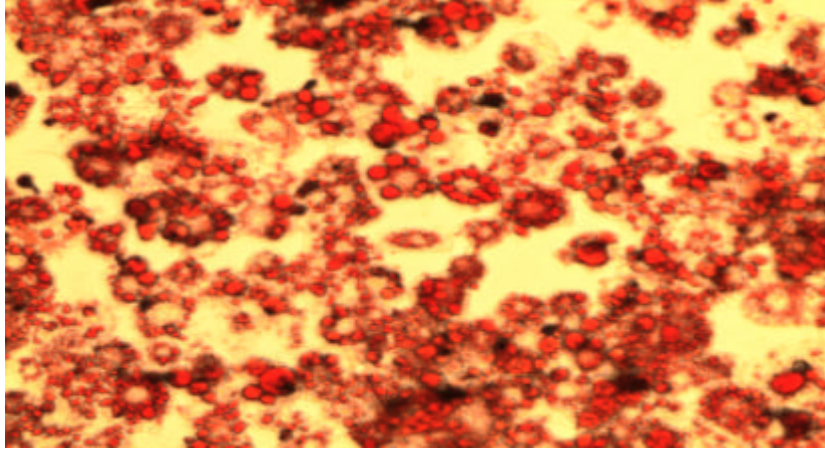
Sekil 3.15 Site-directed mutagenesis ile olusturulan PAI-1 -675 4G/4G homozigot örnek.

```
TtttacctGGtAACCCCTGGTCCCGTTCAGCCACCACCACCCACCCAGCACACCTCCAACCTCAGCCAGACAAGGTTG
TTGACACAAGAGAGCCCTCAGGGGCACAGAGAGAGTCTGGACACGTGGGGAGTCAGCCGTATATCATCGGAGGCGGCCG
GGCACATGGCAGGGATGAGGGAAAGACCAAGAGTCTCTGTGGGCCCAAGTCCTAGACAGATAAGACCTAGACAATCA
CGTGGCTGGCTGCATGCCCTGTGGCTGTGGGCTGGGCCCAGGAGGAGGGAGGGGCGCTCTTTCCTGGAGGTGGTCCAG
AGCACCGGGTGGACAGCCCTGGGGGAAAATTCCACGTTTTGATGGAGGTTATCTTTGATAACTCCACAGTGACCTGGT
TCGCCAAAGGAAAAGCAGGCAACGTGAGCTGTTTTTTTTTCTCCAAGCTGAACACTAGGGGTCTAGGCTTTTTGGGT
CACcCGGNATGGCAGANAGTCAACCTGGCAGGNCATCCGGGAGAN
```

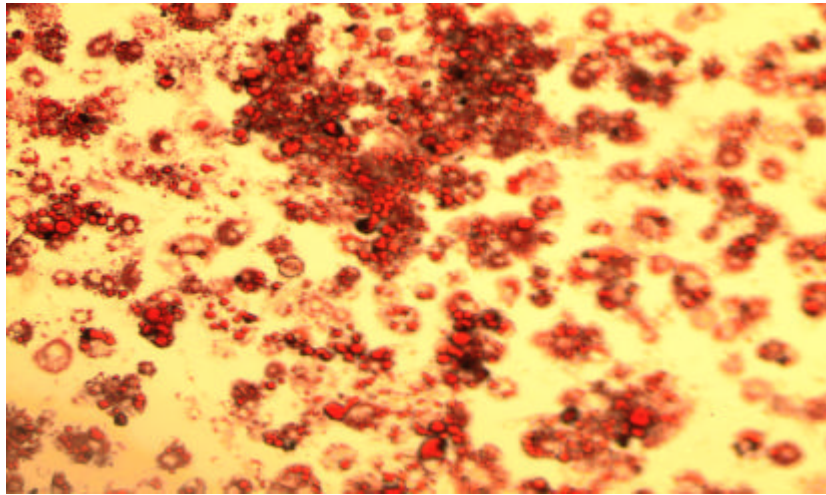
Sekil 3.16. Site-directed mutagenesis ile olusturulan PAI-1 -675 4G/4G homozigot örnek dizi.

### 3.6.2. Adipogeneziste site-directed mutagenesis ile olusturulan 4G/4G örneklerinin degerlendirilmesi :

Elde edilen 4G/4G PAI-1 -675 promoter polimorfizmini tasiyan DNA dizisi plazmidler içerisinde klonlanarak adipogenezis süreci baslatilmistir. Bu süreçte PAI-1 -675 4G/4G promoter dizi içeren ve içermeyen örnekler karsilastirilmistir.



Sekil 3.17. PAI-1 -675 4G/4G promoter dizi ile trasnfekte edilmiş preadipositlerden farklılaşmış adipoz doku, 10. gün.

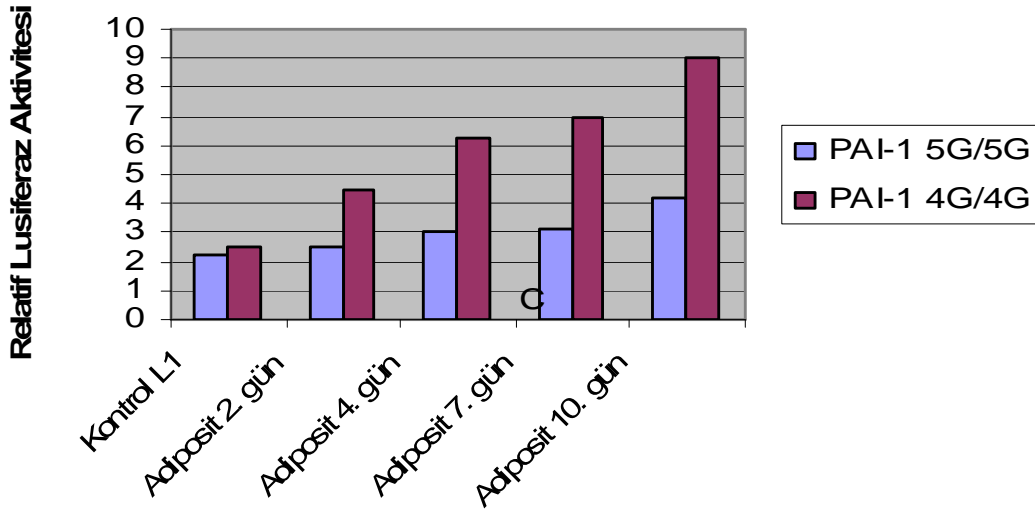


Sekil 3.18. Trasnfekte edilmemiş preadipositlerden farklılaşmış adipoz doku, 10. gün.



### 3.6.3. Klonların Duol-glo Lusiferaz analiz yöntemi ile değerlendirilmesi :

Relatif Lusiferaz aktivite tayin yöntemi ile preadipoz hücre serisinden adipoz hücrelerin farklılaşma periyodunda PAI-1 4G/4G ve 5G/5G promoter aktivitesi karşılaştırılmıştır. Alınan veriler farklılaşma sürecinin ileriki dönemlerinde artacak şekilde 4G/4G ve 5G/5G genotipinin genin aktivasyonunu etkilediğini göstermiştir. Farklılaşma protokolünde 10. günde 4G/4G alleli yaklaşık 2.5 kat kadar aktivasyonu artırmaktadır.

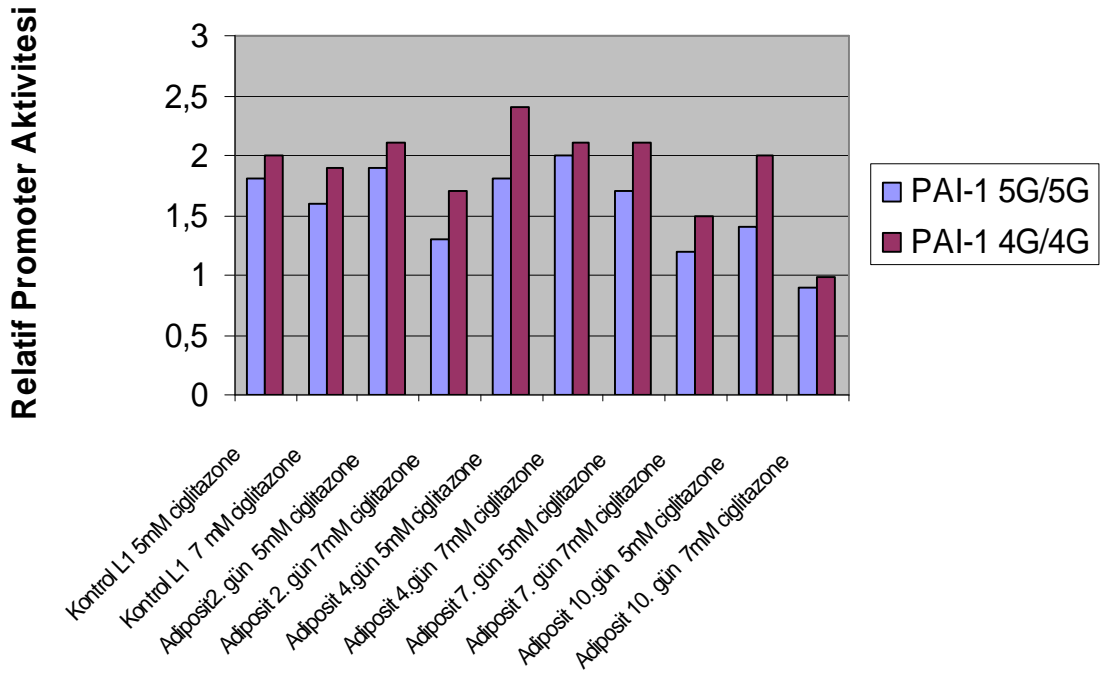


Şekil 3.19. Relatif PAI-1 promoter 4G/5G genotip aktivasyonunun adipojenik siklusta günlere göre karşılaştırılması

### 3.6.4. PAI-1 ekspresyonuna anti-diabetik ilaçların etkileri:

#### 3.6.4.1. Duol-glo Lusiferaz analiz yöntemi ile Ciglitazone ilaç denemesi :

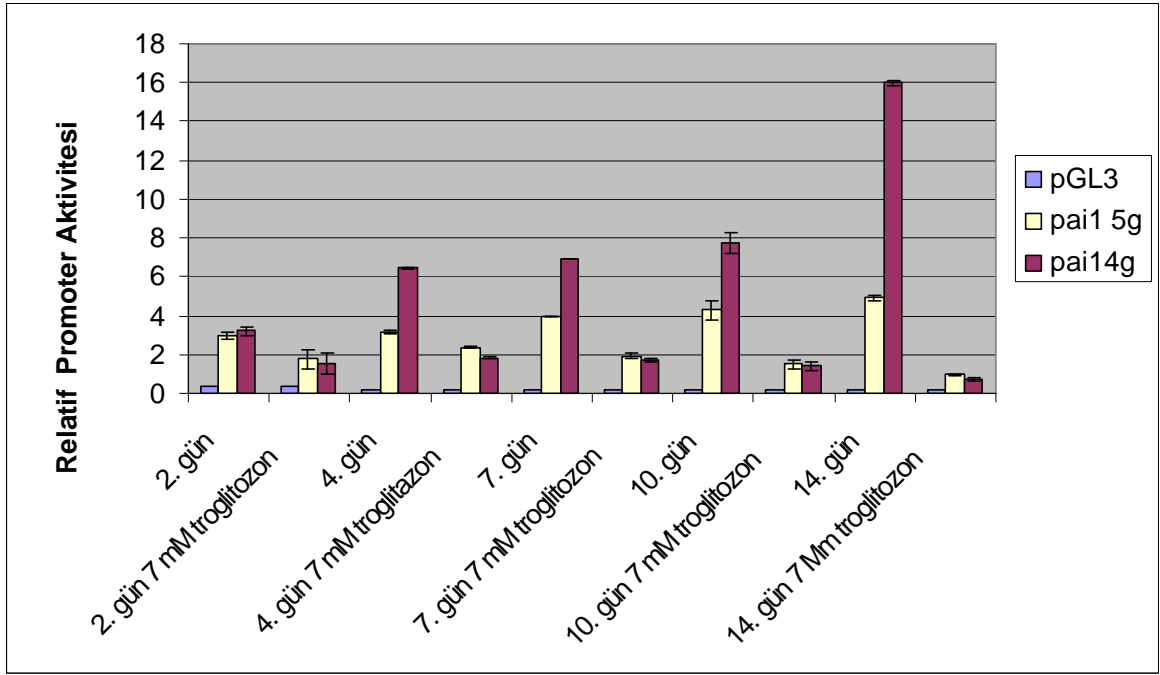
5mM ve 7 mM'lik hazırlanan ciglitazone adli antidiabetik olarak kullanılan ilaç hücre kültürü ortamına verilerek PAI-1 gen aktivasyonu üzerine etkisi 4G/4G ve 5G/5G klonları ile transfekte edilmiş hücre serileri üzerinde denenmiştir. 7mM ciglitazonun daha etkili olduğu ve farklılaşma periyodunun ileri aşamasında etkinin arttığı tespit edilmiştir. Farklılaşmanın 2. gününde 7mM ciglitazone etkisi 5mM ciglitazona oranla %25 oranında aktivite kaybı görülürken 10. günde aktivite kaybı %50' çıkmıştır.



Sekil 3.20 Adipojenik hücrelerin günlere göre PAI-1 gen aktivitelerinin ciglitazone ile etkilesimi.

### 3.6.4.2. Duol-glo Lusiferaz analiz yöntemi ile Troglitazone ilaç denemesi :

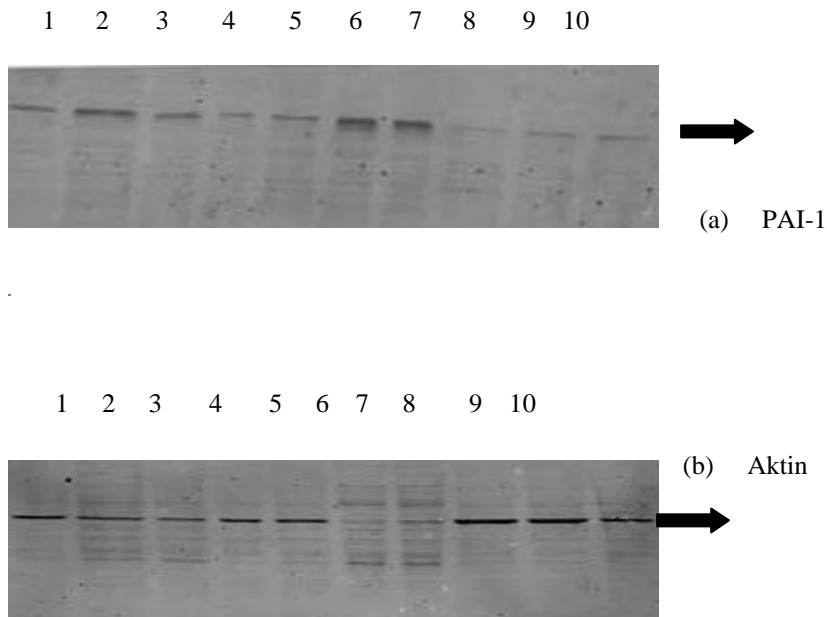
7 mM'lik hazırlanan troglitazone adli antidiabetik olarak kullanılan ilaç hücre kültürü ortamına verilerek PAI-1 gen aktivasyonu üzerine etkisi 4G/4G ve 5G/5G klonları ile transfecte edilmiş hücre serileri üzerinde denenmiştir. 7mM troglitazone farklılaşma periyodunun ileri aşamasında etkisi artacak şekilde ve 4G/4G ile transfecte hücre serisinde 5G/5G ile transfecte olmuş hücrelerine göre daha aktif bir şekilde gen aktivitesini düşürmüştür. Farklılaşmanın 2. gününde 7mM troglitazone %30 oranında 5G/5G ile transfecte hücre serilerinde PAI-1 gen aktivitesini düşürmüştür. 4G/4G ile transfecte hücre serisinde ise %50 PAI-1 gen aktivite kaybı tespit edilmiştir. 14. günde aktivite kaybı farkı oldukça farklıdır. 5G/5G ile transfecte edilmiş hücrelerden alınan 14. gün verilerine göre; aktivite 1:5 oranında düşerken, 4G/4G ile transfecte edilen hücrelerde 1:kadar çıkar aktivite düşüşü tespit edilmiştir.

