

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**BİFOSFONAT VE STATİNLERİN ÇOK YÖNLÜ
ETKİSİNDE ROR-ALFA TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRÜNÜN OLASI ROLÜ**

ÇAĞRI GÜLEÇ

**DANIŞMAN
PROF. DR. NİHAN ERGİNEL-ÜNALTUNA**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

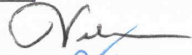
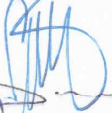
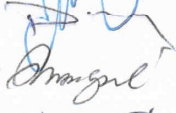
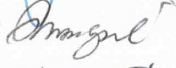
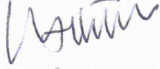
İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı
Doktora Programında Çağrı GÜLEÇ tarafından hazırlanan Bifosfonat ve Statinlerin
Çok Yönlü Etkisinde ROR-Alfa Transkripsiyon Faktörünün Olası Rolü başlıklı Doktora
tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

21 / 06 / 2012

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1. Prof. Dr. Nihan ÜNALTUNA DeneySEL Tıp Araş. Enst. Genetik Anabilim Dalı	
2. Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim D.	
3. Doç. Dr. Duran ÜSTEK DeneySEL Tıp Araş. Enst. Genetik Anabilim Dalı	
4. Prof. Dr. Ahmet GÜL İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim D.	
5. Doç. Dr. Mustafa AKKİPRİK Marmara Üniv. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Çağrı Güleç (İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca verdiği destek ve önerileri için danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Nihan Erginel-Ünaltuna'ya,

Tez izleme komitemde bulunan hocalarım Prof. Dr. Şükrü Öztürk ve Doç. Dr. Duran Üstek'e,

Gösterdikleri anlayış ve destek için DETAE Genetik Anabilim Dalı ve İ.T.F. Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma ve hocalarıma,

Uzm. Bio. Filiz Güçlü-Geyik'e ve hücre kültürü çalışmalarında paylaştığı bilgi ve tecrübeleri için Dr. Bilge Özsait'e

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan Uzm. Bio. Neslihan Çoban'a

Bilimsel önerilerinin yanında, verdikleri moral desteği ile çalışmalarımı tamamlamamda büyük katkıları olan Doç. Dr. Duran Üstek'e, Dr. Sema Sırma-Ekmekçi'ye ve Dr. Neslihan Abacı'ya,

Bu güne gelmemi sağlayan aileme,

teşekkür ederim

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4097

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İİIX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. NÜKLEER RESEPTÖRLER.....	2
2.1.1. Nükleer Reseptör Üst Ailesi.....	2
2.1.2. ROR-Alfa	7
2.2. KOLESTEROL	11
2.2.1. Hücre içi kolesterol metabolizması.....	11
2.2.2. Kolesterolü Hedef Alan İlaçlar	14
2.2.2.1. Statinler.....	14
2.2.2.2. Bifosfonatlar	20
2.3. HEDEF GENLER.....	21
2.3.1. SPP1 (Osteopontin, OPN).....	21
2.3.2. İKBKA /İKKA/CHUK.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Kullanılan Cihazlar	24
3.2. Kimyasallar	25
3.3. Kimyasalların Hazırlanışı	27
3.4. Hedef Gen Seçimi.....	28
3.5. Biyoinformatik Analizler	29
3.6. Besi Yeri Hazırlama.....	29

3.7. Hücre Dizisi.....	29
3.8. Hücre Çözme.....	29
3.9. Hücre Kültürü ve Pasajlama.....	30
3.10. Makrofaj Farklılaşması	30
3.11. İlaç Uygulaması.....	30
3.12. RNA İzolasyonu	33
3.13. cDNA Sentezi.....	33
3.14. Nicel PZR.....	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. SPP1 ve IKBKA Promotorlarında ROR Yanıt Elementleri.....	35
4.2. Monositte ROR-Alfa'nın SPP1 ve IKBKA Promotorlarına Bağlanması.....	35
4.3. <i>ChIP</i> PZR Sonuçlarının <i>ChIP-Array</i> Sonuçları ile Doğrulanması.....	36
4.4. <i>SPP1</i> ve <i>IKBKA</i> Nicel PZR Sonuçları.....	38
4.4.1. Monositte <i>SPP1</i> ve <i>IKBKA</i> Gen Anlatımlarının ROR-Alfa Aktivitesine Bağlı Değişimi	38
4.5. Makrofaj Farklılaşması	38
4.6. Nicel PZR Sonuçları	39
4.6.1. Makrofajda SR1001'in Hedef Gen Anlatımına Etkisi.....	42
4.6.2. Simvastatinin Etkisi	43
4.6.3. Neridronatın Etkisi.....	46
4.6.4. Zaragozik Asidin Etkisi.....	49
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Nükleer reseptör üst ailesinin üyeleri, ligandları ve klinik kullanımları.....	4
Tablo 2-2: Bazı statinlerin farmakokinetik özellikleri	18
Tablo 3-1: <i>ChIP</i> PZR'sinde kullanılan IKBKA ve SPP1 promotor primerleri.....	28
Tablo 4-1: Farklı kültür koşullarında simvastatin, neridronat ve zaragozik asid varlığında hedef gen mRNA düzeylerinin SR1001'den etkilenme yönleri.....	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Nükleer reseptörlerin genel yapısı ve farklı işlevsel bölgeleri	3
Şekil 2-2: ROR ailesinin üç üyesi tarafından kodlanan proteinlerin karşılaştırılması	7
Şekil 2-3 : Farklı dokularda tanımlanan ROR-alfa hedef genleri ve <i>staggerer</i> mutant farelerde gözlenen fenotipik özellikler.	9
Şekil 2-4: ROR-alfa'nın transkripsiyon ve ligand düzeyinde kontrolü.....	10
Şekil 2-5: Dış kaynaklı kolesterolün lizozomdan çıkışı.	13
Şekil 2-6: Statinlerin çok yönlü etkisinde izoprenoidlerin rolü.....	16
Şekil 2-7: Statinlerin kalp-damar hastalıkları için önemli olan çok yönlü etkileri	19
Şekil 3-1: Çalışmanın genel dizaynı.....	32
Şekil 4-1: <i>SPP1</i> ve <i>IKBKA</i> promotorlarına özgü <i>ChIP</i> -PZR sonucu.....	35
Şekil 4-2: <i>ChIP-array</i> sonuçlarına göre <i>IKBKA</i> ve <i>SPP1</i> genlerinin yakınlarında ROR-alfa'nın bağlandığı noktalar.	37
Şekil 4-3: <i>SPP1</i> ve <i>IKBKA</i> gen anlatımlarının SR1001'e bağlı gösterdiği değişim.	38
Şekil 4-4: Monositlerin PMA uygulaması ile makrofajlara farklılaşmaları.....	39
Şekil 4-5: Makrofajda <i>SPP1</i> mRNA düzeyinin nicel-PZR analizi	40
Şekil 4-6: Makrofajda <i>IKBKA</i> mRNA düzeyinin nicel-PZR analizi.....	41
Şekil 4-7: Farklı kültür koşullarında, SR1001'in <i>SPP1</i> ve <i>IKBKA</i> üzerine etkisi	42
Şekil 4-8: Normal kültür koşullarında, simvastatin ve SR1001'in hedef genlere etkisi .43	
Şekil 4-9: LDL'siz koşulda, simvastatin ve SR1001'in hedef genlere etkisi.....	44
Şekil 4-10: HPBCD'li koşulda, simvastatin ve SR1001'in hedef genlere etkisi.....	45
Şekil 4-11: Normal koşullarda, neridronatın ve SR1001'in hedef genlere etkisi.....	46
Şekil 4-12: LDL'siz koşulda, neridronatın ve SR1001'in hedef genlere etkisi.....	47
Şekil 4-13: HPBCD'li koşulda, neridronatın ve SR1001'in hedef genlere etkisi.....	48
Şekil 4-14: Normal koşullarda, zaragozik asid ve SR1001'in hedef genlere etkisi.....	49
Şekil 4-15: LDL'siz koşulda, zaragozik asid ve SR1001'in hedef genlere etkisi.....	50
Şekil 4-16: HPBCD'li koşulda, zaragozik asid ve SR1001'in hedef genlere etkisi	51
Şekil 4-17: Farklı koşullarda hedef gen anlatımlarındaki değişimlerin karşılaştırılması	52
Şekil 5-1: ROR-alfa'nın NF- κ B aktivasyonu üzerindeki zıt yönlü etkisi.	57
Şekil 5-2: Neridronat ve zaragozik asid varlığında SR1001'in hedef gen aktivasyonunu tetiklemesinin olası mekanizması.	59