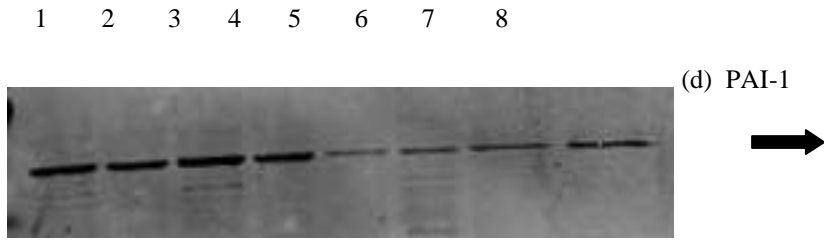
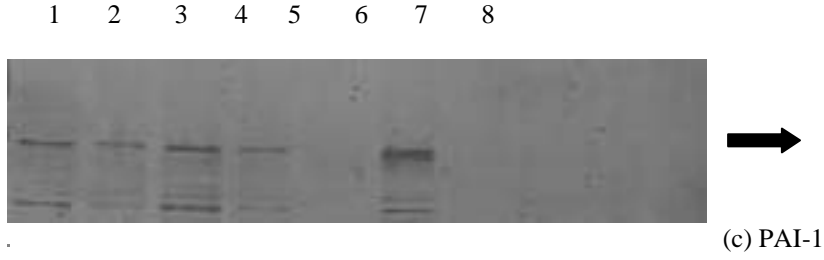


Sekil 3.21. Adipojenik hücrelerin günlere göre PAI-1 gen aktivitelerinin troglitazone ile etkilesimi.

### 3.6.5. Western-Blot Yöntemi ile PAI-1 ekspresyonunun gösterilmesi:

Yapılan ekspresyon ve aktivite deney sonuçları ve ilaç denemeleri western-blot yöntemi ile teyit edilmiştir.

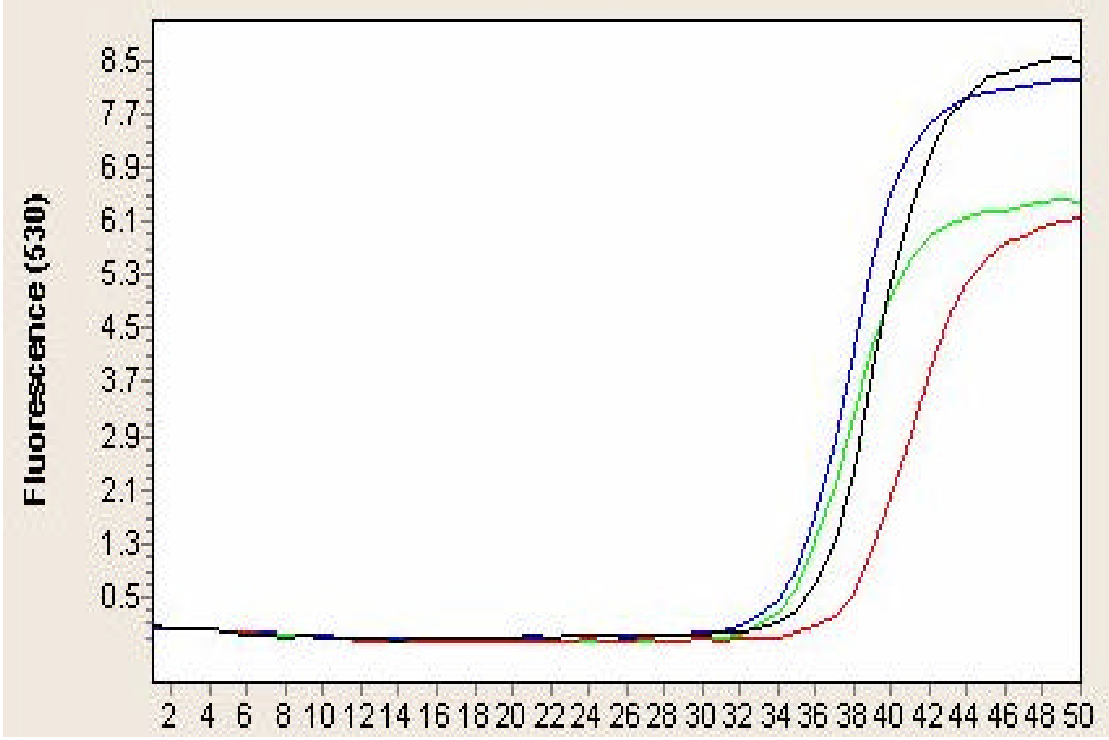




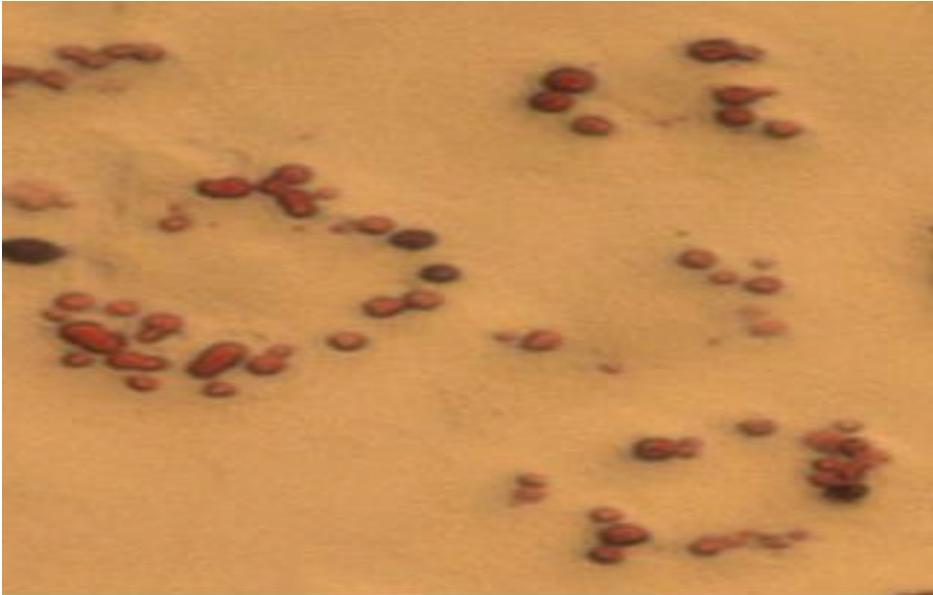
**Şekil 3.22. (A).** 1. adiposit hücre serisi ilaçsız, 2. PAI-1 4G4G ile transfekte hücre serisi 4.gün, 3. PAI-1 5G5G ile transfekte hücre serisi, 4. PAI-1 5G5G ile transfekte hücre serisi 5mM ciglitazone, 7.gün 5. PAI-1 4G4G ile transfekte hücre serisi 5mM ciglitazone, 7.gün 6. PAI-1 4G4G ile transfekte hücre serisi ilaçsız 7.gün 7. PAI-1 5G5G ile transfekte hücre serisi ilaçsız 7.gün 8. PAI-1 5G5G ile transfekte hücre serisi 7mM ciglitazone, 7.gün 9. PAI-1 4G4G ile transfekte hücre serisi 7mM ciglitazone, 7.gün 10. pGL3 bos plazmid (B).1-10 figür A'nin aktin komfirmasyonu(C).1. pGL3 bos plazmid, 2. 3T3L1 farklılaşmamış hücre serisi, 5mM ciglitazone 3. 3T3L1 farklılaşmamış hücre serisi, 5mM troglitazone 4. 3T3L1 farklılaşmamış hücre serisi, 7mM ciglitazone 5. 3T3L1 farklılaşmamış hücre serisi, 7mM troglitazone 6.adiposit hücre serisi 10. gün 7. HUVEC hücre serisi 7mM ciglitazone 8. HUVEC hücre serisi 7mM troglitazone (D). 1-10 Figür C'nin aktin komfirmasyonu

### 3.6.7. siRNA Gen Susturma Yöntemi ile PAI-1 gen ekspresyonunun azaltılması :

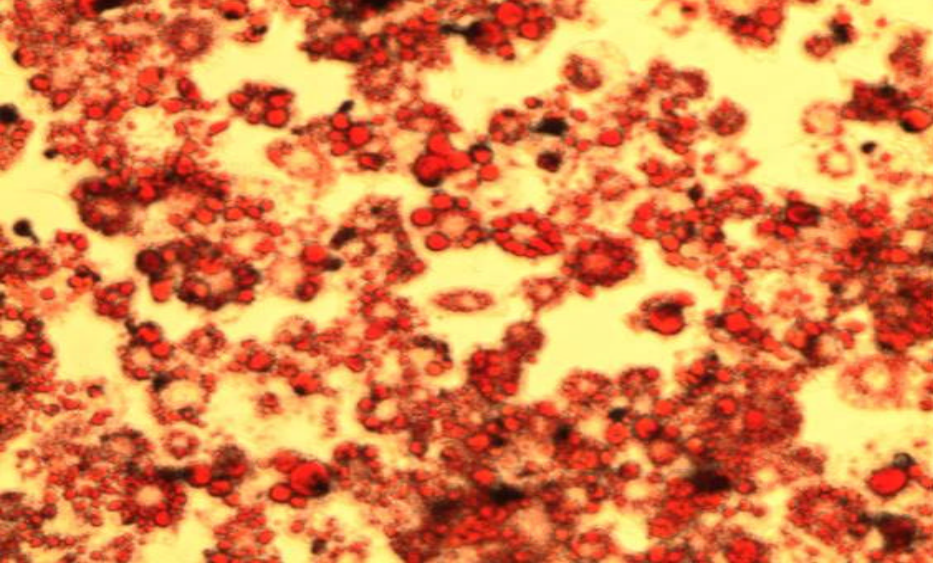
PAI-1- adipojenik farklılaşma etkilesiminin araştırılması için gen ekspresyonunun azaltılması siRNA susturma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. PAI-1 gen aktivitesinin 4G/4G genotipinde 5G/5G genotipine göre farklılaşma derecesi ile değişen oranlarda artan şekilde fazla olduğu görüldükten sonra azalmış PAI-1 gen ekspresyonunun durumunda adipojenik farklılaşmanın derecesi takip edilerek yapılan PAI-1 gen aktivite-adipoz doku ilişkisini ortaya koyan deneyler konfirme edilmiştir. siRNA yöntemi ile transfekte edilen hücreler transfekte edilmeyen hücre serilerine göre %35 oranla PAI-1 gen ekspresyonunda azalma sağlanmıştır.



Sekil 3.23. PAI-1 gen ekspresyonunun siRNA ile azaltılması, trasfeksiyondan sonra 24. saat.



Sekil 3.24. Azaltılmış PAI-1 ekspresyonlu hücre serisinde adipogenezis.



**Sekil 3.25. PAI-1 ekspresyonun tam oldugu hücre serisinde adipogenezis.**

#### 4.TARTISMA:

Obezite bugün tüm dünyada frekansinin artması ve morbitide ve mortalite riski ile ciddi bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle diabetes mellitus, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon gelişimi ve bazı kanserlerin insidensinde artışa yol açtığı kabul edilmektedir. Bunun dışında kalp ve damar sistemi, solunum sistemi, hormonal sistem, sindirim sistemi gibi sistemleri etkileyen ve birçok önemli rahatsızlığa zemin hazırlayan bir hastalıktır. İnsan yaşamını kısaltan ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen bir hastalık olarak tanımlanabilir ve mutlak tedavi edilmelidir. Multifaktöriyal bir hastalık olmasından dolayı tedavi yöntemleri değişkenlik göstermekle birlikte, hastalık kaynağının %60-84'ünü oluşturan genetik nedenlere çözüm getirmek karmaşık ve birbiri ile bağlantılı yolların çözülmesi ile mümkün olmaktadır.

Obezite ile ilişkili literatürde yer alan birçok aday gen bulunmaktadır. En önemlilerinden biri tek gen değişimleri ile doğrudan obezite ile ilişkisi aydınlatılmış MC4R gen değişimleridir. MC4R'ü gıda alımında ve enerji harcanmasında rolü olmasının yanı sıra tek gen mutasyonuna bağlı obezitede endokrin defektin ortaya çıkmadığı tek gen MC4R genidir. Vücut kütle indeksinin yüksek olması durumunda yani obezitede kalitimin rolü büyük olsada sık görülen ve tek gen değişimi ile direkt olarak defektin ortaya çıkmasına neden tek gen MC4R genidir. Türkiyeden rapor edilen yeni tanımlanmış MC4R gen değişimlerinin yer aldığı çalışmalarda obez hasta sayısının yüksek olmamasına rağmen gen değişimi tanımlanmış olması, Türkiye için obezitede tanınması gereken aday genlerden biri olduğunu göstermektedir (Ozata 2003).

Bu nedenlerden dolayı pediatrik obezitede gen değişimlerini araştırdığımız bu çalışmamızda öncelikle MC4R geni DNA dizi analizi yöntemi ile tüm ekson DNA dizi analizi yöntemi ile taranmıştır. MC4R mutasyon sıklığı erişkin obez grubu için % 0.5-1 ve çocukluk çağı obezitesinde ise % 6 olarak bildirilmektedir. Bulgularımız, çalışmaya alınan pediatrik endokrinoloji kliniğine başvuran 175 obez olgu ve yapılan okul çalışması ile obez tanısı konulan 96 obez çocukta toplam 18 MC4R gen değişimi taşıyan birey tespit edilmesini göstermektedir. Bu gen değişimlerinden 12'si daha önce literatürde yer almayan 1'i homozigot olmak üzere E42K gen değişimidir, 6 obez bireyde ise heterozigot olarak daha önce farklı gruplar tarafından rapor edilen (Rutanen, Pihlajamaki et al. 2004)V103I

tanımlanmıştır. Dolayısıyla literatürle uyumlu şekilde bu doktora tez çalışması kapsamına alınan pediatrik yaş grubu obezitesinde MC4R gen değişimlerinin sıklığı %6.2 olarak bulunmuştur. Bu konuda, çalışmaların artırılması gerekmektedir.

Çalışmaya aldığımız bir diğer gen değişimi, tümör nekrozis faktör alfa multifaktoriyal bir proinflamator sitokindir. Genel olarak antitümör etkisi ile bilinen TNF-a, kardiovasküler hastalıklardada koagülasyondaki etkilerinden dolayı önemli olmasının yanı sıra lipid metabolizması üzerine, insülin rezistansı ve endotel fonksiyonuna etkili olmasıyla obezitede dikkat çekmektedir(Picchi, Gao et al. 2006). Obezite çalışmalarında adipoz dokudan TNF-a ekspresyonunun artmış olduğu rapor edilmektedir(Old 1985). Dolayısıyla TNF-a obezitede aday gen halini almıştır. TNF-a yakınındaki polimorfizimler ve -308 GA değişimi farklı gruplar tarafından çalışılmış ve insülin, glukoz ve lipid metabolizmaları ile dolasımdaki hormonal dengeyi etkileyerek obezitede önemli olduğu rapor edilmiştir(Thirunavukkarasu, Watkins et al. 2006). Bizim pediatrik obezite çalışma grubumuzda TNF-a -308 G/A promoter polimorfizmi taranmış ve kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (OR: 0.5). Bu veriler Türk pediatrik obezitesinde TNF ekspresyonu artıran farklı gen değişimlerinin olabileceğini düşündürmüştür. Literatürde yer alan TNF-a yakınındaki polimorfizimler aday gen değişimleri olarak ileriki çalışmalarda taranabilir.

Yağ Asiti Bağlanma Proteini 4 (FABP-4, aP2), literatürde adipojenite için koruyuculuğu rapor edilmiş obezite ile ilişkili bir diğer genidir. aP2 proteini insan adipoz doku total sitosolik proteinlerinin yaklaşık %1'ini oluşturur Sitoplazmik lipid bağlanma protein ailesinin bir üyesidir. Adipositlerden ve makrofajlardan eksprese edilir(Makowski, Brittingham et al. 2005). Yapılan hayvan deneylerinde aP2 geni defektlerinin obezite, obezite ile uyarılmış insülin rezistansı ve tip II diabetes için dirençlilik oluşturduğu bildirilmektedir. aP2 defektli farelerde trigliseritler anlamlı derecede düşer ve atherosklerozis için koruyucudur. aP2 -/- çalışma grubu TNF alfa açısından değerlendirildiğinde ise yağ dokudan TNF-a eksprese etmedikleri tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak aP2 geninin obezite-insülin rezistansı yolunda temel rol oynayan genlerden biri olduğu düşünülmüştür. T-87C promoter değişimi aP2'nin C/EBPa'nin tanıma bölgesine bağlanmasını azaltır ve anlamlı derecede aP2 promotorunun transkripsiyonel aktivasyonunu bozar(Makowski and Hotamisligil 2005). Dolayısıyla T-



87C promoter değisimi aP2geni ekspresyonu negatif baskıladığı bilinmektedir ve bizim pediatrik obez çalışma grubumuzda taranmıştır. Verilerimiz literatür ile uyumlu olarak bu gen değisiminin koruyucu olduğunu gstermıştir. Türkiye için pediatrik obezitede aP2, T-87C değisiminin sıklığı belirlenmiş olup, heterozigotluğun OR: 0.07 ile homozigotluğun ise OR: 0.4 ile pediatrik obezitede koruyucu olduğu gsterilmıştir.

IL-1 ve TNF tarafından uyarılarak otokrin görev yapan ve imflamasyonda sitokinleri, akut faz reaktanlarını ve hücre proliferasyonunu regüle eden imflamasyon ile bağlantılı olarak obezitede, adipoz doku miktarının arttığı insülin rezistansı ve kardiovasküler risk artışı ile karakterize bir diğer gen IL-6'dır. Adipoz dokudan önemli miktarda IL-6 salınır. -174 G/C promoter polimorfizminin IL-6 ekspresyonunu üzerine etkisi farklı gruplar tarafından yapılan obez çalışmalarında toplumsal farklılık göstermektedir. Beyaz ırka ait çalışmalarda CC genotipinin glukoz seviyesini dsrdğ Amerika grubunda GG genotipinin diabete riski artırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Buna karşın GG genotipinin tip II diabete karşı koruyucu olduğu ve CC genotipinde IL-6 seviyesinin arttığı, dolayısıyla obezitede ve diabette anlamlı olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır. IL-6 ve insülin rezistansı, diabet ilişkisi etnik kökene özgü olabilecek şekilde etnik gruplara göre elisikli sonuçlar vermektedir(Mohlig, Boeing et al. 2004). Bu alışma kapsamına alınan IL-6 -174 G/C değisimi Türk pediatrik obez grubunda değerlendirilmiştir. Bizim verilerimize göre toplumumuz pediatrik yaş grubu obezitesinde GC genotipi OR: 0.003 ile CC genotipi ise OR:0.3 ile koruyucu grlmektedir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz son gen Plazminojen Aktivatör Inhibitör -1 geni, Serin Proteaz Inhibitör ailesi üyesidir, doku tipi ve ürokinaz tipi plazminojen aktivatörleri (t-PA ve u-PA)'nin majör inhibitörüdür. PAI-1 sadece fibrinolizisi inhibe etmekle kalmaz aynı zamanda sellüler matris ile kompleks interaksiyonlar yaparak proteoliziside inhibe etme zellindedir(Slivka and Loskutoff 1991; Fogo 2003). Yüksek PAI-I düzeyinin angina pectoris, derin ven trombozu, diyabet, insülin rezistansı (IRS), miyokard enfarktüsü gibi esitli rahatsızlıklarla ilişkili ve 45 yaş altı erken miyokard enfarktüsünde bağimsiz reinfarksiyon ağanı olduğu gösterilmiş ise de (Hamsten, Wiman et al. 1985) daha sonra yapılan iki çalışmada bu yıllarda plazma PAI-1 düzeylerini yükselten bir değisim olan 4G/5G polimorfizmiyle bir ilişkisi bulunamamıştır (Burzotta, Di Castelnuovo et al. 1997; Doggen, Bertina et al. 1999).

Son alışmalar insülin rezistansinin inflamasyona yol açtığını, inflamasyonun da insülin rezistansini indüklediğini göstermektedir. İnflamasyon kemokinleri ise baslıca; monosit kemoatrakt protein-1 (MCP-1), sitokinler ve en önemlisi metaloproteaz inhibitörleri olan plazminojen aktivatör-1 ve mitojen aktivatör protein kinazlardır. İnterlökin-1, Tümör nekrozis faktör-alfa, adiponektin ve rezistin ve PAI-1 adipoz dokudan yüksek miktarda eksprese edilirler ve TNF-a Plazminojen aktivatör inhibitör-1 seviyesini artırmaktadır. Dolayısıyla imflamasyon-obezite etkilesiminde PAI-1 seviyesi en az diğer sitokinler kadar önem teskil ettiği görölmektedir.

Plazma PAI-1 aktivitesi insülin rezistansi ve visceral yağ miktarı ile ilişkilendirilmiş ancak plazma PAI-1 seviyesinin yükselmesi obezite ile hangi yoldan etki etmektedir, 4G/4G ve 5G/5G genotiplerinin aktivite farklılığı ve adipoz doku farklılaşması üzerine fonksiyonu elisikli çalışmalar ile aydınlatılamamıştır. Bu doktora tez çalışması öncelikle PAI-1 4G/4G ve 5G/5G genotip farklılığını pediatrik grupta gösteren ilk çalışma niteliğindedir (Berberoğlu, Evliyaoglu et al. 2006). 4G/4G genotipinin sıklığının fazla olması ve istatistiksel olarak anlamlı derecede pediatrik grub obezitesinde risk kaynağı olması PAI-1 4G/4G ve 5G/5G genotiplerinin farklılaşmadaki rolünün değerlendirilmesi gereğini ortaya çıkarmıştır (OR:2.8). Ancak obezite için risk kaynağı olduğunu tespit ettiğimiz PA-1 4G/5G polimorfizminin aktivite farklılığının aydınlatılması özellikle fonksiyonel tedavi yöntemleri açısından büyük önem tasımaktadır. Bu amaçla yapılan klonlama ve aktivite tayin yöntemleri 4G/4G genotipinin promoter aktivitesini 2.5-3.5 kat arasında farklılaşmanın 10. -14. günleri arasında giderek artan katlar halinde artırmaktadır. Aktivite farklılığının farklılaşma üzerine etkisi yapılan hücre kültürü serilerinde teyit edilerek yağ damlacıklarının 4G/4G promoter dizisine sahip klonlar ile enfekte edilmeleri sonucunda gösterilmiştir (EK2). Tüm bu deney sonuçlarının teyidi için siRNA ile PAI-1 genin susturulması deneyleri gerçekleştirilmiştir. PAI-1 gen ekspresyonunun baskılanması durumunda western blot ve real time PCR teknikleri ile PAI-1 gen ekspresyonunun düşürüldüğü gösterilmiş ve bu hücre serilerinde adipojenik farklılaşma takibinde yağ damlacıklarının daha geç ve az sayıda oluştuğu gösterilmiştir.

Dolayısıyla bu çalışma sonucunda çalışmaya alınan Türk pediatrik obez grupta TNF $\alpha$ -308G/A değisiminin istatistiksel anlamlı bir farklılık yaratmadığı, aP2 T-87C değisimiyle, IL-6 -174 G/C değisiminin koruyucu yönde etkisi olduğu ve MC4R gen

degisimlerinin literatürde yer alan diger toplumsal siklikla uygunluk gösterecek sekilde %6.2 oldugu ve PAI-1 -675 4G/5G polimorfizminin homozigotlugunun toplumumuzda 2.8 kat risk getirerek aktivite farkliliklari yarattigi gösterilmistir. PAI-1 gen aktivasyonu üzerinde yapılan ilaç denemeleri ile günümüzde antidiabetik olarak kullanılan Thiadolizone ailesi üyesi ilaçların PAI-1 seviyelerini düşürmelerinin bu ilaç grublarının PPAR agonisti olması nedeniyle PAI-1 -adiposit farklılaşması etkilesiminin bu yoldan üzerinden olduğu ve PAI-1'in PPAR? üzerine etkili olduğu düşünülmektedir. Daha ileriki çalışmalarda PAI-1 ve adipoz farklılaşmasında temel rol oynayan PPAR? ilişkisinin üzerinde çalışılmasının uygun olacağı düşünülmektedir..

## KAYNAKLAR

- G. B. (1998). contemporary diagnosis and management of obesity. newton, handbooks in healty care co, 45-77.
- Aggarwal, B. B. and W. J. Kohr (1985). "Human tumor necrosis factor." Methods Enzymol **116**: 448-56.
- Akar, N. (1999). Moleküler Patolojiye Giriş. ankara, ANTIP A.S.yayinlari,137-206.
- Banerjee, R. R., S. M. Rangwala, et al. (2004). "Regulation of fasted blood glucose by resistin." Science **303**(5661): 1195-8.
- Barsh, G. S., I. S. Farooqi, et al. (2000). "Genetics of body-weight regulation." Nature **404**(6778): 644-51.
- Baxa, C. A., R. S. Sha, et al. (1989). "Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA." Biochemistry **28**(22): 8683-90.
- Beauchamp, N. J., M. E. Daly, et al. (1994). "Rapid two-stage PCR for detecting factor V G1691A mutation." Lancet **344**(8923): 694-5.
- Berberoglu, M., O. Evliyaoglu, et al. (2006). "Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene polymorphism (-675 4G/5G) associated with obesity and vascular risk in children." J Pediatr Endocrinol Metab **19**(5): 741-8.
- Berthier, M. T., A. M. Paradis, et al. (2003). "The interleukin 6-174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men." J Hum Genet **48**(1): 14-9.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, et al. (2003). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex." Science **300**(5628): 2101-4.
- Bowcock, A. M., J. R. Kidd, et al. (1988). "The human "interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21." Genomics **3**(1): 8-16.
- Brenner, D. A., R. A. Rippe, et al. (1989). "Analysis of the collagen alpha 1(I) promoter." Nucleic Acids Res **17**(15): 6055-64.
- Brogren, H., L. Karlsson, et al. (2004). "Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1." Blood **104**(13): 3943-8.

- Brummelkamp, T. R., R. Bernards, et al. (2002). "Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference." Cancer Cell **2**(3): 243-7.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards, et al. (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." Science **296**(5567): 550-3.
- Burzotta, F., A. Di Castelnuovo, et al. (1997). "4G/5G polymorphism in the promoter region of the PAI-1 gene is not a risk factor for familial myocardial infarction in subjects over 45 years." Thromb Haemost **78**(4): 1294-5.
- C.Rader, W. (2006). "Transfection.",2-7.
- Camp, H. S., D. Ren, et al. (2002). "Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes." Trends Mol Med **8**(9): 442-7.
- Caterson, I. D. and T. P. Gill (2002). "Obesity: epidemiology and possible prevention." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **16**(4): 595-610.
- Chen, L., L. M. Shulman, et al. (1991). "IL-6 receptors and sensitivity to growth inhibition by IL-6 in clones of human breast carcinoma cells." J Biol Regul Homeost Agents **5**(4): 125-36.
- Clement, K. (2005). "[Genetics of human obesity]." Journ Annu Diabetol Hotel Dieu: 39-53.
- Cole, T. J., M. C. Bellizzi, et al. (2000). "Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey." Bmj **320**(7244): 1240-3.
- Colman, M. E. (1998). "Obesity in the Paleolithic era? The Venus of Willendorf." Endocr Pract **4**(1): 58-9.
- Combs, T. P., U. B. Pajvani, et al. (2004). "A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity." Endocrinology **145**(1): 367-83.
- Comuzzie, A. G. (2002). "The emerging pattern of the genetic contribution to human obesity." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **16**(4): 611-21.
- Cummings, D. E. and M. W. Schwartz (2003). "Genetics and pathophysiology of human obesity." Annu Rev Med **54**: 453-71.

- Dawson, S. J., B. Wiman, et al. (1993). "The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells." J Biol Chem **268**(15): 10739-45.
- de Boer, J. P., J. J. Abbink, et al. (1991). "PAI-1 synthesis in the human hepatoma cell line HepG2 is increased by cytokines--evidence that the liver contributes to acute phase behaviour of PAI-1." Thromb Haemost **65**(2): 181-5.
- Doggen, C. J., R. M. Bertina, et al. (1999). "The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction." Thromb Haemost **82**(1): 115-20.
- Eberhard, P. (1995). color atlas of genetics.
- Eriksson, M. and T. Saldeen (1995). "Effect of dextran on plasma tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) during surgery." Acta Anaesthesiol Scand **39**(2): 163-6.
- Eriksson, P., B. Kallin, et al. (1995). "Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 1851-5.
- Farooqi, I. S., J. M. Keogh, et al. (2003). "Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene." N Engl J Med **348**(12): 1085-95.
- Ferguson-Smith, A. C., Y. F. Chen, et al. (1988). "Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21." Genomics **2**(3): 203-8.
- Fernandez-Real, J. M., M. Broch, et al. (2000). "Interleukin-6 gene polymorphism and insulin sensitivity." Diabetes **49**(3): 517-20.
- Fernandez-Real, J. M., M. Broch, et al. (2000). "Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects." J Clin Endocrinol Metab **85**(3): 1334-9.
- Fogo, A. B. (2003). "Renal fibrosis: not just PAI-1 in the sky." J Clin Invest **112**(3): 326-8.
- Fu, Y., N. Luo, et al. (2002). "The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages." Atherosclerosis **165**(2): 259-69.
- Gantz, I., Y. Konda, et al. (1993). "Molecular cloning of a novel melanocortin receptor." J Biol Chem **268**(11): 8246-50.