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ChIP: Kromatin immünopresipitasyon (*Chromatin Immunoprecipitation*)

CHUK: *Conserved Helix-loop-helix Ubiquitous Kinase*

ER: Endoplazmik retikulum

FPP: Farnesil pirofosfat

GGPP: Geranilgeranil pirofosfat

HMG-KoA: Hidroksi metil glutaril koenzim A

HMGCR: HMG-KoA Redüktaz (HMG-KoAR)

HPBCD: Hidroksi propil beta siklodekstrin (*2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin*)

IKB: Kappa B (NF- κ B) inhibitörü (*Inhibitor of kapa B*)

IKK (IKBK): Kappa B inhibitör kinazı (*Inhibitor of kapa B kinase*)

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein (*Low Density Lipoprotein*)

LDLR: LDL Reseptörü

Ner: Neridronat

NF- κ B: Nükleer faktör kapa B

NPC: Tip C Niemann-Pick Hastalığı (*Niemann-Pick disease type C*)

OPN: Osteopontin

ROR: Retinoik asid reseptörü ilişkili öksüz reseptör (*Retinoic acid receptor related Orphan Receptor*)

RORE: ROR yanıt elementi (*ROR Response Element*)

SCAP: SREBP bölünmesini uyaran protein (*SREBP Cleavage Activating Protein*)

Sim: Simvastatin

SPP1: Salgısal fosfoprotein 1 (*Secreted phosphoprotein 1*)

SR: SR1001

SREBP: Sterol yanıt elementi bağlayıcı protein (*Sterol Response Element Binding Protein*)

ZA: Zaragozik asid

ÖZET

Güleç, Ç. (2012). Bifosfonat ve Statinlerin Çok Yönlü Etkisinde ROR-Alfa Transkripsiyon Faktörünün Olası Rolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Mevalonat yolağını baskılayarak kolesterol sentezini ve LDL düzeyini düşüren, bu nedenle de koroner kalp hastalıklarının tedavisi veya önlenmesinde yaygın olarak kullanılan statin grubu ilaçların, LDL'den bağımsız etkileri de olduğu bilinmektedir. “Çok yönlü etkiler” olarak tanımlanan bu etkilerin benzeri, mevalonat yolağını hedef alan fakat kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılan bifosfonat grubu ilaçlarda da gözlenmektedir. Her iki ilaç grubunda gözlenen çok yönlü etkiler, mevalonat yolağının ara ürünleri olan izoprenoidlerin azalması ile açıklanmaktadır.

Statin ve bifosfonatların çok yönlü etkileri izoprenoidlerle rahatlıkla açıklanabilse de, mevalonat yolağının son ürünü olan kolesterolün hücre içi düzeyindeki değişimin bu süreçteki rolü henüz dışlanmamıştır. Bu nedenle tez çalışmasında, her iki ilacın çok yönlü etkisinde, hücre içi kolesterol düzeyinin olası rolü ele alındı. Bu amaçla, aktivitesi hücre içi kolesterol düzeyine duyarlı bir transkripsiyon faktörü olan ROR-alfa ele alınarak, bu transkripsiyon faktörünün iki hedef geni incelendi.

Kromatin immünopresipitasyon ile ROR-alfa'nın hedef genleri olduğu gösterilen *SPP1* ve *IKBKA*'nın simvastatin (statin) ve neridronat (bifosfonat) varlığında kültüre edilen THP-1 makrofajlarındaki gen anlatım düzeyleri ölçüldü. Simvastatin ve neridronatın gen anlatımı üzerindeki etkileri, yapay ROR-alfa ligandı SR1001 varlığında ve/veya kolesterol yokluğunda karşılaştırılarak, ROR-alfa aktivitesi ve kolesterol varlığının etkisi incelendi.

Sonuçlarımız, mevalonat yolağını hedef alan ilaçların çok yönlü etkisinde ROR-alfa'nın kolesterole bağlı ve kolesterolden bağımsız olmak üzere iki farklı şekilde rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca, yapay ROR-alfa ligandı SR1001'in kolesterol varlığında antagonist, kolesterol yokluğunda agonist etki gösterdiği de anlaşılmıştır. Farklı hücre tiplerinde tanımlanacak olan farklı ROR-alfa hedef genlerinin de benzer şekilde incelenmesi veya *Ror-alfa* mutant hayvan modellerinde yapılacak deneyler, statin ve bifosfonatların çok yönlü etkisinde ROR-alfa'nın oynadığı rolün klinik olarak anlamlı olup olmadığını gösterecektir.

Anahtar Kelimeler: ROR-alfa, nükleer resptör, kolesterol, simvastatin, neridronat

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4097

ABSTRACT

Gulec, C. (2012). Possible Role of ROR-alpha Transcription Factor on Pleiotropic Effects of Biphosphonats and Statins. Istanbul University, Institute of Health Science, Depatment of Genetics. Doctoral Thesis. Istanbul.

Statins, which decrease LDL-cholesterol level by inhibiting mevalonat pathway and cholesterol synthesis, are widely used for treatment or prevention of atherosclerotic coronary heart disease. Statins also have other effects independent of LDL-cholesterol synthesis, and they are known as “pleiotropic effects”. Similar pleiotropic effects are observed in biphosphonates as well, which target the mevalonate pathway and are used for the treatment of osteoporosis. Those pleiotropic effects of both drugs are usually explained by the decrease of isoprenoids, derivatives of mevalonate pathway, although the role of cholesterol, the end product of mevalonate pathway, in this process has not been excluded yet.

In this thesis study, possible role of intracellular cholesterol level on the pleiotropic effects of both drugs was investigated. For the analysis of cholesterol effects, the transcription factor ROR-alpha, activity of which is controlled by intracellular cholesterol level, was used, and its effects on two target genes, *SPP1* and *IKBKA*, were determined.

Expression levels of *SPP1* and *IKBKA* were measured in THP-1 macrophages, cultured in the presence of simvastatin (a statin drug) and neridronate (a biphosphonate drug). Effects of ROR-alpha activity and cholesterol were investigated, by comparing the effects of simvastatin and neridronate on gene expressions in the presence or absence of synthetic ROR-alpha ligand SR1001 and/or cholesterol.

Our results show that ROR-alpha may play both cholesterol-dependent and cholesterol-independent roles in the pleiotropic effects of the drugs, which target mevalonate pathway. In addition, it has also been observed that synthetic ROR-alpha ligand SR1001 acts as antagonist in the presence of cholesterol and as agonist in the absence of cholesterol. Investigation of other ROR-alpha target genes, which are to be identified in various cell types, or the experiments, which are performed in ROR-alpha mutant animal models, are expected to elucidate whether the role of ROR-alpha on pleiotropic effects of statins and biphosphonates have a clinical importance or not.

Key Words: ROR-alpha, nuclear receptor, cholesterol, simvastatin, neridronate

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 4097

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter hastalıkları için en önemli risk faktörlerinden biri kabul edilen kan LDL düzeyi, yaygın olarak kullanılan statin grubu ilaçlarla düşürülebilmektedir. Kolesterol sentezini, ilk basamağındaki HMG-KoA redüktaz enzimini baskılayarak düşüren statinlerin, LDL'yi düşürme etkisinden bağımsız başka etkileri de olduğu bilinmektedir. Statinlerin çok yönlü etkisi olarak tanımlanan bu etkilerin, kolesterol ile aynı biyokimyasal yoldan sentezlenen ve steroid yapıda olmayan izoprenoidlerin işlevlerinden kaynaklandığı kabul edilmektedir. Kolesterol sentezini farklı bir noktada baskılayan ve osteoporoz ve Paget hastalığı gibi kemik hastalıklarının tedavisinde sık kullanılan bifosfonat grubu ilaçlarda da benzer etkilerin gözlenmesi, izoprenoid adı verilen bu lipidlerin rolünü doğrulamaktadır.