- Gantz, I., H. Miwa, et al. (1993). "Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor." J Biol Chem **268**(20): 15174-9.
- genetik, w. a. U. P. m. p. v. (2003). Klonlama.
- Hamsten, A., B. Wiman, et al. (1985). "Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction." N Engl J Med **313**(25): 1557-63.
- Hauerland, N. H. and F. Spener (2004). "Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations." Prog Lipid Res **43**(4): 328-49.
- Hermann, R., H. J. Wildgrube, et al. (1998). "Gastric emptying in patients with insulin dependent diabetes mellitus and bioavailability of thioctic acid-enantiomers." Eur J Pharm Sci **6**(1): 27-37.
- Hirano, T., K. Yasukawa, et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." Nature **324**(6092): 73-6.
- Hotamisligil, G. S. (2000). "Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 4**: S23-7.
- Hotamisligil, G. S., R. S. Johnson, et al. (1996). "Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein." Science **274**(5291): 1377-9.
- Humphries, S. E., F. R. Green, et al. (1992). "Genetic factors determining thrombosis and fibrinolysis." Ann Epidemiol **2**(4): 371-85.
- Humphries, S. E., A. Lane, et al. (1992). "The study of gene-environment interactions that influence thrombosis and fibrinolysis. Genetic variation at the loci for factor VII and plasminogen activator inhibitor-1." Arch Pathol Lab Med **116**(12): 1322-9.
- Juhan-Vague, I., M. C. Alessi, et al. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk." J Thromb Haemost **1**(7): 1575-9.
- Karasalihoglu, S. (2005). "Çocukluk Çağı Obezitesi." Türkiye Klinikleri J Int Med Sci **2005, 1(37):66-71** **1(37)**: 66-71.
- Kobayashi, M. (1983). "a new potentiator of insulin action." FEBS Letter.
- Kruithof, E. K., C. Tran-Thang, et al. (1984). "Demonstration of a fast-acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma." Blood **64**(4): 907-13.

- Laurin, S. and N. R. Lundstrom (1987). "Venous thrombosis after cardiac catheterization in infants." Acta Radiol **28**(3): 241-6.
- Lean, M. E., T. S. Han, et al. (1995). "Waist circumference as a measure for indicating need for weight management." Bmj **311**(6998): 158-61.
- Maes, H. H., M. C. Neale, et al. (1997). "Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity." Behav Genet **27**(4): 325-51.
- Makowski, L., J. B. Boord, et al. (2001). "Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis." Nat Med **7**(6): 699-705.
- Makowski, L., K. C. Brittingham, et al. (2005). "The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities." J Biol Chem **280**(13): 12888-95.
- Makowski, L. and G. S. Hotamisligil (2005). "The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **16**(5): 543-8.
- manual, p. t. (2006). dual-glo lusiferase assay.
- Mayer, M., L. R. Lund, et al. (1988). "Plasminogen activator inhibitor type-1 protein, mRNA and gene transcription are increased by phorbol esters in human rhabdomyosarcoma cells." J Biol Chem **263**(30): 15688-93.
- Mergen, M., H. Mergen, et al. (2001). "A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity." J Clin Endocrinol Metab **86**(7): 3448.
- Mohlig, M., H. Boeing, et al. (2004). "Body mass index and C-174G interleukin-6 promoter polymorphism interact in predicting type 2 diabetes." J Clin Endocrinol Metab **89**(4): 1885-90.
- Norman, R. A., D. B. Thompson, et al. (1997). "Genomewide search for genes influencing percent body fat in Pima Indians: suggestive linkage at chromosome 11q21-q22. Pima Diabetes Gene Group." Am J Hum Genet **60**(1): 166-73.
- Ny, T., M. Sawdey, et al. (1986). "Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(18): 6776-80.
- Obeid, O. A. and P. W. Emery (1993). "Lipid metabolism in cachectic tumor-bearing rats at different stages of tumor growth." Nutr Cancer **19**(1): 87-98.



- Odabasi, E., M. Ozata, et al. (2000). "Plasma leptin concentrations in postmenopausal women with osteoporosis." Eur J Endocrinol **142**(2): 170-3.
- Old, L. J. (1985). "Tumor necrosis factor (TNF)." Science **230**(4726): 630-2.
- Oral, E. A., V. Simha, et al. (2002). "Leptin-replacement therapy for lipodystrophy." N Engl J Med **346**(8): 570-8.
- Ota, N., S. C. Hunt, et al. (1999). "Linkage of interleukin 6 locus to human osteopenia by sibling pair analysis." Hum Genet **105**(3): 253-7.
- Ozata, M. (2003). Obezite Tani ve Tedavisi. ankara, GATA basýmevi.
- Ozel D., Aktas. H., Akar N., (2006). "The effect of Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on PAI\*1 gene expression and adipocyte differentiation." The FEBS journal **273**(1): 55.
- Pannekoek, H., H. Veerman, et al. (1986). "Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family." Embo J **5**(10): 2539-44.
- Parsons, T. J., C. Power, et al. (1999). "Childhood predictors of adult obesity: a systematic review." Int J Obes Relat Metab Disord **23 Suppl 8**: S1-107.
- Pennica, D., G. E. Nedwin, et al. (1984). "Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." Nature **312**(5996): 724-9.
- Picchi, A., X. Gao, et al. (2006). "Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome." Circ Res **99**(1): 69-77.
- Prinsen, C. F., D. R. de Bruijn, et al. (1997). "Assignment of the human adipocyte fatty acid-binding protein gene (FABP4) to chromosome 8q21 using somatic cell hybrid and fluorescence in situ hybridization techniques." Genomics **40**(1): 207-9.
- Prinsen, C. F., D. O. Weghuis, et al. (1997). "Identification of a human heart FABP pseudogene located on chromosome 13." Gene **193**(2): 245-51.
- Proenza, A. M., C. M. Poissonnet, et al. (2000). "Association of sets of alleles of genes encoding beta3-adrenoreceptor, uncoupling protein 1 and lipoprotein lipase with increased risk of metabolic complications in obesity." Int J Obes Relat Metab Disord **24**(1): 93-100.
- Riccio, A., L. R. Lund, et al. (1988). "The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene." Nucleic Acids Res **16**(7): 2805-24.

- Rolfs, A., H. Kallisch, et al. (1994). "MnII polymorphism for the AGTR1 gene." Hum Mol Genet **3**(1): 213.
- Rolfs, A. and I. Weber (1994). "Fully-automated, nonradioactive solid-phase sequencing of genomic DNA obtained from PCR." Biotechniques **17**(4): 782-7.
- Rutanen, J., J. Pihlajamaki, et al. (2004). "The Val103Ile polymorphism of melanocortin-4 receptor regulates energy expenditure and weight gain." Obes Res **12**(7): 1060-6.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Saltiel, A. R. (2000). "Another hormone-sensitive triglyceride lipase in fat cells?" Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 535-7.
- Saltiel, A. R. (2000). "Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases." J Clin Invest **106**(2): 163-4.
- Saltiel, A. R. (2001). "You are what you secrete." Nat Med **7**(8): 887-8.
- Sambrook (1989). Maniatis.
- satman i, y. m. (2001). "dünyada ve türkiyede obezite epidemiyolojisi." aktüel dergisi **6**: 9-12.
- Schafer, K., K. Fujisawa, et al. (2001). "Disruption of the plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic ob/ob mice." Faseb J **15**(10): 1840-2.
- Sehgal, P. B., A. Zilberstein, et al. (1986). "Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(14): 5219-22.
- Slivka, S. R. and D. J. Loskutoff (1991). "Regulation of type I plasminogen activator inhibitor synthesis by protein kinase C and cAMP in bovine aortic endothelial cells." Biochim Biophys Acta **1094**(3): 317-22.
- Stewart, J. M. (2000). "The cytoplasmic fatty-acid-binding proteins: thirty years and counting." Cell Mol Life Sci **57**(10): 1345-59.
- Sutherland, G. R., E. Baker, et al. (1988). "Interleukin 4 is at 5q31 and interleukin 6 is at 7p15." Hum Genet **79**(4): 335-7.

- Süzek, H. (2005). "Mugla'da Yasayan 6-15 Yas Okul Çocuklarında Kilo Fazlalılığı ve Obezite Prevalansı." Turkish Journal of Biochemistry **4**(30): 290-295.
- Tao, Y. X. (2005). "Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity." Mol Cell Endocrinol **239**(1-2): 1-14.
- Thirunavukkarasu, C., S. C. Watkins, et al. (2006). "Mechanisms of endotoxin-induced NO, IL-6, and TNF-alpha production in activated rat hepatic stellate cells: role of p38 MAPK." Hepatology **44**(2): 389-98.
- Tosato, G. and S. E. Pike (1988). "Interferon-beta 2/interleukin 6 is a co-stimulant for human T lymphocytes." J Immunol **141**(5): 1556-62.
- Tuncman, G., E. Erbay, et al. (2006). "A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 6970-5.
- Uckaya, G., M. Ozata, et al. (2000). "Is leptin associated with diabetic retinopathy?" Diabetes Care **23**(3): 371-6.
- Unger, R. H. (2002). "Lipotoxic diseases." Annu Rev Med **53**: 319-36.
- Unger, R. H. and L. Orci (2002). "Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 202-12.
- Vaisse, C., K. Clement, et al. (1998). "A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity." Nat Genet **20**(2): 113-4.
- Wang, A. M., A. A. Creasey, et al. (1985). "Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor." Science **228**(4696): 149-54.
- WHO (2000). Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Technical Report. **894**.
- Yeo, G. S., I. S. Farooqi, et al. (1998). "A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity." Nat Genet **20**(2): 111-2.
- Zilberstein, A., R. Ruggieri, et al. (1986). "Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines." Embo J **5**(10): 2529-37.

## ÖZGEÇMİS

1977 Ankara doğumlu olan Duygu ÖZEL DEMİRALP İlköğretimini 1984-1989 yılları arasında Ankara Özel Ari Kolejinde, orta ve lise eğitimini Gazi Anadolu Lisesinde 1995 yılında tamamladı. Yüksek Öğretimine 1995 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladı. 1999 yılında mezun oldu. Aynı yıl A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalında yüksek lisans başladı. 2002 yılında bu bölümden bilim uzmanı ünvanını aldı. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünde doktora öğrenimine başladı. 2004-2006 yılları arasında A.B.D'de Harvard Tıp Fakültesi Translasyonel araştırma laboratuvarında araştırmacı olarak çalıştı. Halen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü merkez laboratuvarında uzman olarak görev yapmaktadır.

## Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene Polymorphism (-675 4G/5G) Associated with Obesity and Vascular Risk in Children

M. Berberoğlu<sup>1</sup>, O. Evliyaoğlu<sup>1</sup>, P. Adıyaman<sup>1</sup>, G. Öcal<sup>1</sup>, B. Ulukol<sup>2</sup>, F. Şimşek<sup>2</sup>, Z. Şıklar<sup>1</sup>,  
A. Törel<sup>1</sup>, D. Özel<sup>3</sup> and N. Akar<sup>3</sup>

*Departments of <sup>1</sup>Pediatric Endocrinology, <sup>2</sup>Social Pediatrics and <sup>3</sup>Pediatric Molecular Genetics, Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey*

### ABSTRACT

Atherothrombotic complications in insulin resistance are partly attributed to impaired fibrinolysis caused by increased PAI-1 plasma levels, and 4G/5G promotor polymorphism of the PAI-1 gene may modulate PAI-1 transcription.

**Objective:** To investigate PAI-1-675 4G/5G allele gene polymorphism and its relationship with obesity in children.

**Children and Method:** The study participants were 133 apparently healthy non-obese children, 24 probable exogenously obese without family history (Group I), 66 probable familial obese (Group II), and 44 obese children who were referred to the pediatric endocrinology department with any complication of obesity (Group III). Group I and Group II obese children were gathered from a school-based epidemiological study.

**Results:** Incidence of obesity was 19% in a school with high socio-economic status, whereas it was 4% in a school with low socio-economic status. Frequencies of 4G/4G gene polymorphisms were 24.81%, 37.50%, 64.80% and 61.11% in the control group, and groups I, II, and III, respectively. In groups II and III, 4G/4G gene polymorphism, and in non-obese control children 5G/5G gene polymorphism, was common. In obese children in the presence of family history for obesity and metabolic syndrome (odds ratio [OR]: 4.48, 95% confidence

interval [CI]: 1.26-15.82), carriage of the 4G allele either in heterozygous or homozygous state increased the risk of vascular disease (OR: 6.10, 95% CI 1.64-22.90). In patients with acanthosis nigricans, high HOMA-IR values, hypertriglyceridemia and elevated atherogenic index, 4G/4G genotype frequency was remarkably higher compared to patients with other features of metabolic syndrome.

**Conclusion:** The increasing prevalence of childhood obesity in high socio-economic status is associated with health risks. In obese children with family history of obesity and cardiovascular disease or type 2 diabetes mellitus and in obese children who had any feature of metabolic syndrome, frequency of 4G/4G genotype was more than the 4G/5G and 5G/5G genotypes in the PAI-1 gene. These patients can be at increased risk for developing vascular disease. Acanthosis nigricans, high HOMA-IR value, hypertriglyceridemia and high atherogenic index can also reflect the high risk of vascular disease in metabolic syndrome.

### KEY WORDS

PAI-1 gene polymorphism, childhood obesity, vascular disease

### INTRODUCTION

Obesity is a chronic condition with complex etiology, and it is a rapidly growing health problem in developed countries. Obesity is clearly not one disease but is multifactorial, involving genetic, metabolic and behavioral factors. Obese patients are at risk for the development of vascular disease<sup>1,2</sup>. Different studies have investigated the

Reprint address:  
Merih Berberoğlu, M.D.  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı  
06100 Cebeci Ankara, Turkey  
e-mail: merihbtr@yahoo.com

association between fibrinolytic parameters and the insulin resistance syndrome (IRS) in obese individuals<sup>3-5</sup>. Central obesity, hypertension, glucose intolerance, hyperinsulinemia, dyslipidemia with elevated triglyceride levels, low high density lipoprotein (HDL) cholesterol concentration, and an increased proportion of small dense lipoproteins are markers of insulin resistance. These patients with IRS have higher values of fibrinogen, factor VII, VIII, Von Willebrand factor and plasminogen activator inhibitor (PAI) compared to non-obese individuals<sup>3</sup>.

Recently it has been demonstrated that the adipocyte itself is able to produce PAI-1, possibly explaining the high levels found in obesity<sup>5</sup>. PAI-1 is the primary inhibitor of plasminogen activation that limits the fibrinolytic process. Atherothrombotic complications in IRS are partly attributed to impaired fibrinolysis caused by increased plasma PAI-1 levels. Reduction of adiposity in obese *ob/ob* mice by disruption of the PAI-1 gene suggested that the PAI-1 gene can control fat mass<sup>6</sup>. However, the mechanism of the action is not yet known.

A functional polymorphism in the promotor region of the PAI-1 gene (-675 4G/5G) affects the binding of nuclear proteins regulating the transcription of the gene<sup>7</sup>. The 4G/5G polymorphism is associated with features of the metabolic syndrome in some, but not all populations<sup>8</sup>. Both genetic and environmental factors regulate plasma PAI-1 levels. Elevated plasma PAI-1 levels are associated with the 4G allele of the 4G/5G insertion/deletion polymorphism site located in the promotor region 675 base-pairs (bp) upstream of the transcription start sequence of the PAI-1 gene<sup>9,10</sup>. The vascular risk of carrying the 4G allele in the PAI-1 gene was controversial in previous studies<sup>8-11</sup>.

We aimed to investigate the role of the 4G/5G polymorphism in determining susceptibility, outcome and complications of obesity and metabolic syndrome.

#### CHILDREN AND METHODS

The study participants were 133 apparently healthy non-obese individuals (controls), 24 probable exogenously obese without family history (Group I), 66 probable familial obese (Group II),

and 44 obese children who had been referred to the pediatric endocrinology department with a complication of obesity (Group III) (Fig. 1). Group I and Group II obese children were gathered in a school-based epidemiological study, which screened a total of 3,024 children.

Exogenously obese children (Group I) were selected from the children who were in a school with high socio-economic status and did not have a family history of obesity and vascular disease.

Familial obese children (Group II) were selected from a school with low socio-economic status and had a family history of obesity and vascular disease.

In the school with high socio-economic status, 757 children, and in the school with low socio-economic status 2,267 children, were included in the screening program. The questionnaire form, which included the assessment of nutrition behavior, daily life style, and presence of family history of hypertension, obesity, and diabetes mellitus, was answered for all school-based obese children.

Obesity was defined as a body mass index (BMI) percentile greater than 95<sup>12</sup>. The control group's BMI percentile was less than 80.

Controls, age range  $34.50 \pm 8.50$  years, were consecutively selected among unrelated healthy individuals without personal or family history of vascular disease. Mean ages of groups I, II, and III were  $13.54 \pm 3.02$ ,  $11.75 \pm 3.18$  and  $11.22 \pm 2.66$  years, respectively.

The clinical characteristics of the groups are given in Table 1. Metabolic disturbances, such as hyperlipidemia, insulin resistance, polycystic ovary syndrome (PCOS), hypertension, acanthosis nigricans, were evaluated in group III children (Table 2).

#### Laboratory methods

Plasma glucose concentration was determined with a Sigma glucose kit (Sigma, USA) and plasma insulin levels were measured by radioimmunoassay (RIA) with a DSL kit (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA). Plasma lipid concentrations were assayed colorimetrically after a 12-hour fast by a Tecnico RA-XT autoanalyzer.

Evaluation of the children's hyperinsulinemia included fasting and 120-minute oral glucose tolerance test (OGTT) plasma insulin levels ( $1.75$  g

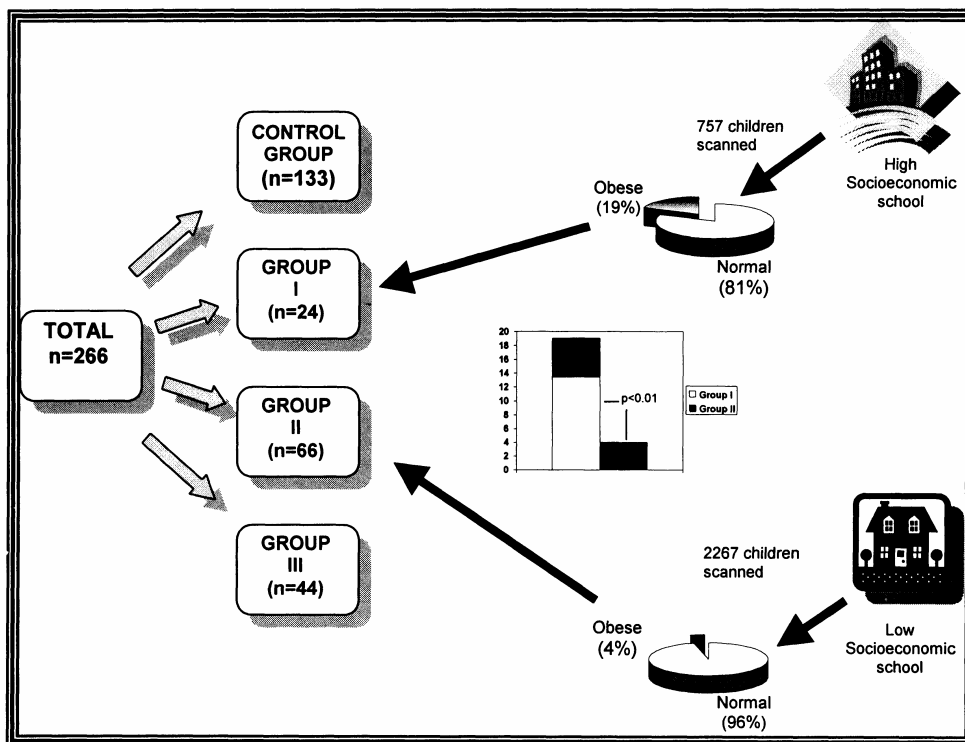


Fig. 1: Scheme of the draft of the study groups.

TABLE 1  
The clinical characteristics of the groups

	Group I	Group II	Group III
Age (yr)	13.54 ± 3.02	11.75 ± 3.18	11.22 ± 2.66
Gender	42% F	55% F	39% F
RBMI	140.58 ± 17.21	129.9 ± 8.36	147.61 ± 16.09
BMI	28.30 ± 4.66	24.52 ± 3.16	27.78 ± 4.18
Metabolic syndrome	Not evaluated	Not evaluated	89.48%

**TABLE 2**  
Clinical characteristics of Group III obese patients

<b>n</b>	44
<b>Age (decimal year)</b>	11.22 ± 2.66
<b>Gender</b>	15 F
<b>Fasting glucose (mg/dl)</b>	91.75 ± 12.53
<b>OGTT 120 min glucose (mg/dl)</b>	101.67 ± 18.53
<b>Frequency of fasting glucose intolerance</b>	7.89%
<b>Frequency of glucose intolerance</b>	2.63%
<b>Fasting insulin (μU/ml)</b>	18.98 ± 10.87
<b>OGTT 120 min insulin (μU/ml)</b>	62.40 ± 49.6
<b>HOMA-IR</b>	4.48 ± 3.11
<b>Frequency of high HOMA-IR (&gt;3.5)</b>	50%
<b>Atherogenic index (chol/HDL)</b>	3.77 ± 0.67
<b>Frequency of high atherogenic index (&gt;4)</b>	26.31%
<b>Frequency of acanthosis nigricans</b>	67.56%
<b>G/I</b>	6.76 ± 4.8
<b>Frequency of G/I &lt;6</b>	59%
<b>Triglyceridemia (mg/dl)</b>	119.2 ± 49.16
<b>Hypertriglyceridemia</b>	42.10%
<b>Hypertension</b>	13.15%
<b>Hepatosteatorsis</b>	10.52%
<b>Frequency of PCOS in girls</b>	6.6%
<b>Frequency of premature pubarche</b>	7.89%
<b>Family history of obesity</b>	76.31%
<b>Family history of diabetes mellitus</b>	47.36%
<b>Family history of atherosclerosis</b>	21.05%

glucose/kg body weight, maximum 75 g). Blood samples were obtained before and 30, 60, 120, 180 minutes after the glucose load. Fasting insulin levels above 20 μU/ml or 120 minute (post OGTT) insulin levels above 150 μU/ml were accepted as hyperinsulinemia<sup>13</sup>. Indirect parameters, including homeostasis model assessment of insulin resistance

(HOMA-IR) and fasting glucose/fasting insulin ratio (G/I), in assessing insulin resistance<sup>14</sup>, were calculated using the following formulae:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{[\text{fasting insulin } (\mu\text{IU/ml}) \times \text{fasting glucose (nmol/l)}]}{22.5}$$

$$\text{G/I} = \frac{\text{fasting glucose (mg/dl)}}{\text{fasting insulin } (\mu\text{IU/ml})}$$



Hypertension was defined as a blood pressure percentile greater than 90<sup>15</sup>. Triglyceride above 120 mg/dl and atherogenic index above 4 were accepted as hyperlipidemia. Hirsutism, menstrual disturbances, hyperandrogenism, augmented 17-hydroxyprogesterone response to gonadotropin releasing hormone agonist, and the typical appearance at ovarian ultrasonography revealed PCOS.

DNA was extracted by conventional methods and polymerase chain reaction of the PAI-1 4G/5G polymorphism was performed according to previously described methods using primers 5'-CAC AGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' and 5'-CCA ACAGAGACTCTTGGTCT-3'. Amplification was performed for 35 cycles with annealing temperature of 60°C (Ericomp, USA). The amplified 98/99 bp product was digested with Bse I (Fermentas, Vilnius, Lithuania) at 55°C and subjected to 6% polyacrylamide gel electrophoresis<sup>16</sup>.

The local ethics committee of Ankara University Faculty of Medicine approved the study and written informed consent was obtained from all participants.

#### Statistical analysis

Odds ratios were determined by logistic regression analysis. Values were expressed as means  $\pm$  SD and were compared by analysis of variance.

### RESULTS

Incidence of obesity was 19% and 4% in the schools with high socio-economic and low socio-economic status, respectively (Fig. 1). The distribution of metabolic syndrome findings and the clinical characteristics of the patients in group III are given in Figure 2 and Table 2.

Frequencies of 4G/4G gene polymorphisms were 24.81%, 37.50%, 64.80% and 61.11% in the control group and groups I, II, and III, respectively. Predicted gene polymorphism distribution in all groups is given in Table 3.

4G/4G gene polymorphism was more frequent among groups II and III, whereas 5G/5G was more frequent among non-obese control individuals. The odds ratio and confidence limits of the groups are shown in Table 4. The patients who had a positive

family history for obesity (Group II) showed high risk compared to exogenously obese patients (Group I). Patients in groups II and III had similar genotypes.

Our data indicate that in obese individuals, carrying the 4G allele in either heterozygous or homozygous state increases the risk of vascular disease (OR: 6.10, 95% CI 1.64-22.90); and in the presence of family history for obesity or metabolic syndrome (OR: 4.48, CI 95% 1.26-15.82). Group III, similar to group II, by carrying the 4G/4G genotype, had more risk for vascular disease compared to exogenously obese individuals.

Acanthosis nigricans, high HOMA-IR values, hypertriglyceridemia, and elevated atherogenic index were associated with high frequencies of 4G/4G genotype compared to other features of metabolic syndrome (Table 5).

### DISCUSSION

Focusing on the Mediterranean part of Europe, according to the largest study performed in Spain by Moreno *et al.*, obesity rates have increased from 6.4% to 14.4% in boys and from 10% to 17.7% in girls<sup>17</sup>. In France during the 1990s, the rates have increased to 10% and 12%<sup>18</sup>. In Italy, in a study among adolescents, incidences of obesity were 9% in males and 10% in females<sup>19</sup>.

There are no nationwide data available in our country. The regional but representative data of the present study show that high socio-economic status contributes highly to the increase in obesity prevalence.

Obesity has major risk factors for chronic diseases, such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease, hypertension, and stroke. The combination of obesity, hyperinsulinemia, hyperlipidemia and hypertension is referred to as syndrome X, or metabolic syndrome. Our data show that the group III patients who had metabolic syndrome are at major risk for developing disease in the future. This selected group of patients does not reflect the general population, but the high prevalence of insulin resistance and hyperinsulinemia shows the need for much more focus on early intervention. For this purpose methods are needed to determine whether an individual child is healthy

**TABLE 3**  
The predicted gene polymorphism distribution in all groups

	Control	Group I	Group II	Group III
<b>5G/5G</b>	33	11	13	6
<b>5G/4G</b>	67	4	29	8
<b>4G/4G</b>	33	9	24	22
<b>n</b>	133	24	66	36
<b>Frequency of 4G/4G (%)</b>	24.81	37.5	64.80	61.11
<b>Frequency of 4G allele (%)</b>	50	45.8	58.34	72.23

**TABLE 4**  
The odds ratio and confidence limits of the groups

PAI-I	Group I	Group II	Odds ratio	Confidence limits
<b>5G/5G</b>	11	13	1	
<b>4G/5G</b>	4	29	6,13	(1,64-22,9)
<b>4G/4G</b>	9	24	2,25	(0,74-6,84)

PAI-I	Group II	Group III	Odds ratio	Confidence limits
<b>5G/5G</b>	13	6	1	
<b>4G/5G</b>	29	8	0.59	(0.17-17.42)
<b>4G/4G</b>	24	22	2	(0.64-6.13)

PAI-I	Group I	Group III	Odds ratio	Confidence limits
<b>5G/5G</b>	11	6	1	
<b>4G/5G</b>	4	8	3,66	(0.77-17.42)
<b>4G/4G</b>	9	22	4,48	(1.26-15.82)

**TABLE 5**  
4G/4G allele frequencies (%) according to clinical findings of the metabolic syndrome

	4G/4G (%)
<b>Acanthosis nigricans</b>	52.17
<b>HOMA-IR &gt;3.5</b>	57.14
<b>Triglycerides &gt;120 mg/dl</b>	56.25
<b>Atherogenic index &gt;4</b>	75.00

or at any risk. Preventive strategies are urgently needed to stop the increasing rate of obesity in our region.

It is well known that PAI-1 4G allele carriers have potentially decreased fibrinolytic activity constituting an additional prothrombotic factor<sup>9,10,16</sup>.

Our data indicate that carrying the PAI-1 4G allele, in heterozygous or homozygous state, creates a vascular thrombotic risk in patients with obesity, with either metabolic syndrome or a history of familial obesity compared to control non-obese and exogenously obese individuals. As indicated by previous data, this study also revealed that PAI-1 gene polymorphism is strongly associated with obesity<sup>8</sup>, whereas the 5G allele was more common among the control group. Furthermore, this study showed that patients with IRS and familial obesity who carry the 4G allele have four- to six-fold increased risk for vascular disease compared to patients with exogenous obesity. Recently, Hoffstedt *et al.* also showed that the 4G allele has a strong association with obesity, and the risk of being obese is increased by two-fold in carriers of the 4G allele<sup>8</sup>. However, this study did not allow an analysis of the interaction between PAI-1 genotype and metabolic syndrome.

The study by Festa *et al.*<sup>20</sup> recently demonstrated that in a large cohort of healthy non-diabetic individuals, patients who developed an incident diabetes within 5 years presented higher levels of PAI-1 as well as other acute phase proteins at baseline than converters. Our findings together with this study suggest that PAI-1 genotype may play a role in the development of vascular disease and type 2 diabetes mellitus. Juhan-Vague *et al.* suggested that PAI-1 inhibitors could be a potential target for therapeutic intervention to decrease the risk of vascular disease<sup>5</sup>. Moreover, a recent study suggested that PAI-1 might not merely increase in response to obesity and insulin resistance, but might have a direct causal role in obesity and insulin resistance; inhibition of PAI-1 might provide a novel anti-obesity and anti-insulin resistance treatment<sup>21</sup>.

Interestingly, obesity is associated with the features of the metabolic syndrome in some but not all populations. Both genetic and environmental factors regulate plasma PAI-1 levels. Association of

high plasma PAI-1 levels with the 4G allele is probably an important finding that shows the risk of metabolic syndrome in obese children before the features of metabolic syndrome become apparent. Results of this study suggest that exogenously obese patients who do not carry the 4G allele do not have such a high risk for vascular disease.