Statin ve bifosfonatların izoprenoid düzeyini değiştirerek neden oldukları sonuçlar iyi araştırılmış olmasına rağmen, hücre içi kolesterol düzeyi üzerindeki etkileri ve bunun sonuçları yeterince araştırılmamıştır.

Hücre içi kolesterolü ligand olarak bağladığı gösterilen ROR-alfa transkripsiyon faktörü, ligand bağlanması ile aktifleşen ve hedef genleri aracılığıyla metabolizma ve biyolojik saatin düzenlenmesine katılan bir nükleer reseptördür. ROR-alfa'nın doğal ligandlarından olan hücre içi serbest kolesterolün, statin veya bifosfonat kullanımına bağlı olarak değişebileceğini ve bu değişimin de ROR-alfa aktivasyonunu ve hedef genlerinin anlatımlarını etkileyebileceğini varsaydık. Bu olası değişimlerin, statin ve bifosfonatların çok yönlü etkisinde rol oynayabileceklerini düşünerek, izoprenoidlerden bağımsız, kolesterol ve ROR-alfa'ya bağlı alternatif bir mekanzimanın varlığını test etmeyi amaçladık.

Statin ve bifosfonatların, çoğunlukla faydalı olduğu kabul edilen çok yönlü etkilerinde ROR-alfa'nın rol oynadığının gösterilmesi, ligand aracılığıyla kontrol edilebilir bir transkripsiyon faktörü olması nedeniyle klinik önem taşıyabilir.

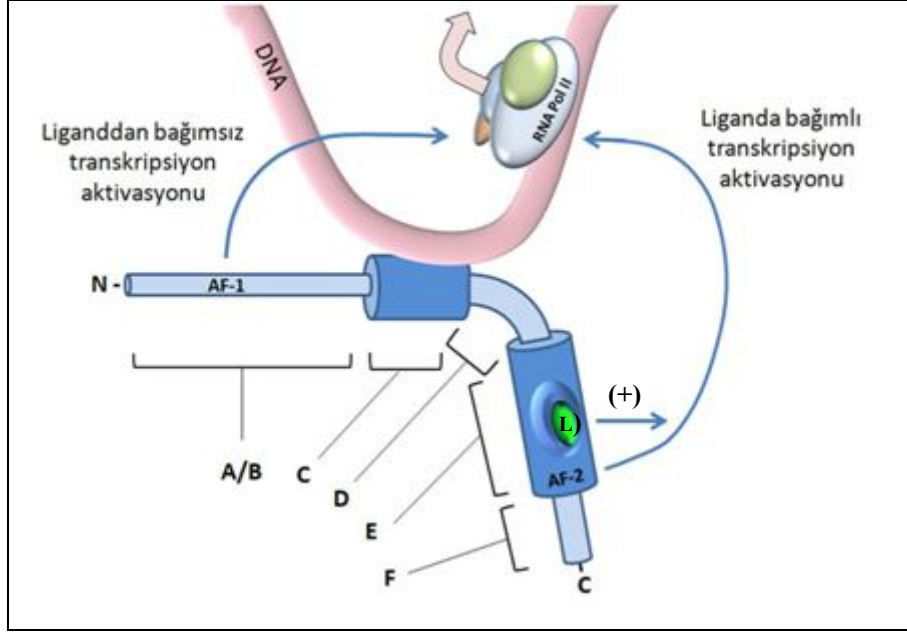
2. GENEL BİLGİLER

2.1. NÜKLEER RESEPTÖRLER

2.1.1. Nükleer Reseptör Üst Ailesi

Transkripsiyon faktörlerinin “Nükleer Reseptör” üst ailesi, ligand bağlanması ile etkinleşen transkripsiyon faktörlerini kapsamaktadır. Nükleer Hormon Reseptörü olarak da bilinen bu transkripsiyon faktörleri, diğer transkripsiyon faktörlerinden farklı olarak, DNA’ya bağlanmak ya da bağlandıktan sonra transkripsiyonu başlatmak için “ligand” adı verilen bir moleküle gereksinim duyarlar. Genellikle hücre dışı kaynaklı olan bu ligandlar arasında en çok bilinenleri steroid ve tiroid hormonlarıdır. Östrojen, progesteron, glukokortikoid ve tiroid hormonu gibi hormonların her biri için östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), glukokortikoid reseptörü (GR) ve tiroid hormon reseptörü (TR) gibi özgül birer reseptör bulunur ve ilgili hormonun bağlanması ile bu reseptörler transkripsiyon faktörü etkinliği kazanır. Steroid ve tiroid hormonlarının yanında, A vitamini kökenli retinoik asidi tanıyan retinoik asid reseptörleri (RAR) ve D vitamini tanıyan vitamin D reseptörü (VDR) de nükleer reseptör üst ailesinin üyelerindedir. Bu nedenle nükleer reseptörler, steroid/tiroid/retinoid reseptörler olarak da adlandırılır (Evans R.M ve ark. 1988; Evans R. ve ark. 2005).

Yapısal olarak nükleer reseptörler, 5 farklı bölgeden oluşur (Şekil 2-1). Proteinin amino (N-) ucundan karboksi (C-) ucuna doğru bu bölgeler; A/B bölgesi, C bölgesi, D bölgesi, E bölgesi ve F bölgesi olarak tanımlanır. A/B bölgesi, nükleer reseptörler arasında en değişkenlik gösteren bölgedir. Bu bölgede yer alan AF-1, reseptörün ligandan bağımsız transkripsiyon aktivasyon işlevinden sorumludur. En iyi korunmuş bölge olan C bölgesi, reseptörün DNA’ya bağlanmasını sağlayan iki adet çinko-parmak motifi içerir. Reseptörün DNA dizi seçiciliği bu bölge aracılığıyla sağlanır. C ve E bölgeleri arasında yer alan ve bağlayıcı görevi gören D bölgesi, reseptör esnekliğinden sorumludur. E bölgesi, reseptörün ligand bağlama, dimerizasyon ve protein-protein etkileşimlerinden sorumludur. Reseptörün liganda bağımlı transkripsiyon aktivasyonundan sorumlu olan AF-2 bölgesi de burada yer alır. F bölgesinin işlevi ise net olarak bilinmemektedir (Bulyenko YA ve O'Malley BW 2010; Bain, DL ve ark. 2007; Carson-Jurica, MA ve ark. 1990).



Şekil 2-1: Nükleer reseptörlerin genel yapısı ve farklı işlevsel bölgeleri. AF-1: ligandan bağımsız transkripsiyon aktivasyon bölgesi, C: DNA bağlama bölgesi, D: Bağlayıcı bölge, E: Ligand bağlama bölgesi, AF-2: Liganda (L) bağlı transkripsiyon aktivasyon bölgesi

Nükleer reseptörlerin DNA bağlama bölgeleri ve ligand bağlama bölgeleri, sırasıyla reseptörün genomik ve liganda bağlı etkisinden sorumludur. Ancak, bazı nükleer reseptörlerin non-genomik ve ligandan bağımsız etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Ayrıca nükleer reseptörlerin genomik etkileri de gen aktivasyonu, gen represyonu, gen represyonunun kaldırılması veya gen transrepresyonu gibi çeşitlilik gösterebilir (Ordóñez-Morán P ve ark.2009). İşlevsel çeşitliliğinin yanında, diğer sinyal yollarının da etkisi altında kalmaları ve çok çeşitli düzenleyici proteinler ile etkileşim halinde olmaları, nükleer reseptörleri karmaşık hale getirmekte ve anlaşılmasını güçleştirmektedir.

İnsan genomunda 48 üyesi bulunan nükleer reseptör üst ailesi, steroid hormon reseptörleri ve lipofilik vitamin reseptörleri dışında, ligandı tanımlanmamış olan reseptörleri de içermektedir. Ligandı başlangıçta bilinmediği için bu reseptörler genel olarak öksüz (*orphan*) reseptörler olarak adlandırılmışlardır (Germain P ve ark. 2006; Giguere V ve ark. 1999). Aktiviteleri ligand aracılığıyla kontrol edilebildikleri için nükleer reseptörler, farmakolojik olarak kolay hedeflerdir. Bu nedenle nükleer reseptörler için geliştirilen yapay ligandların birçok klinik kullanım alanı bulunmakta (Tablo 2-1) ve gelecekte yeni yapay ligandların eklenmesiyle artacağı düşünülmektedir.