In the present study, obese patients with a family history of obesity and cardiovascular disease or type 2 diabetes mellitus (group II) and who have any feature of metabolic syndrome (group III) carry the 4G/4G genotype more frequently than the 4G/5G and 5G/5G genotypes. Carrying this genotype can increase the risk of vascular disease. These two groups had similar genotype and odds ratios. A positive family history is as important as having a clinical sign of metabolic syndrome. During the evaluation of an obese child, a detailed family history should be obtained. Positive family history can distinguish the patients who are more at risk for metabolic syndrome and vascular disease.

Obesity is clearly not one disease, but is multifactorial, involving genetic, metabolic and behavioral factors. Therapeutic interventions, such as dietary management and exercise programs, are more effective prior to the signs of metabolic syndrome.

In this study, 4G/4G PAI-1 gene polymorphism frequencies were found to be high in those patients who had acanthosis nigricans, high HOMA-IR values, hypertriglyceridemia, and high atherogenic index. Evaluation of 4G/4G polymorphism in obese children with metabolic syndrome has given us a clue to highlight whether this finding reflects the high risk of vascular disease. However, the number of children was too low to allow a reliable analysis of the differences between groups for genotype and allele frequencies. Studies with large series of patients are needed to delineate the contribution of PAI-1 genotype to metabolic syndrome and vascular disease.

In conclusion, the high and rapidly increasing prevalence of childhood obesity in high socioeconomic status is associated with health risks. Carrying the 4G/4G genotype in the PAI-1 gene is more common than the 4G/5G and 5G/5G genotype in obese children with a family history of obesity and cardiovascular disease or type 2 diabetes mellitus and in the patients who have any feature of

metabolic syndrome. These patients can be at an increased risk for developing vascular disease. Acanthosis nigricans, high HOMA-IR value, hypertriglyceridemia, and high atherogenic index can also reflect the high risk of vascular disease in metabolic syndrome.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Ankara University Research Fund.

#### REFERENCES

1. Reaven G. Syndrome X, 10 years after. *Drugs* 1999; 58: 19-20.
2. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 24: 683-689.
3. Mertens I, Van Gaal LF. Obesity, hemostasis and the fibrinolytic system. *Obes Rev* 2002; 3: 85-101.
4. von Kandel R, Maly FE, Frey K, Fischer JE. Contribution of the type 1 plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism to impaired fibrinolysis in vital exhaustion. *Ital Heart J* 2003; 4: 791-796.
5. Juhan-Vague I, Alessi MC, Mavri A, Morange PE. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1575-1579.
6. Schafer K, Fujisawa K, Konstantinides S, Loskutoff DJ. Disruption of the plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic *ob/ob* mice. *FASEB J* 2001; 15: 1840-1842.
7. Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1851-1855.
8. Hoffstedt J, Andersson IL, Persson L, Isaksson B, Arner P. The common -675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor -1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia* 2002; 45: 584-587.
9. Yilmaz E, Akar E, Akar N. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thromboembolic patients with and without prothrombin 20210 G→A. *Turk J Haematol* 2004; 21: 83-86.
10. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolami A, Patrassi GM. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 956-960.
11. Roest M, van der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, de Groot PG, Sixma JJ, Grobbee DE. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation* 2000; 101: 67-70.
12. Troiano RP, Flegal KM, Kuczmarski RJ, Campbell SM, Johnson CL. Overweight prevalence and trends for children and adolescents. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1963 to 1991. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995; 149: 1085-1091.
13. Tritos NA, Mantzoros CS. Clinical review 97: Syndromes of severe insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3025-3030.
14. Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C, Stern MP, Miettinen H. A prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care* 1996; 19: 1138-1141.
15. Tümer N, Yalçınkaya F, İnce E, Ekim M, Köse Çakar N, Kara N, Özkaya N, Ensari C, Önder S. Blood pressure nomograms for children and adolescents in Turkey. *Pediatr Nephrol* 1999; 13: 438-443.
16. Akar N, Yılmaz E, Akar E, Avcu F, Yalcin A, Cin S. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691 G→A. *Thromb Res* 2000; 97: 227-230.
17. Moreno LA, Sarria A, Fleta J, Rodriguez G, Bueno M. Trends in body mass index and overweight prevalence among children and adolescents in the region of Arason (Spain) from 1985 to 1995. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 925-931.
18. Val S, Tichet J, Rolland-Cachera MF. Trends in the prevalence of obesity between 1980 and 1996 among French adults and children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; Suppl 3: S210.
19. D'Argenio P, Citarella A, Palombi EL, Aver Samo MP, Bassi R, Di Fiore A, Feri M, Glielmo N, Iglia G, Petrocchia C, Sasso L, Sasso S. Obesity and overweight among pre-adolescents: a study from the Province of Bebevento. *BEN* 2001; 14: 3-5.
20. Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM; Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51: 1131-1137.
21. Ma LJ, Mao SL, Taylor KL, Kanjanabuch T, Guan Y, Zhang Y, Brown NJ, Swift LL, McGuinness OP, Wasserman DH, Vaughan DE, Fogo AB. Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Diabetes* 2004; 53: 336-346.

**EK:2**

## **The Effect of Plasminogen Activator Inhibitor-1 -675 4G /5G polymorphism on PAI-1 gene Expression and adipocyte differentiation in Cultured Cell Lines**

### **Abstract**

Obesity is a complex, multi-factorial chronic disease, frequently associated with cardiovascular risks, hypertriglyceridaemia, low HDL-cholesterol, high blood pressure and the insulin resistance that appears to be central to the pathogenesis of type II diabetes (1,2). However the role of PAI-1 in adipogenesis is still unknown, circulating PAI-1 levels are elevated at an early stage of impaired glucose tolerance and continue to be elevated as diabetes and metabolic syndrome develop (3,4). PAI-1 levels are also significantly elevated in the plasma of obese individuals as well as adipose tissue of obese mice and humans (5). In our study we investigated PAI-1 promoter -675 4G/5G polymorphism on PAI-1 gene expression and reduce PAI-1 gene expression with thiazolidinone treatments. We constructed a dual-glo luciferase reporter assay to investigate role of this deletion on the PAI-1 promoter activity in preadipocytes, adipocytes and HUVEC cells. We also investigated the effects of troglitazone and ciglitazone treatments on PAI-1 promoter activity, as well as expression of endogenous PAI-1. In the present study, we demonstrated that the 4G/4G genotype increase the PAI-1 promoter activity, PAI-1 increases the differentiation of preadipocytes to adipocytes. Troglitazone and the ciglitazone, two PPAR $\gamma$  agonist reduce the activity of PAI-1 promoter significantly, decrease the PAI-1 expression in HUVEC as well as un-differentiated and differentiated 3T3 L1 cells. As a conclusion, these results indicate that absence of PAI-1 in adipocytes may protect the cells against insulin resistance by promoting glucose uptake and adipocyte differentiation via decrease the PPAR $\gamma$  expression that modulates the adipocyte differentiation.

**Key Words:** Plasminogen activator-1, human umbilical cord veins endothelial cells, troglitazone, ciglitazone.

## INTRODUCTION:

World Health Organization (WHO) describes obesity as one of the most blatantly visible, yet most neglected public-health problem that threatens to overwhelm health care systems of developed as well as developing countries. In particular its association with insulin resistance, hypertension, dislipidemia and type II diabetes greatly increases the health and social and economic burden of this disease worldwide.(6). Obesity is a metabolic disorder that is associated with increased plasminogen activator inhibitor-1 concentration in circulation. The plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) is a serine protease inhibitor and the physiological inhibitor of tissue type and urokinase type plasminogen activators. The 50 kDa single chain glycoprotein PAI-1 is secreted into plasma immediately after synthesis and inhibits tPA and uPA by forming an irreversible complex. The increase in PAI-1 expression was correlated with the -675 4G/5G promoter polymorphism in some but not all studies. This polymorphism involves deletion of a single base pair which reduces number of G's at -675 position from 5G to 4G (5G? 4G). Consequently the relationship between the 4G/5G polymorphism and obesity remains unclear. Adipocytes are derived from preadipocyte cells with adipocyte differentiation being characterized by a coordinate increase in the expression of a number of specific genes. PAI-1 is one of these candidate genes that is endogenously synthesized in adipocytes. Troglitazone and the ciglitazone from thiazolidinedione class of compounds improve insulin sensitivity in humans and animals with insulin resistance. These antidiabetic agents are peroxisome proliferators-activated receptor-gamma (PPAR?) agonists. PPAR? regulates the transcription and expression of specific genes that affect fat in adipose tissue, skeletal muscle and liver into peripheral adipocytes resulting improvement in insulin sensitivity and reduced activation of stress sensitive signaling pathways. Because of PAI-1 4G/4G genotype is much more common than the 5G/5G allele in our pediatric obese study group as previously reported (7) we sought to determine the sensitivity of PAI-1 genotypes to troglitazone and ciglitazone treatments with in preadipocytes and adipocytes. Our recent data indicate that PAI-1 may increase in response to development of obesity and insulin resistance, but may have a conditional direct causal role. By inhibition of PAI-1 with a neutralizing anti-PAI-1 antibody in differentiated 3T3-L1 adipocytes, we reduce adipocyte differentiation and by overexpression of PAI-1 by adenovirus-mediated gene transfer in 3T3-L1 adipocytes we increase the PAI 1 expression and we found that PAI-1 deficiency may completely prevent from development of obesity and insulin resistance.

## **MATERIALS AND METHODS**

Genotyping for PAI-1 polymorphism was determined by PCR amplification with primers forward 5'CACAGAGAGAGTCTG GCCACGT 3' and reverse 5'CCAACAGA GGACTCTTGGTCT 3'. These primers amplify 99 bp fragment for 5G allele and 98 bp. fragment for 4G allele at an annealing temperature of 60°C. The deletion of single G removes the BseL1 recognition sequence that digests the 99-bp fragment into 77bp. and 22 bp. fragments (8,9).

### **Cell culture**

Two different in vitro cell culture models were used in this study. To determine the effects of 4G/4G and 5G/5G genotypes on PAI-1 promoter activity in the course of differentiation and to investigate expression of endogenous PAI-1 in differentiating cells.

### **3T3 L1 Cell Culture and Adipocyte Differentiation**

3T3L1 preadipocytes (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml of penicillin, and 50 µg/ml of streptomycin at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Two days after reaching confluence, differentiation was induced by addition of an adipogenic hormonal cocktail (1 µg/ml insulin, 0.25 µM dexamethasone, and 0.5 mM isobutylmethylxanthine and (or) 1mM TZD) for 2 days. The cells were then cultured with DMEM containing insulin (1 µg/ml) alone for 2 days, followed by an additional 2 days in medium with 0,5 µg/ml insulin (11). These differentiated 3T3-L1 adipocytes at day 6 exhibited intracellular lipid droplets, and continued differentiation for 14 days. To determine the role of effect of PPAR $\alpha$  agonist, preadipocytes were incubated with or without 5mM and 10mM troglitazone and ciglitazone for 14 days period. Presence of lipid droplets were confirmed morphologically by multiple oil red O-staining that is specific for fat droplets in the cytoplasm.

## **Knock-down of PAI-1 with Neutralizing Monoclonal Antibody:**

To inhibit PAI-1, 3T3-L1 preadipocytes were treated for 6 days with a neutralizing monoclonal antibody against PAI-1 (MA-33H1F7, 10 µg/ml) along with induction of differentiation (10). MA-33H1F7 inhibits mouse as well as rat PAI-1 by converting PAI-1 to a non-inhibitory substrate for tPA (16). The dose of anti-PAI-1 antibody was chosen based on its biological activity in inhibiting PAI-1 effects on angiogenesis *in vitro*.

### **Adenoviral infection of 3T3-L1 preadipocytes**

Recombinant adenovirus bearing human PAI-1 (Ad- PAI-1) and control adenovirus expressing *Escherichia coli* β-galactosidase (Ad- lacz) were gifts from Dr. Robert Gerard (University of Texas Southwestern Medical Center) (11). 3T3-L1 preadipocyte cultures (2d post confluence) in 6-well plates were infected with the Ad- PAI-1 or Ad- lacz by addition of 1X10<sup>9</sup> plaque-forming units (Pfu)/well for 3 hr before induction of differentiation. The medium containing free virus was then removed, and fresh DMEM medium with 10% fetal bovine serum was added, and cells were induced to differentiate as described before.

## **Treatment with Troglitazone and Ciglitazone**

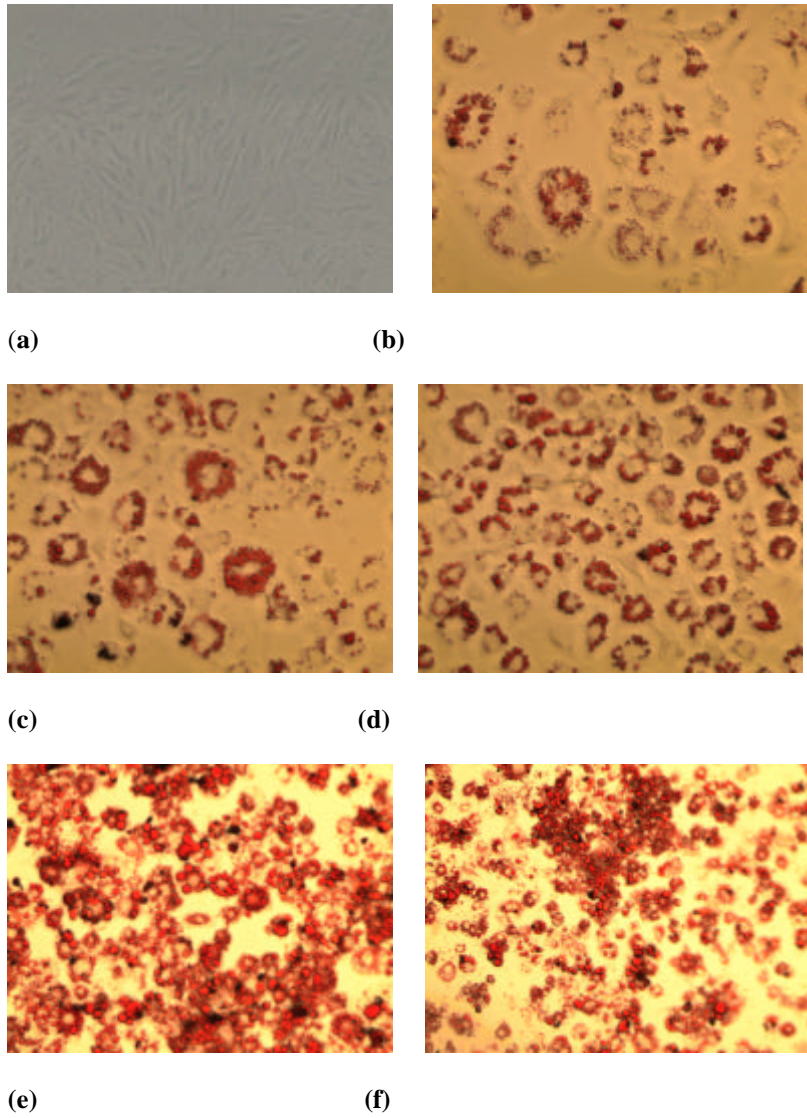
Troglitazone and ciglitazone from thiazolidones family, lower blood glucose in type II diabetic patients primarily by enhancing peripheral tissue sensitivity to insulin. The insulin-sensitizing action of troglitazone is also seen in individuals with impaired obese glucose tolerance (nondiabetic subjects) (12), is accompanied by reduction in fasting and postprandial insulin levels. Thus if chronic hyperinsulinemia is an important determinant of elevated PAI-1 with obesity and type II diabetes, treatment with troglitazone and ciglitazone should lower PAI-1 level.