Tablo 2-1: Nükleer reseptör üst ailesinin üyeleri, ligandları ve klinik kullanımları (Germain P ve ark. 2006)

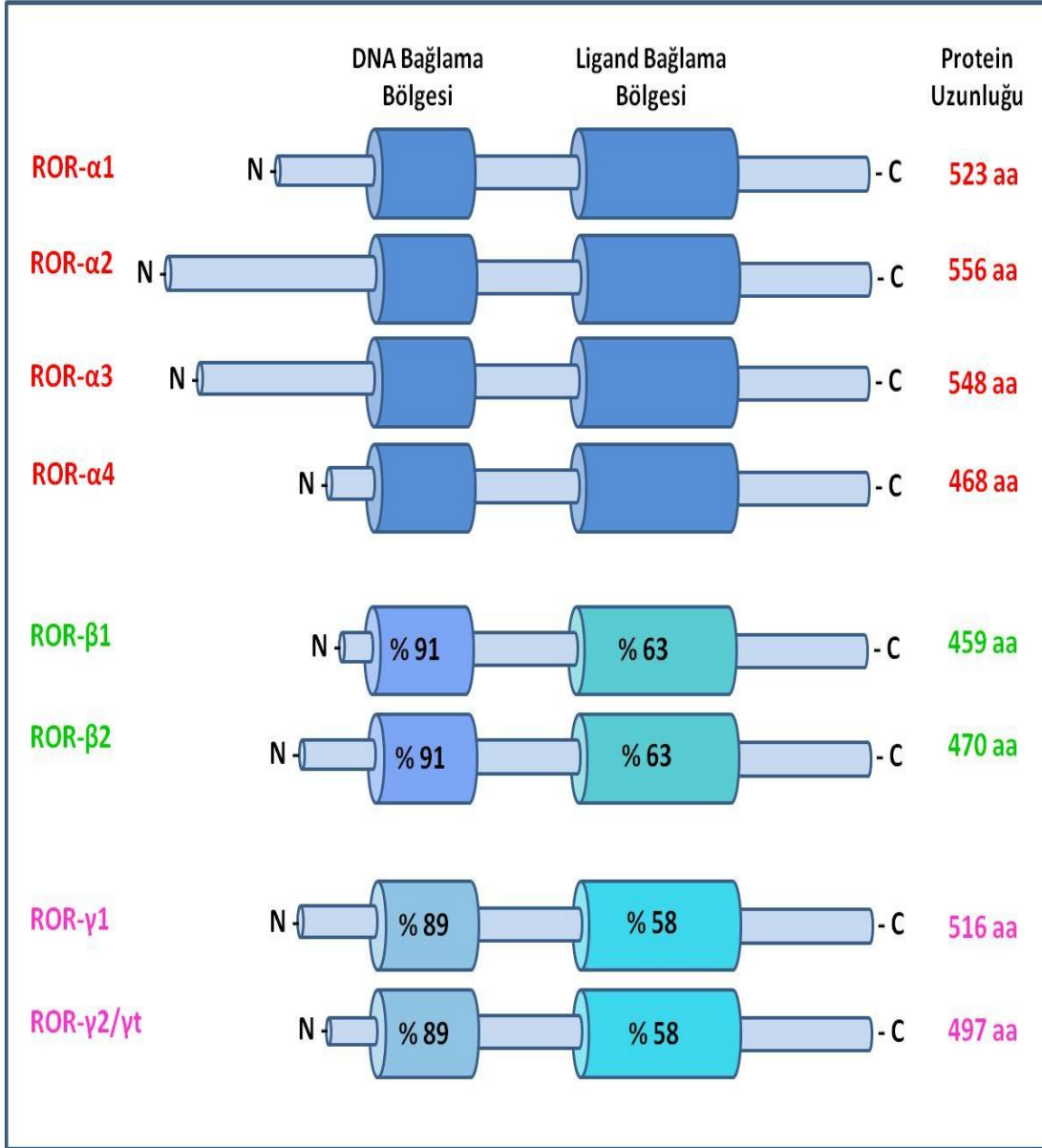
Nükleer Reseptör	Doğal Ligand	Yapay Ligand	Yapay Ligandın Tıbbi Kullanım Alanı
TR α	Tiroid hormonları		
TR β	Tiroid hormonları		
RAR α	Retinoik asit	ATRA (<i>All Trans Retinoic Acid</i>)	Akut promiyelositik lösemi (APML)
RAR β	Retinoik asit		
RAR γ	Retinoik asit		
PPAR α	Yağ asitleri, lökotrien B	Fibratlar	Hiperkolesterolemi
PPAR β	Yağ asitleri		
PPAR γ	Yağ asitleri, prostaglandin J2	Tiazolidindion	Tip 2 diyabet
Rev-erba	?		
Rev-erb β	?		
ROR α	Kolesterol, kolesterol sülfat, melatonin	CGP52608, SR1001	
ROR β	Retinoik asit		
ROR γ	?		
LXR α	Oksisteroller	T0901317, GW3965	
LXR β	Oksisteroller	T0901317, GW3965	
FXR α	Safra asitleri		
VDR	Vitamin D, 1,25-dihidrovitamin D3		
PXR	Ksenobiyotikler		
CAR	Ksenobiyotikler	Fenobarbital	Konvüziyon
HNF4 α	?		
HNF4 γ	?		
RXR α	Retinoik asit		
RXR β	Retinoik asit		
RXR γ	Retinoik asit		

Tablo 2-1: Nükleer reseptör üst ailesinin üyeleri, ligandları ve klinik kullanımları (Germain P ve ark. 2006) (Devam)

Nükleer Reseptör	Doğal Ligand	Yapay Ligand	Yapay Ligandın Tıbbi Kullanım Alanı
TR2	?		
TR4	?		
TLL	?		
PNR	?		
COUP-TFI	?		
COUP-TFII	?		
EAR2	?		
ER α	Östradiol-17 β	Tamoksifen, relokksifen	Göğüs kanseri
ER β	Östradiol-17 β		
ERR α	?		
ERR β	DES	4-OH tamoksifen	
ERRY	DES	4-OH tamoksifen	
GR	Kortizol	Deksametazon, RU486	İltihabi hastalıklar
MR	Aldosteron	Spirolactone	
PR	Progesteron	Medroksiprogesteron asetat, RU486	Doğum kontrolü, hormon replasman tedavisi
AR	Testosteron	Flutamid	Prostat kanseri
NGFI-B	?		
NURR1	?		
NOR1	?		
SF1	?		
LRH-1	?		
GCNF	?		
DAX-1	?		
SHP	?		

Nükleer reseptörlerin ROR ailesi, retinoik asidi tanıyan retinoik asid reseptörleri (RAR'lar) ile yapısal benzerliği nedeniyle retinoik asid reseptörü ilişkili öksüz reseptör (*Retinoc Acid Receptor related Orphan Receptor-ROR*) olarak adlandırılan üç üyeden oluşur. Her biri farklı bir gen tarafından kodlanan ROR-alfa (NR1F1), ROR-beta (NR1F2) ve ROR-gama'nın (NR1F3) farklı dokularda dağılım göstermesi, görevlerinin de farklı olduğunu göstermektedir. Karaciğer, timus, deri, iskelet kası, beyincik, böbrek ve akciğer gibi geniş bir doku dağılımı gösteren ROR-alfa, bu dokularda metabolizmanın düzenlenmesi ve biyolojik saatin kontrolünde görev alır. Hipofiz bezi ve retina gibi dokularda yüksek olmak üzere, merkezi sinir sistemi ile sınırlı bir dağılım gösteren ROR-beta'nın, merkezi biyolojik saatin düzenlenmesinde rol oynadığı, timus ve lenfoid dokularda yüksek gen anlatımına sahip olan ROR-gama'nın ise bağışıklık sisteminde görev aldığı düşünülmektedir (Jetten AM ve ark. 2006; 2009; Schaeren-Wiemers N ve ark. 1997; Kurebayashi S ve ark. 2000).