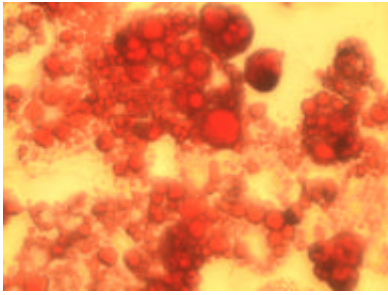


### Oil red O staining

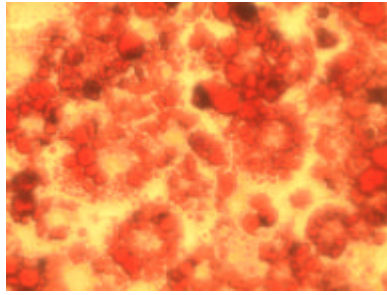
Differentiation of preadipocytes to adipocytes was monitored by measurement of intracellular lipid accumulation using Oil red O staining. After fixation with 4 % formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h, the cells were washed and stained with 0.4% filtered Oil red O for 30 min. and washed with 60 % isopropanol for 3 times and washed with PBS and screened in PBS (13). Differentiation was calculated as percent of cells positive for Oil red O (positive cells for oil red O)/total cell number \*100 assessed under 40X magnification.

**Figure 1.**

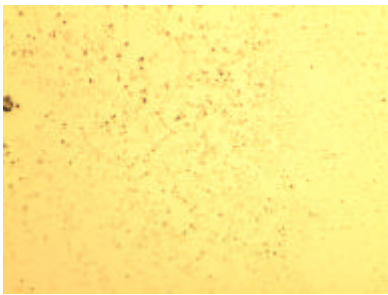




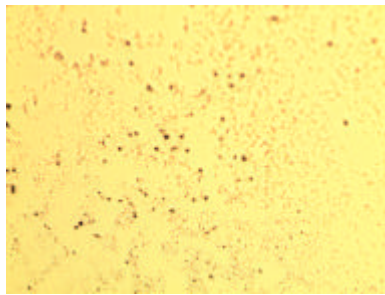
(g)



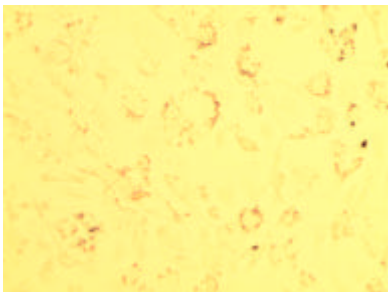
(h)



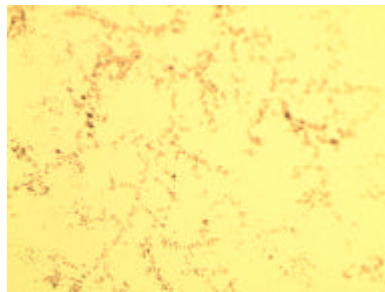
(i)



(j)



(k)



(l)

**Figure 1. (a); 3T3 L1 undifferentiated cells (b);Day 4 adipocytes (20X) (c); Day 7 adipocytes (20X) (d); Day 10 adipocytes (20X) (e); transfected adipocytes with 4G/4G PAI-1 (20X) day 10 (f); transfected adipocytes with 5G/5GPAI-1 (20X) day 10 , (g); transfected adipocytes with 5G/5G PAI-1 (40X) (h); transfected adipocytes with 4G/4G PAI-1 (40X) (i); 3T3L1 cells with 7mM ciglitazone (10 x magnification) (j); 3T3L1 cells with 7mM troglitazone (10 x magnification) (k); 3T3L1 cells with 7mM ciglitazone (20x magnification), (l); 3T3L1 cells with 7mM troglitazone (20x magnification)**

## HUVEC Cell Culture

HUVEC cells (human umbilical cord veins endothelial cells) were cultured in human endothelial-SFM (Gibco BRL, USA) containing %5 fetal bovine serum (FBS), 10ng/ml bFGF and 10 ng/ml EGF (Gibco, USA). The HUVECs were used at passages 3-4 in this study. The cells were seeded onto 6 well plates at density of  $3 \times 10^5$  cells/well and allowed to attach overnight. Cells were then incubated with or without 5mM and 7mM troglitazone or ciglitazone. Expression of PAI-1 was investigated with western blotting.

## Western Blotting

Cells were lysed with immunoprecipitation buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 50 mM NaF, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 150mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 50-mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 10-mg/ml soybean trypsin inhibitor, 2-mg/ml leupeptin, 1-mg/ml aprotinin) and centrifuged. Protein concentration in supernatants was determined by BCA protein assay (Pierce). For Western blotting, an equal amount of proteins (30 $\mu$ g) were boiled in sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer for 5 min and separated by electrophoresis in SDS-12% polyacrylamide gels, and the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in phosphate- buffered saline containing 0.2% Tween 20 (T-PBS) and 5% nonfat dry milk, incubated with primary antibodies rabbit polyclonal antibody against PAI-1/ H135 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ( 1: 200) in T-PBS for 2 h at room temperature, washed three times with T-PBS, and conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ( 1: 450) for 1 hour. To confirm equal protein loading the membranes were re-probed with rabbit actin polyclonal antibody. (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ( 1: 1000) for 2 hours. The membrane incubated with the same goat anti-rabbit immunoglobulin secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ( 1: 450) for 1 hour. The visulation of the Ag-Ab PAI-1 conjugates was detected with Odyssey Infrared Imaging System.( Li-Cor Biosciences).

## Plasmid Constructs for Transfection

The human PAI-1 promoter between -829 to +36 bp was amplified with forward 5' GGGGTACCCGTTGGTCTCCTGTTTCCTTACCAAGC 3' and reverse 5'CCGGCTCGAGGACAGCGCTCTTGGCCCTGCAGCCA 3' primers incorporating the restriction sites for Kpn I and Xho I (14) using human genomic DNA as template. After digestion by restriction endonucleases PCR product was ligated into luciferase reporter plasmid (pGL-3 basic, promega). Site-directed mutagenesis was performed by overlap-extension PCR strategy (primers Mutant Forward: 5'GAGTCTGGACACGTGGGGAGTCAGCCGT3' and Mutant Reverse: 5' ACGGC TGACTCCCCACGTGTCCAGACT ). The product was cloned between Kpn I and Xho I sites and mutation was verified by sequencing.

## Transient Transfection and Luciferase Activity Assay

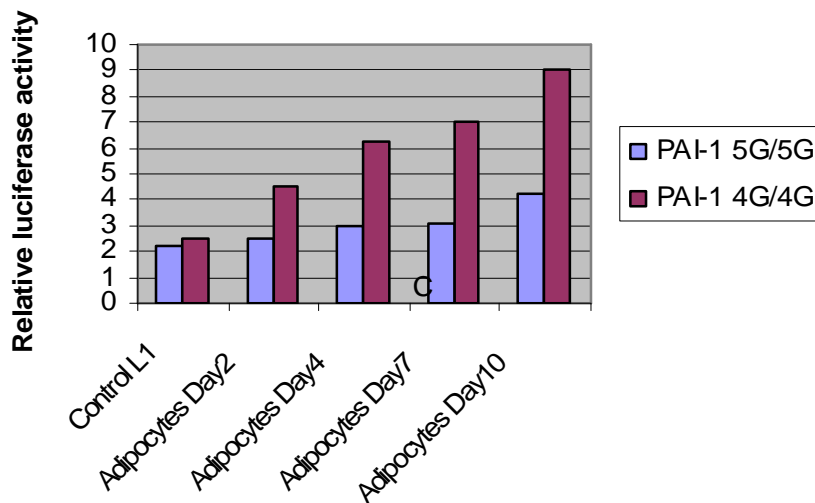
3T3 L1 cells were seeded onto 6 well plates at density of  $3 \times 10^5$  cells/well and allowed to attach overnight in medium. The cells were transiently transfected with effectine (Qiagen,USA).  $1 \mu\text{g/well}$  pGL-3 basic construct in which firefly reporter plasmid was driven by PAI-1 promoter was co-transfected with  $1 \mu\text{g/well}$  renilla luciferase pRLTK vector. To determine basic extractivity from Pgl-3 plasmid cells were also transfected with this plasmid without any promoter elements. 4 hours after transfection cells were washed and cultured in differentiation medium as described or in growth medium with or without 5mM or 10mM troglitazone or ciglitazone. PAI-1 promoter activity was measured on days 0, 2, 4,7 and 10 with dual-glo luciferase assay according to the manufacturer's instructions (Promega). Firefly and Renilla dual-glo luciferase activity from PAI1 promoter were measured sequentially from a single cell lysate on a Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies USA, Oak Ridge,TN) by using the dual luciferase assay system The results were expressed as a ratio of firefly luciferase ( $F_{\text{Luc}}$ ) activity to Renilla luciferase ( $R_{\text{Luc}}$ ) activity. Data were collected from at least three experiments and standard deviation was calculated. In the dual-glo luciferase transient transfection assay, promoter activity was calculated by the formula:

$$\text{Activity} = [F_{\text{Luc}}(\text{P})/ R_{\text{Luc}}(\text{P}) / F_{\text{Luc}}(\text{B})/ R_{\text{Luc}}(\text{B})]$$

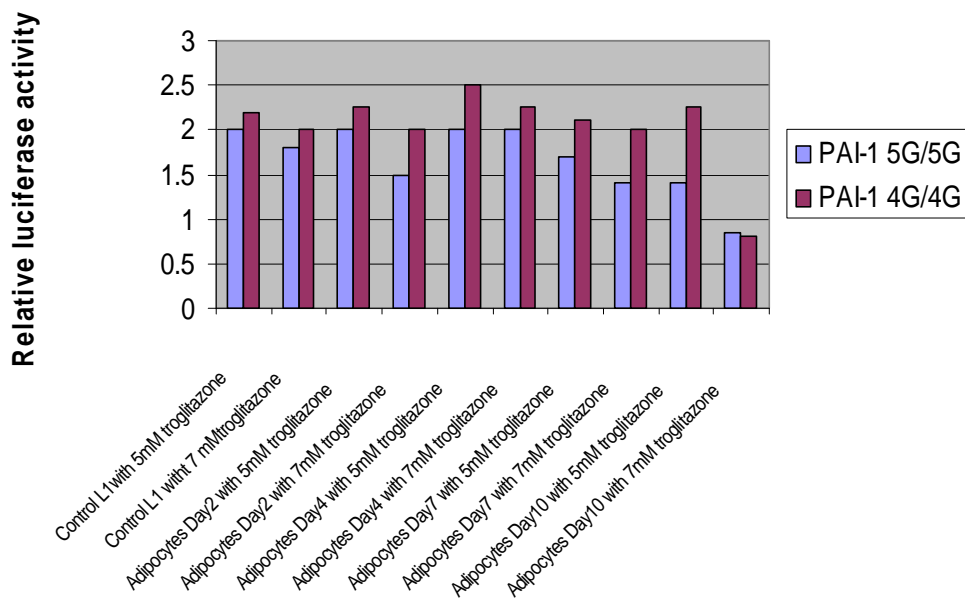
where  $F_{Luc}$  is firefly luciferase activity,  $R_{Luc}$  is Renilla luciferase activity, (P) is the cotransfection experiment using the plasmid with PAI-1 promoter and the Renilla plasmid, and (B) is the cotransfection experiment using the promoterless (basic) firefly plasmid and the Renilla plasmid. Endogenous PAI-1 levels was determined in non transfected cells with western blotting from different days of differentiated and undifferentiated cells with the same antibodies described in western blotting section.

## Results

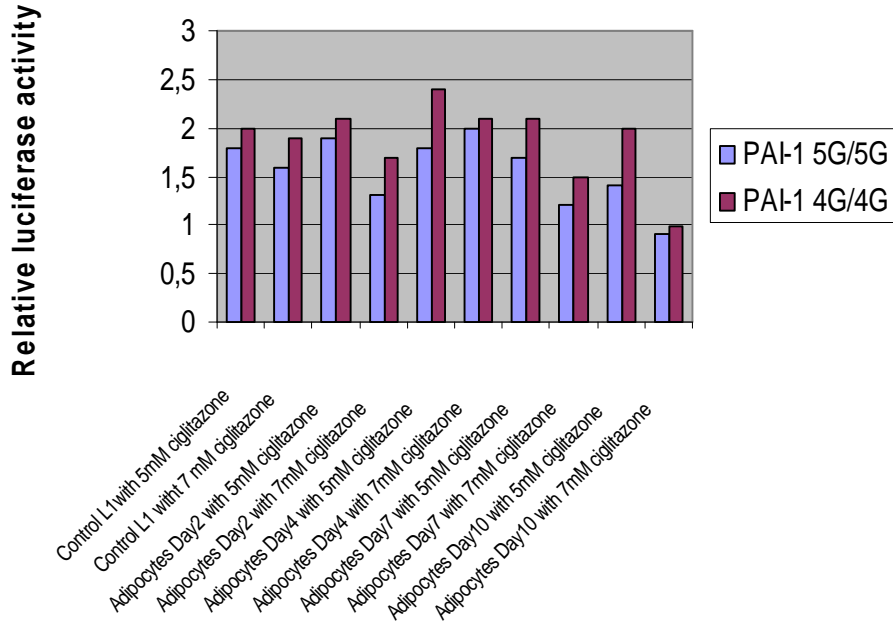
Product of the 4G allele of PAI-1 gene binds an activator, where as the 5G allele binds an activator and a repressor and is associated with a relatively reduced transcription of PAI-1. The 5G variant is associated with less inhibition of the plasminogen activators and consequently, increased conversion of plasminogen to plasmin and increased activation of matrix metalloproteinases. The increase in PAI-1 expression was correlated with the 4G/5G promoter polymorphism in some studies but not others. The relationship between high PAI-1 level and obesity is well known in adults and children but consequently the relationship between the G deletion polymorphism at position -675 promoter region on PAI-1 activity and obesity remains unclear. Comparison of 4G/4G and 5G/5G genotypes with Dual-glo luciferase Assay revealed a positive correlation detected between 4G/4G genotype and PAI-1 promoter activity in adipocytes. However in 3T3L1 control cells, the promoter activity was similar for 4G/4G and 5G/5G alleles, in differentiated adipocytes 4G/4G allele was more active than 5G/5G allele (Figure 2). Treatments with thiazolidones such as ciglitazone and troglitazone decreased the PAI-1 promoter activity in adipocytes with the similar effect (figure 3,4,5).