Ligand bağlama bölgeleri, aralarında farklılık gösteren ROR transkripsiyon faktörlerinin DNA bağlanma bölgeleri ise daha iyi korunmuştur. Her bir ROR geninin kodladığı farklı izoformlar arasında da amino (N-) uzantıları açısından farklılık vardır (Solt LA ve ark. 2010) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: ROR ailesinin üç üyesi (alfa, beta ve gama) tarafından kodlanan proteinlerin karşılaştırılması (Solt LA ve ark.2010). DNA bağlama ve ligand bağlama bölgelerinin ROR-alfa ile dizi benzerlikleri yüzde olarak gösterilmiştir.

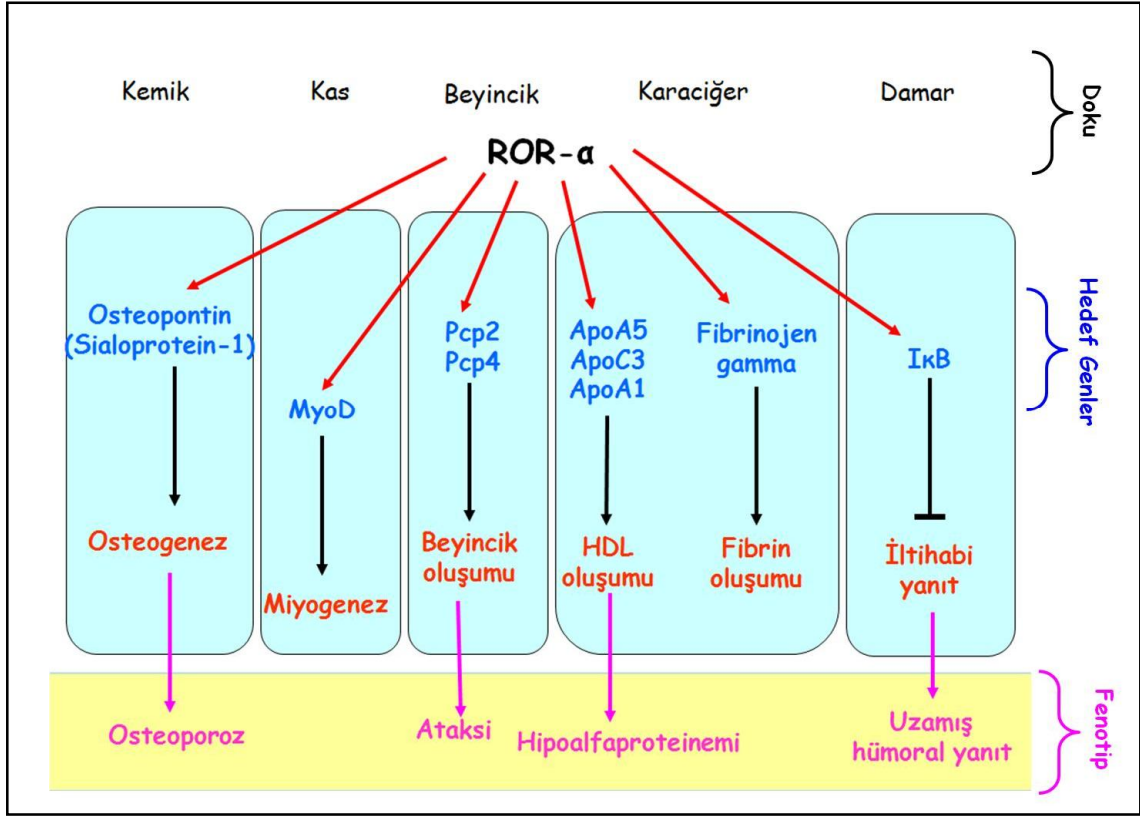
2.1.2. ROR-Alfa

15. kromozomda 17 kb uzunluğunda bir bölgeyi kaplayan *ROR-alfa* geni, 15 ekzondan oluşur ve alternatif kırılma ve promotor kullanımı ile 4 farklı transkript üretir. Bu transkriptler, amino (N-) ucundaki A/B bölgeleri farklılık gösteren 4 protein kodlar.

Dört farklı ROR-alfa izoformundan ROR-alfa1 ve ROR-alfa4 yaygın doku dağılım gösterirken ROR-alfa2 genellikle immün hücrelerle, ROR-alfa3 ise testis ile sınırlı bir doku dağılımı gösterir (Solt LA ve ark. 2010).

ROR-alfa, diğer nükleer reseptörler gibi C bölgesi aracılığıyla DNA'ya bağlanır. ROR-alfa'nın C bölgesi, reseptörün DNA üzerindeki AT'ce zengin 6 bazlık bölgeye komşu AGGTCA dizisine (WWAWNAGGTCA) monomer olarak bağlanmasını sağlar. ROR yanıt elementi (**ROR Response Element**, RORE) olarak tanımlanan bu diziler aracılığıyla hedef genlerini tanıyan ROR-alfa, etkileştiği düzenleyici proteinler aracılığıyla da transkripsiyonun başlamasını tetikler (Solt LA ve ark.2010; Carlberg ve ark.1994).

ROR-alfa'nın işlevinin anlaşılması, ataksi ve hipotoni özelliği gösteren *staggerer* fare soyunun doğal *Ror-alfa* mutasyonu (*Ror-α^{-/-}*) taşıdığıının anlaşılmasıyla hız kazanmıştır (Hamilton BA ve ark. 1996). *Staggerer* mutant farelerde ataksin yanında, osteoporoz, dislipidemi, uzamış hümoral yanıt ve ateroskleroza yatkınlık gibi fenotipik özellikler de bulunmaktadır. Farklı dokularda, anlatımları Ror-alfa tarafından düzenlenen hedef genlerin tanımlanmasıyla, *staggerer* farelerindeki bulgular açıklanabilmiştir (Şekil 2-3). ROR-alfa'nın beyincikte *Itpr1*, *Pcp4*, ve *Pcp2* hedef genleri aracılığıyla Purkinje hücre gelişimini düzenlediği, *Spp1* (osteopontin) geni aracılığıyla kemik yapılanmasını, *MyoD* geni aracılığıyla kas gelişimini kontrol ettiği, karaciğerde *ApoA1*, *ApoC3* ve *ApoA5* genleri aracılığıyla lipoprotein metabolizmasında, damar düz kas hücrelerinde *Ikba* geni aracılığıyla da iltihabi yanıtın baskılanmasında rol oynadığı anlaşılmıştır (Boukhtouche F ve ark. 2006; Hamilton BA ve ark. 1996; Lau P ve ark. 1999; Vu-Dac N ve ark. 1997; Raspe E ve ark. 2001; Lind U ve ark. 2005; Delerive P ve ark. 2001). ROR-alfa'nın *C/EBP beta* ve *perilipin* genleri aracılığıyla adiposit gelişimini düzenlediğinin anlaşılması ve *ROR-alfa* genini etkileyen dengeli bir t(4;15) translokasyonun ağır obeziteye neden olduğunun gösterilmesi, obezite gelişiminde de ROR-alfa'nın önemli olabileceğini düşündürmüştür (Ohoka N ve ark. 2009; Lau P ve ark. 2008; Klar J ve ark. 2005).

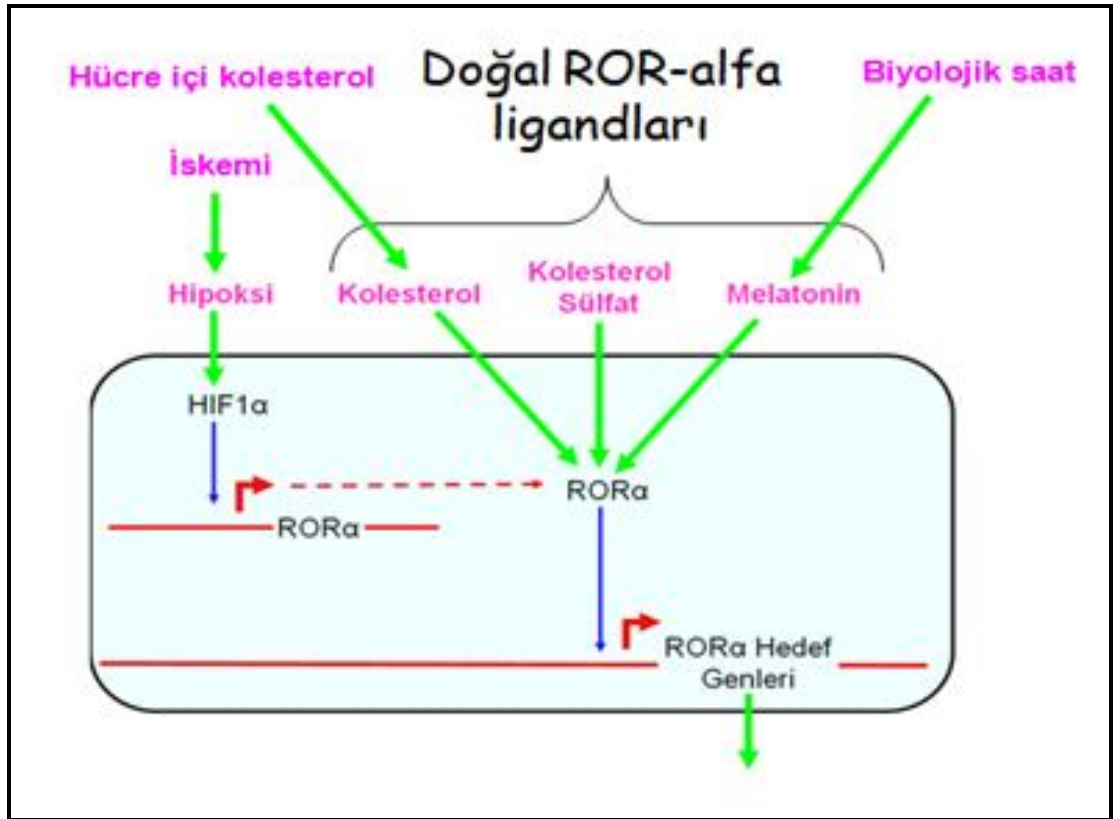


Şekil 2-3 : Farklı dokularda tanımlanan ROR-alfa hedef genleri ve *staggerer* mutant farelerde gözlenen fenotipik özellikler.

Diğer nükleer reseptörler gibi, ROR-alfa da transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmaların kontrolü altındadır. Transkripsiyonel düzeyde ROR-alfa'yı kontrol ettiği bilinen en önemli transkripsiyon faktörü HIF1-alfa'dır. Hücrenin hipoksik koşullara uyum sağlamasında temel düzenleyici olan HIF1-alfa, promotörüne bağlandığı *ROR-alfa* geninin anlatımını yükseltir. HIF1-alfa ve ROR-alfa arasındaki bu ilişkinin karşılıklı olduğu ve protein düzeyinde ROR-alfa'nın da HIF1-alfa'ya bağlanarak kararlılığını artırdığı gösterilmiştir (Chauvet C ve ark. 2004; Kim EJ ve ark. 2008).

ROR-alfa'nın transkripsiyon aktivitesi ise, diğer nükleer reseptörlerde olduğu gibi ligandlar ve etkileştiği düzenleyici proteinler aracılığıyla kontrol edilir. Başlangıçta ligandı bilinmediği için öksüz reseptörler grubuna uygun olarak adlandırılan ROR transkripsiyon faktörlerinin bazı molekülleri ligand olarak bağladığı anlaşılmıştır. ROR-alfa'nın da melatonin hormonu, kolesterol ve bazı kolesterol türevlerini ligand olarak bağladığı gösterilmiştir (Şekil 2-4). Melatoninin membran yerleşimli reseptörleri (MT1

ve MT2) dışında nükleer yerleşimli reseptör olarak ROR-alfa aracılığıyla da etki gösterdiği ve günlük döngüye bağlı biyolojik saatin düzenlenmesinde ROR-alfa'nın da kilit rol oynadığı anlaşılmıştır (Kallen JA ve ark.2002; Schlaeppli J ve ark. 2002; Kallen J ve ark. 2004; Wang Y ve ark. 2010; Becker-Andre M ve ark. 1994).



Şekil 2-4: ROR-alfa'nın transkripsiyon ve ligand düzeyinde kontrolü

ROR-alfa ligandları arasında kolesterolün de bulunması, ROR-alfa'nın transkripsiyonel aktivitesinin hücre içi kolesterol düzeyine bağlı değişebileceğini düşündürmüştür. ROR-alfa ligand bağlama bölgesine bağlandığı gösterilen serbest kolesterolün, reseptörde biçimsel değişikliğe yol açtığı, böylece düzenleyici proteinlerin bağlanmasını kolaylaştırarak transkripsiyon aktivasyonunu başlattığı tahmin edilmektedir. Fizyolojik koşullarda ROR-alfa'ya bağlanan serbest kolesterolün kaynağı ve ROR-alfa'ya nerede bağlandığı ise bilinmemektedir.

2.2. KOLESTEROL

Kolesterol, yapısal ve işlevsel olarak yaşamsal öneme sahip bir yağ molekülüdür. Hücre ve organel zarlarının biyofiziksel özelliklerinin belirlenmesi ve zar bütünlüğünün devamlılığı için gereken kolesterol, steroid hormonların da öncül maddesini oluşturur.

Büyük ölçüde hidrofobik yapıdan oluşan kolesterol molekülü, 2 karbonlu asetil KoA'dan 37 basamaklı, uzun ve karmaşık bir enzimatik yol ile sentezlenir. Hücrenin bu yolla sentezlediği iç kaynaklı kolesterol, hücrelerin kolesterol gereksinimini karşılamada genellikle yeterli olmadığı için, hücre dışarıdan da kolesterol almak zorunda kalır. Bu dış kaynaklı kolesterol ise, esterleşmiş olarak taşındıkları kandaki düşük yoğunluklu lipoproteinlerden (LDL) sağlanır. Hücrenin LDL reseptörü aracılığıyla kandan aldığı LDL'de bulunan dış kaynaklı kolesterol, karaciğerin kendi sentezlediği veya besin yolu ile dışarıdan aldığı kolesteroldür.

Kolesterol, hücre için yaşamsal bir öneme sahip olmakla birlikte, fazlası da hücrede toksik etki gösterir. Bu nedenle hücre, fazla olan kolesterolü kanda bulunan yüksek yoğunluklu lipoproteinlere (HDL) aktararak bu toksik etkisinden kendini korur. HDL ise, dokulardan topladığı fazla kolesterolü karaciğere geri taşır.

Kolesterolün kanda şilomikron, VLDL (çok düşük yoğunluklu lipoprotein), LDL ve HDL gibi lipoproteinler aracılığıyla bağırsak, karaciğer ve diğer dokular arasındaki taşınma mekanizması oldukça araştırılmış ve göreceli olarak iyi bilinen bir konudur. Ancak, kolesterolün hücreye alınmasından sonra izlediği yol, hücre içindeki dağılımı ve bu dağılımın düzenlenme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır.

2.2.1. Hücre içi kolesterol metabolizması

Büyük ölçüde hidrofobik bir yapıda olan kolesterol, fosfolipid, sfingolipid ve kolesteril ester gibi diğer amfipatik/hidrofobik moleküllere oranla küçük bir molekül olduğu için, hücre içinde daha kolay ve serbest hareket yeteneğine sahiptir. Amfipatik ortamlara yerleşme eğilimi olan kolesterol, özellikle fosfolipidlerin oluşturduğu hücre zarları tercih eder. Kolesterol, fosfolipid içeriği ve niteliğine bağlı olarak içinde bulunduğu zardan pasif ya da aktif mekanizmalarla ayrılabilir. Bu hareket serbestisine rağmen, kolesterolün hücre içi dağılımına bakıldığında eşit dağılım göstermediği, bazı zarlarda daha yüksek oranda bulunduğu görülür. Bu da kolesterolün

hücre içi dağılımının kontrol altında tutulduğunu göstermektedir (Mesmin B ve Maxfield FR. 2009).