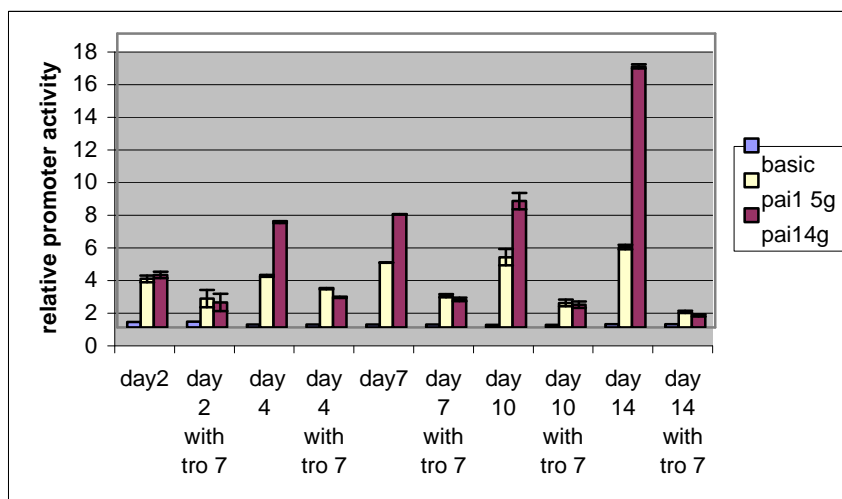
**Figure2.** Activation of 4G/4G and 5G/5G PAI-1 promoter by cotransfection of pGL-3 basic / PAI-1 4G/4G firefly luciferase ( $F_{Luc}$ ) - Renilla luciferase ( $R_{Luc}$ ) and pGL-3 basic / PAI-1 5G/5G firefly luciferase ( $F_{Luc}$ ) - Renilla luciferase ( $R_{Luc}$ ). Values showed 4G/4G allele was more active than 5G/5G allele in adipocytes with, fold of  $n=1,5$  for adipocytes day 2,  $n= 2,08$  for adipocytes day 4,  $n=2,3$  for adipocytes day 7 and  $n=2,1$  for adipocytes day 10. But for 3T3L1 control undifferentiated cells there was no significant difference between 4G/4G and 5G/5G alleles with  $n=1,1$  of fold.



**Figure 3.** Troglitazone treatment on undifferentiated 3T3L1 cells and on differentiated adipocytes from different days of differentiation. The data showed troglitazone reducing the PAI-1 promoter activity in both 3T3L1 cells and adipocytes significantly.

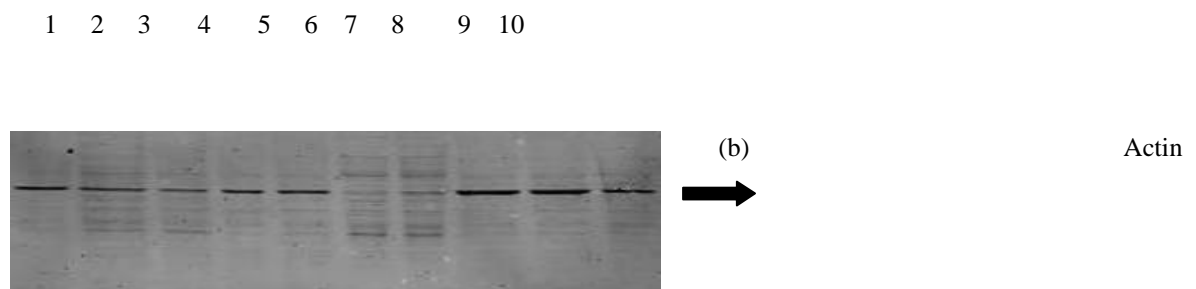
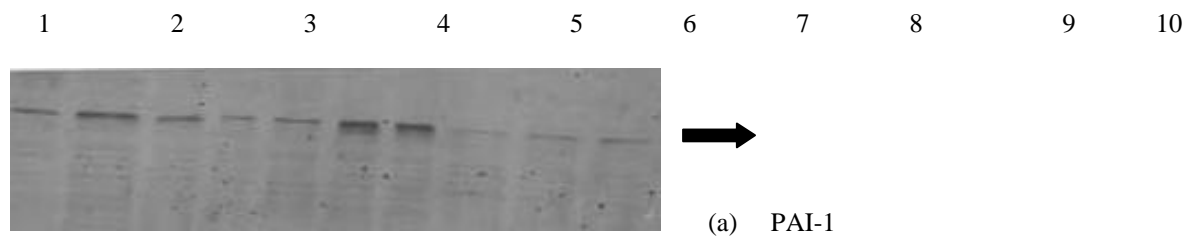


**Figure 4.** Ciglitazone treatment on undifferentiated 3T3L1 cells and on differentiated adipocytes from different days of differentiation. The data showed ciglitazone reducing the PAI-1 promoter activity in both 3T3L1 cells and adipocytes significantly.



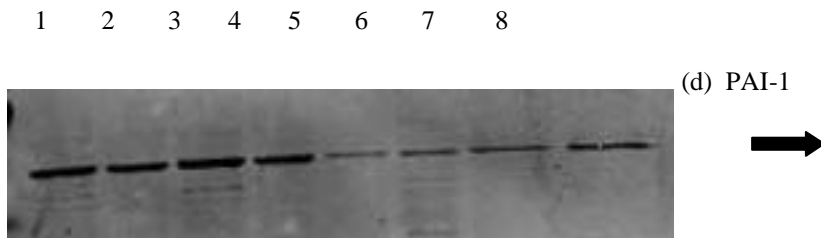
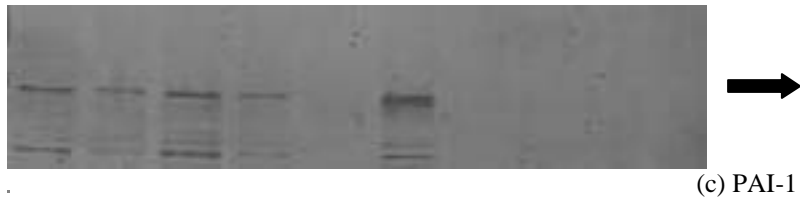
**Figure 5:** Day 2 without treatment PAI-1 4G/5G n = 1.10, Day 2 with treatment PAI-1 4G/5G n = 0.85, Day 4 without treatment PAI-1 4G/5G n = 2.03, Day 4 with treatment PAI-1 4G/5G n = 0.77, Day 7 without treatment PAI-1 4G/5G n = 1.74, Day 7 with treatment PAI-1 4G/5G n = 0.88, Day 10 without treatment PAI-1 4G/5G n = 1.80, Day 10 with treatment PAI-1 4G/5G n = 0.90, Day 14 without treatment PAI-1 4G/5G n = 3.20, Day 14 with treatment PAI-1 4G/5G n = 0.77, Total 4G difference day2/day14 n= 4.977, Total 5G difference day2/day14 n= 1.65 fold.

In our study we confirmed the troglitazone and ciglitazone treatments on differentiated and undifferentiated 3T3 L1 cells. HUVEC cells also used to determine the treatment effects on endogenous PAI-1 expression by western blotting (figure 6). Data showed troglitazone and ciglitazone had similar effects on PAI-1 expression and significantly reduced the PAI-1 level in HUVEC cells (figure 6).



1 2 3 4 5 6 7 8





**Figure 6. (a); 1.adipocytes without treatment, 2. day4 4G/4G, 3. 5G/5G adipocytes, 4. 5G/5G day 7 with 5mM ciglitazone, 5. 4G/4G day 7 with 5 mM troglitazone, 6. 4G/4G day 7 without treatment, 7. 5G/5G day 7 without treatment, 8. 5G/5G day 7 with 7mM ciglitazone, 9. 4G/4G day 7 with 7mM troglitazone, 10. pGL-3basic with 7mM ciglitazone, (b); 1-10. actin confirmation of figure 1.a. (c); 1. pGL-3 basic with 7mM troglitazone, 2. 3T3L1 cells with 7mM ciglitazone, 3. 3T3L1 cells with 5mM troglitazone, 4. , 3. 3T3L1 cells with 5mM ciglitazone, 5. 3T3L1 cells without treatment, 6. adipocytes day 10, 7. HUVEC treated with 7mM ciglitazone, 8. HUVEC treated with 7mM troglitazone (d); confirmation of figure 6 c with actin.**

## Discussion:

The available data on PAI-1 suggest that subtle differences in genetic background and/or experimental model can yield strongly divergent results. It's well known that the development of obesity is strongly dependent on specific genetic background. Elevated plasma PAI-1 level has been associated with insulin resistance and obesity. PAI-1 activity closely correlated with visceral fat accumulation in human subjects (15,16,17,18). These reports suggest that visceral adipose tissue can be an important contributor to the elevated plasma PAI-1 levels observed in obesity. Indeed, adipose tissue produces substantial amounts of PAI-1. Despite the association between increased PAI-1 and obesity, the functional role of PAI-1 in differentiated adipocytes remains to be elucidated. To address this question, in this study we used both PAI-1 deficient primary adipocytes and the preadipocyte 3T3-L1 cell line with neutralizing antibody that inhibits the PAI-1 by an inhibitory anti-PAI-1 antibody in differentiated 3T3-L1 cells recaptured the phenotype of PAI-1 deficiency and suppress the adipocyte differentiation. And in this study, we also investigate the overexpression of PAI-1 in 3T3-L1 cells increasing adipocyte differentiation. Our results clearly indicate that PAI-1 plays an important role in modulation of adipocyte differentiation.

PAI-1 is not the only factor influencing adipogenesis. Human obesity is controlled by many other factors. Adipocyte differentiation is regulated by the coordinated expression of various transcription factors, including PPAR $\gamma$  and C/EBP family. PPAR $\gamma$  is believed to be the master regulator of adipocyte differentiation (19,20,21,22,23).

Both PPAR $\gamma$  and the C/EBP family also play important role in the regulation of insulin sensitivity (24,25). Activation of PPAR $\gamma$  by synthetic and naturally occurring PPAR $\gamma$  activators regulates multiple genes involved in glucose and lipid metabolism, thereby ameliorating insulin resistance and type 2 diabetes (26). Conversely, dominant negative mutations in human PPAR $\gamma$  and adipose-specific PPAR $\gamma$  gene deletion in mice are associated with severe insulin resistance (27,28). To investigate whether the modulating effects of PAI-1 on adipocyte differentiation, another study investigating PPAR $\gamma$  gene pathway and the alterations on PAI-1 gene expression. Furthermore, PAI-1 inhibition resulted decrease in the adipocyte differentiation, it may also associated with downregulation of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and aP2 expression in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Conversely, PAI-1 overexpression in differentiated 3T3-L1 adipocytes increased the adipocyte differentiation, and may also upregulate the PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and aP2 levels. These observations imply that

modulating effects of PAI-1 on adipocyte differentiation may also answer the PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  and p2 pathways.

In this study we also confirmed 4G/5G difference on PAI-1 promoter activity (29). 4G/4G genotype was significantly much more active than 5G/5G genotype with our confirmation with dual-glo luciferase assay. The difference in promoter activation with in 4G/4G and 5G/5G alleles showed us increase promoter activity such as we investigate in 4G/4G allele, PAI-1 expression increased the adipocyte differentiation.

We further conclude that PAI-1 directly modulates adipocyte differentiation and PAI-1 4G/4G promoter polymorphism increase the promoter activity. We postulate that PPAR $\gamma$  may contribute to PAI-1-modulated adipocyte differentiation and insulin sensitivity. Our data suggest that inhibition of PAI-1 might be a novel anti-diabetic treatment.

## REFERENCES

1. Alessi MC, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, and Juhan-Vague I. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* 46: 860-867, 1997.
2. Asplund-Carlson A, Hamsten A, Wiman B, and Carlson LA. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity and VLDL triglyceride concentration, insulin levels and insulin sensitivity: studies in randomly selected normal and hypertriglyceridaemic men. *Diabetologia* 36: 817–825, 1993.
3. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, and O’Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPAR $\gamma$  associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402: 880–883, 1999.
4. Bastard JP, Pieroni L, and Hainque B. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor 1 and insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev* 16: 192–201, 2000.
5. Berry CN, Lunven C, Lechaire I, Girardot C, and O’Connor SE. Antithrombotic activity of a monoclonal antibody inducing the substrate form of plasminogen activator inhibitor type 1 in rat models of venous and arterial thrombosis. *Br J Pharmacol* 125: 29–34, 1998.
6. Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, and Scherer PE. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 145: 367–383, 2004.
7. [Akar N](#), [Akar E](#), [Yilmaz E](#), [Deda G](#). Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish children with cerebral infarct and effect on factor V 1691 A mutation. *J Child Neurol.* ;16(4):294-5, apr. 2001.
8. [Akar N](#), [Yilmaz E](#), [Akar E](#), [Avcu F](#), [Yalcin A](#), [Cin S](#). Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691G-A. *Thromb Res.* 15;97(4):227-30, feb. 2000.

9. Ma LJ, Mao SL, Taylor KL, Kanjanabuch T, Guan Y, Zhang Y, Brown NJ, Swift LL, McGuinness OP, Wasserman DH, Vaughan DE, and Fogo AB. Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Diabetes* 53: 336-346, 2004.
10. Debrock S and Declerck PJ. Neutralization of plasminogen activator inhibitor-1 inhibitory properties: identification of two different mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1337: 257–266, 1997.
11. Lambert V, Munaut C, Noel A, Frankenne F, Bajou K, Gerard R, Carmeliet P, Defresne MP, Foidart JM, and Rakic JM. Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization. *FASEB J* 15: 1021–1027, 2001.
12. [Aktas H](#), [Cai H](#), [Cooper GM](#). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol.* 17(7):3850-7, jul 1997.
13. Deng X, Li H, and Tang YW. Cytokine expression in respiratory syncytial virus-infected mice as measured by quantitative reverse-transcriptase PCR. *J Virol Methods* 107: 141–146, 2003.
14. [Dong J](#), [Fujii S](#), [Li H](#), [Nakabayashi H](#), [Sakai M](#), [Nishi S](#), [Goto D](#), [Furumoto T](#), [Imagawa S](#), [Zaman TA](#), [Kitabatake A](#). Interleukin-6 and mevastatin regulate plasminogen activator inhibitor-1 through CCAAT/enhancer-binding protein-delta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;25(5):1078-84.; May 2005.
15. Cigolini M, Targher G, Seidell JC, Schiavon R, Manara F, Zenti MG, Mattioli C, and De Sandre G. Relationships of plasminogen activator inhibitor-1 to anthropometry, serum insulin, triglycerides and adipose tissue fatty acids in healthy men. *Atherosclerosis* 106: 139–147, 1994.
16. Haffner SM, D'Agostino R Jr, Mykkanen L, Tracy R, Howard B, Rewers M, Selby J, Savage PJ, and Saad MF. Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 22: 562–568, 1999.
17. Landin K, Stigendahl L, Eriksson E, Krotkiewski M, Risberg B, Tengborn L, and Smith U. Abdominal obesity is associated with an impaired fibrinolytic activity and elevated plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism* 39: 1044–1048, 1990.
18. Sawdey MS and Loskutoff DJ. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 88: 1346–1353, 1991.
19. Lin FT and Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8757–8761, 1994.
20. [Liang X](#), [Kanjanabuch T](#), [Mao S](#), [Hao CM](#), [Tang TW](#), [Declerck PJ](#), [Hasty AH](#), [Wasserman DH](#), [Fogo AB](#), [Ma LJ](#). Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005.
21. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, and Spiegelman BM. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 16: 22–26, 2002.
22. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, and Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14: 1293–1307, 2000.
23. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, and Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3: 151–158, 1999.
24. Evans RM, Barish GD, and Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* 10: 355–361, 2004.

25. Kudo M, Sugawara A, Uruno A, Takeuchi K, and Ito S. Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation. *Endocrinology* 145: 4948–4956, 2004.
26. Picard F and Auwerx J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr* 22: 167–197, 2002.
27. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, and O’Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402: 880–883, 1999.
28. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, and Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15712–15717, 2003.
29. FEBS Letters;272:582,2005.