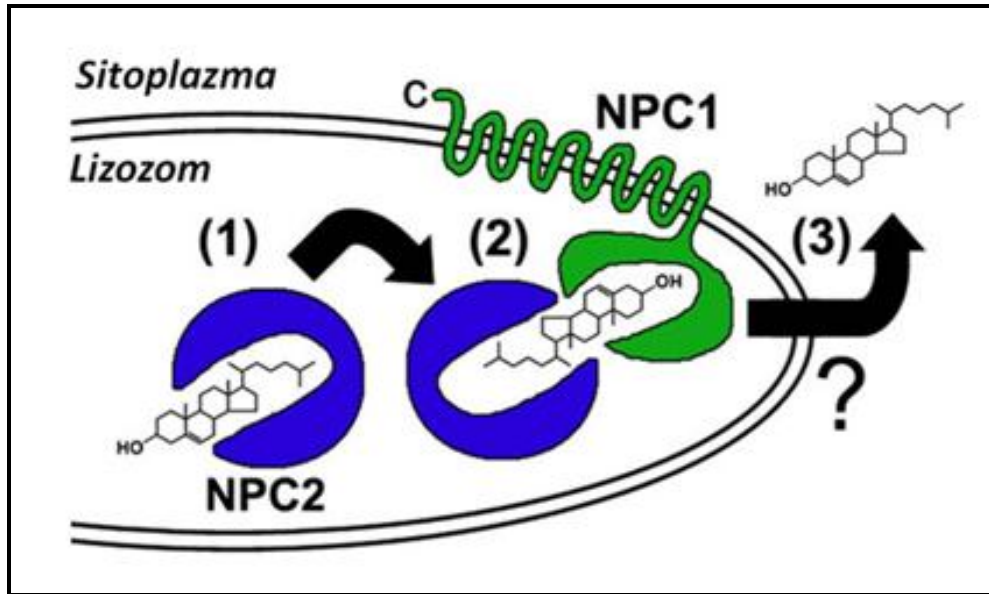
Hücre içi kolesterolün büyük kısmı plazma zarında, bir kısmı Golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum (ER) gibi organellerin zarında, bir kısmı da taşıyıcı proteinlere bağlı bulunur. Suda çözünürlüğü az olduğu için serbest olarak bulunan kolesterol düzeyi düşüktür. Kolesterolün organeller arasında veziküler yolla veya STARD (*StAR related lipid transfer Domain containing*), OSBP (*Oxysterol Binding Protein*) gibi taşıyıcı protein aracılığıyla, doğrudan fiziksel temas veya serbest geçiş yoluyla yer değiştirebildiği bilinmektedir (Mesmin B ve Maxfield FR 2009; Lange Y ve Steck TL 2008; Alpy F ve Tomasetto C 2005; Lehto M ve Olkkonen VM. 2003).

Kolesterolün dağılım gösterdiği hücre zarları arasında ER zarı, hücre içi kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücrenin kolesterol metabolizmasının temel düzenleyici transkripsiyon faktörü olan SREBP ve kolesterol sentezinin düzenleyici enzimi olan HMG-KoA redüktaz, ER zarı üzerinde bulunur. Her iki proteinin de işlevi, dolaylı olarak ER zarındaki kolesterol oranı tarafından kontrol edilir (Radhakrishnan A ve ark. 2008).

Transmembran bir protein olarak sentezlenen SREBP, ER zarı üzerinde diğer bir transmembran protein olan SCAP ile etkileşim halinde bulunur. Bu iki proteinin veziküler yolla ER'den ayrılmaları, ER zarındaki başka bir transmembran protein olan Insig tarafından engellenir. Insig-SCAP-SREBP etkileşiminin devamlılığı ise ER zarının kolesterol oranına bağlıdır. ER zarındaki kolesterol, zarındaki toplam lipidin % 5'inden fazla olduğu sürece Insig-SCAP-SREBP bütünlüğü korunur ve SREBP'nin ER'den ayrılması Insig tarafından engellenir. Kolesterol oranı % 5'in altına düştüğünde ise Insig, SCAP ve SREBP'yi bırakır. Serbest kalan SCAP-SREBP kompleksi, veziküler yolla ER'den ayrılır ve Golgi aygıtına taşınır. SREBP'nin sitoplazmaya uzanan amino ucundaki HLH (*Helix-Loop-Helix*) içeren bölgesi, Golgi aygıtında proteolitik kesilme ile serbest kalır ve çekirdeğe girerek hedef genlerin promotoruna bağlanır. SREBP'nin, promotoruna bağlanarak transkripsiyonunu başlattığı iki önemli gen vardır. Bunlardan *LDLR* geni, hücre zarına yerleşerek dış kaynaklı kolesterol alınımını sağlayan LDL reseptörünü kodlar. *HMGCR* geni ise ER zarına yerleşerek iç kaynaklı kolesterol sentezini başlatan HMG-KoA redüktaz (HMG-KoAR) enzimini kodlar. *LDLR* ve *HMG-KoAR*'nin yol açtığı kolesterol artışı, ER zarındaki kolesterol

oranının da yükselmesine neden olur. Kolesterol oranı % 5'in üzerine çıktığında, Insig tekrar SCAP-SREBP ile kompleks oluşturarak SREBP'nin ER'den ayrılmasını, dolayısıyla *HMGCR* ve *LDLR* gen transkripsiyonunun sürekliliğini önler. ER zarında oranı yükselen kolesterol, yalnız Insig-SCAP-SREBP etkileşimini değil, Insig-HMGKoAR etkileşimini de tetikler. HMGKoAR ile etkileşen Insig, enzimin ubiquitinasyon yoluyla yıkımına neden olur ve kolesterol sentezi durdurulur (Mesmin B ve Maxfield FR 2009; Radhakrishnan A ve ark. 2008).

Hücreye dışarıdan kolesterol sağlamaya çalışan LDLR, hücre zarında LDL bağlanması ile endositik yolla hücre içine alınır ve içeriğindeki kolesterol ester lizozom içinde hidroliz edilir. Lizozom içinde serbest kalan ve NPC2 proteini tarafından tutulan kolesterol, lizozom zarında bulunan transmembran protein NPC1 aracılığıyla lizozomdan çıkarılır (Mesmin B ve Maxfield FR 2009; Goldstein JL ve Brown MS. 2009; Peake KB ve ark. 2010). Lizozomdan çıkarılan kolesterolün plazma zarı veya ER zarı gibi hücresel zarlara serbest olarak mı geçtiği, yoksa fiziksel temas veya taşıyıcı bir protein aracılığıyla mı geçtiği ise tam olarak açıklanamamıştır (Xu Z ve ark. 2008; Peake KB ve ark. 2010) (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Dış kaynaklı kolesterolün lizozomdan çıkışı. Lizozomda LDL'den hidroliz yoluyla serbest kalan kolesterol, NPC2 tarafından tutulur (1) ve transmembran protein NPC1'e aktarılır (2). NPC1 ise kolesterolü tam olarak bilinmeyen bir mekanizmayla (3) lizozomdan çıkarır (Peake KB ve ark. 2010).

2.2.2. Kolesterolü Hedef Alan İlaçlar

Kandaki yüksek LDL düzeyinin ateroskleroz gelişimi için risk faktörü olduğu uzun zamandır kabul edilmektedir. Bu nedenle, kandaki LDL düzeyini düşürmeyi amaçlayan çeşitli tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Bu tedavilerin başında, LDL kolesterolün kaynağı olan karaciğerdeki kolesterolün sentezini baskılayan statin grubu ilaçlar gelmektedir.

2.2.2.1. Statinler

Statinler, başlangıçta mantarların ikincil metaboliti olarak izole edilmiş ve tanımlanmışlardır (Endo A ve ark. 1992). Kolesterol düşürücü etkisi anlaşılınca klinik kullanımı yaygınlaşan statinlerin zamanla sentetik türleri de üretilmeye başlanmıştır. Mantar kökenli statinler arasında en iyi bilinenleri lovastatin, pravastatin ve simvastatindir. Sentetik statinler arasında ise fluvastatin, rosuvastatin, atorvastatin, rosuvastatin ve pitavastatin bulunur (Endo A. ve ark.1992; Rutishauser J 2011).

Statin kullanımının hiperkolesterolemi ve koroner kalp hastalığı olan kişilerde mortaliteyi anlamlı derecede düşürdüğünün gösterilmesinin ardından, LDL düzeyi normal olan kişilerde de koroner kalp hastalığının önlenmesinde statinlerin etkili olduğu bildirilmiştir (Sever PS ve ark. 2003; Downs JR ve ark. 1998.).

Koroner kalp hastalıklarının tedavisi ve önlenmesindeki etkisi reddedilmeyen statinlerin yan etkileri de bildirilmiştir. Statin kullanan kişilerde % 7 oranında ortaya çıkan ve miyaljiden, miyopati ve rabdomiyolize kadar ilerleyebilen kas toksisitesi, statinin en iyi bilinen yan etkisidir (Joy TR ve ark. 2009; Oskarsson B 2011) Statine bağlı gelişen kas hasarının altında yatan bir çok mekanizma öne sürülse de, statinlerin karaciğere alınmasında rol oynayan SLCO1B1 (*solute carrier organic anion transporter family, member 1B1*) gibi proteinlerin genlerdeki dizi çeşitliliklerinin statine bağlı kas hasarı ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Link E ve ark. 2008). Kullanımının gerekliliği, kullanılanılabileceği durumların belirlenmesi ve kullanım dozu gibi birçok noktada tartışılmaya devam eden statinlerin, artık kişileştirilmiş tıp esası ile kullanımı tıp çevrelerince değerlendirilmeye başlanmıştır (Superko HR ve ark. 2012)

Statinlerin etki mekanizmaları ortak olduğu halde, aralarındaki yapısal farklılık nedeniyle farmakokinetik özellikleri de farklılık gösterir (Neuvonen PJ, 2008). Çözünürlük özelliklerine göre hidrofilik ve lipofilik olarak da sınıflandırılan statinlerin

bu özellikleri, biyoyararlanımlarını ve doku dağılımlarını da etkiler. Hidrofilik statinler büyük ölçüde karaciğer tarafından alınırken, lipofilik statinler damar duvarı tarafından kolaylıkla emilebildiği için karaciğer dışı dokular tarafından tutulur (Germershausen JI,1989) (Tablo 2-2).

Statinlerin etki mekanizması

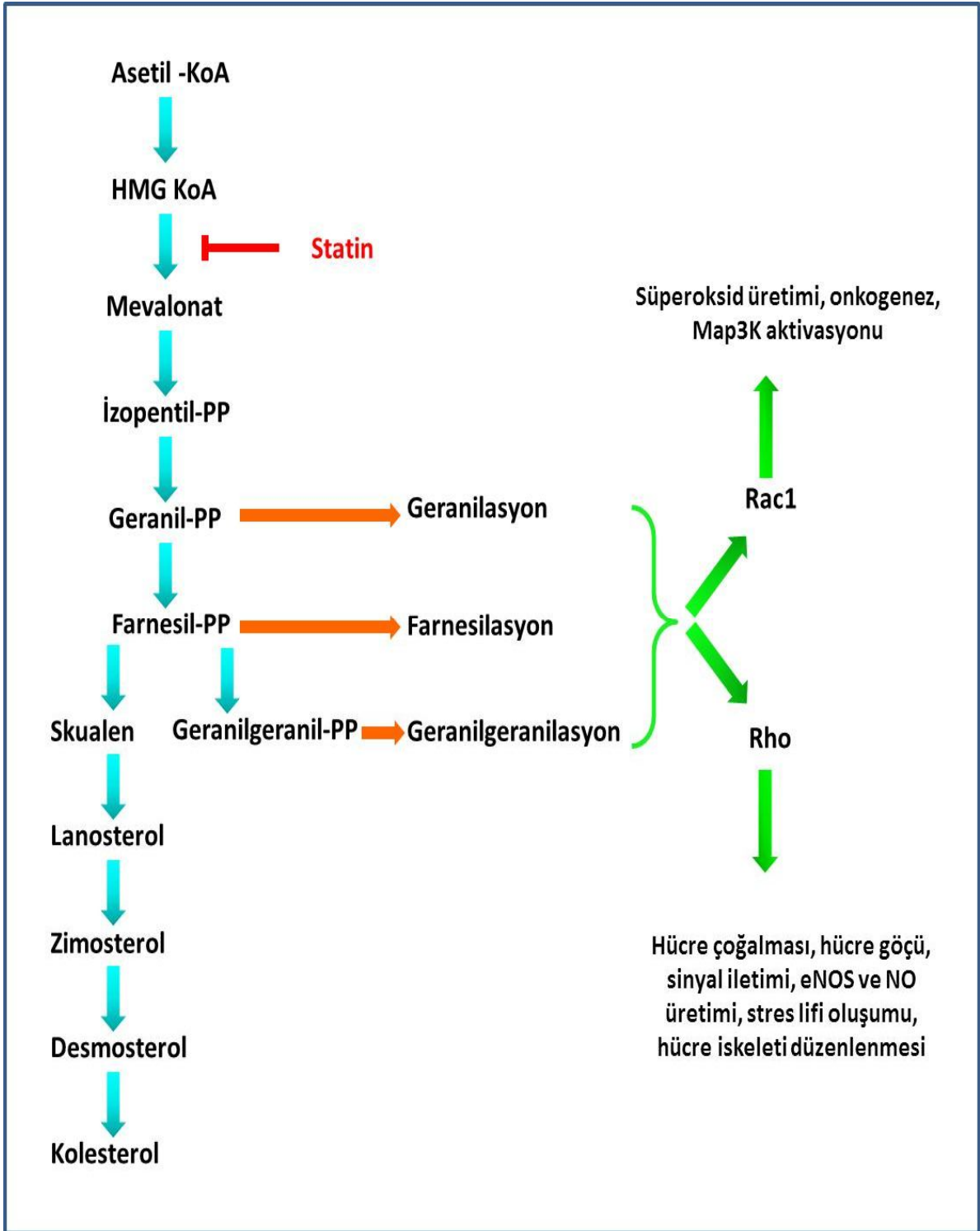
Statinler, HMG-KoAR'nin aktif bölgesine bağlanarak enzimi baskılar. Kolesterol sentezi baskılanan hücreler, kolesterol gereksinimlerini karşılamak için LDL reseptör miktarını artırarak dış kaynaklı kolesterol alınımını hızlandırırlar. Bu da, kandaki LDL düzeyinde azalmaya neden olur. Statinlerin ana kullanım amacı olan LDL düşürücü etkisi, kolesterol azalmasına bağlı gelişen birçok ikincil sonucun da nedenidir (Istvan ES ve Deisenhofer J. 2001; Zhou Q ve Liao JK 2009).

Statinlerin Çok Yönlü Etkisi

Statinlerin klinik kullanım amacı olan kan LDL düzeyini düşürmek, statinlerin anti-hiperkolesterolemik veya LDL düşürücü etkisi olarak tanımlanır. Zamanla kullanımı yaygınlaştıkça, statinlerin LDL düşürücü etkisi dışında başka etkileri de olduğu anlaşılmıştır. Kandaki LDL düzeyinde gözlenen düşüşten önce ortaya çıktıkları için bu etkilerin LDL'den bağımsız olduğu kabul edilmektedir (Liao JK ve ark 2005; Palaniswamy C ve ark 2010).

Statinlerin çok yönlü etkisi olarak tanımlanan bu etkilerin, hidrofilik statinlere oranla lipofilik statinlerde daha belirgin olması, bu etkilerin karaciğer aracılığı ile değil, karaciğer dışı dokulardaki etkisinin sonucu olduğunu düşündürmüştür (Corsini A ve ark 1999).

Statinlerin HMG-KoAR enzimini baskılaması, hücrede sadece kolesterolün değil, farnesil pirofosfat (FPP) ve geranilgeranil pirofosfat (GGPP) gibi, steroid yapılı olmayan izoprenoidlerin de azalmasına neden olur. FPP ve GGPP, küçük GTPaz proteinlerinin hücresel zarlara bağlanmasını sağlayan izoprenilasyon işleminde kullanılan bağlayıcı lipid molekülleridir. Rho, Ras, Rac ve Rab gibi prenilasyon ile hücresel zarlara bağlanan küçük GTPazlar hücre çoğalması, hücre iskeleti ve hareketliliği, hücre içi vezikül taşınması ve sinyal iletimi gibi çok çeşitli işlevlerde görev alırlar (Goldstein JL ve Brown MS. 1990; Van Aelst L ve ark 1997; Takai Y ve ark 2001; Liao JK ve ark 2005; Palaniswamy C ve ark 2010) (Şekil 2-6).

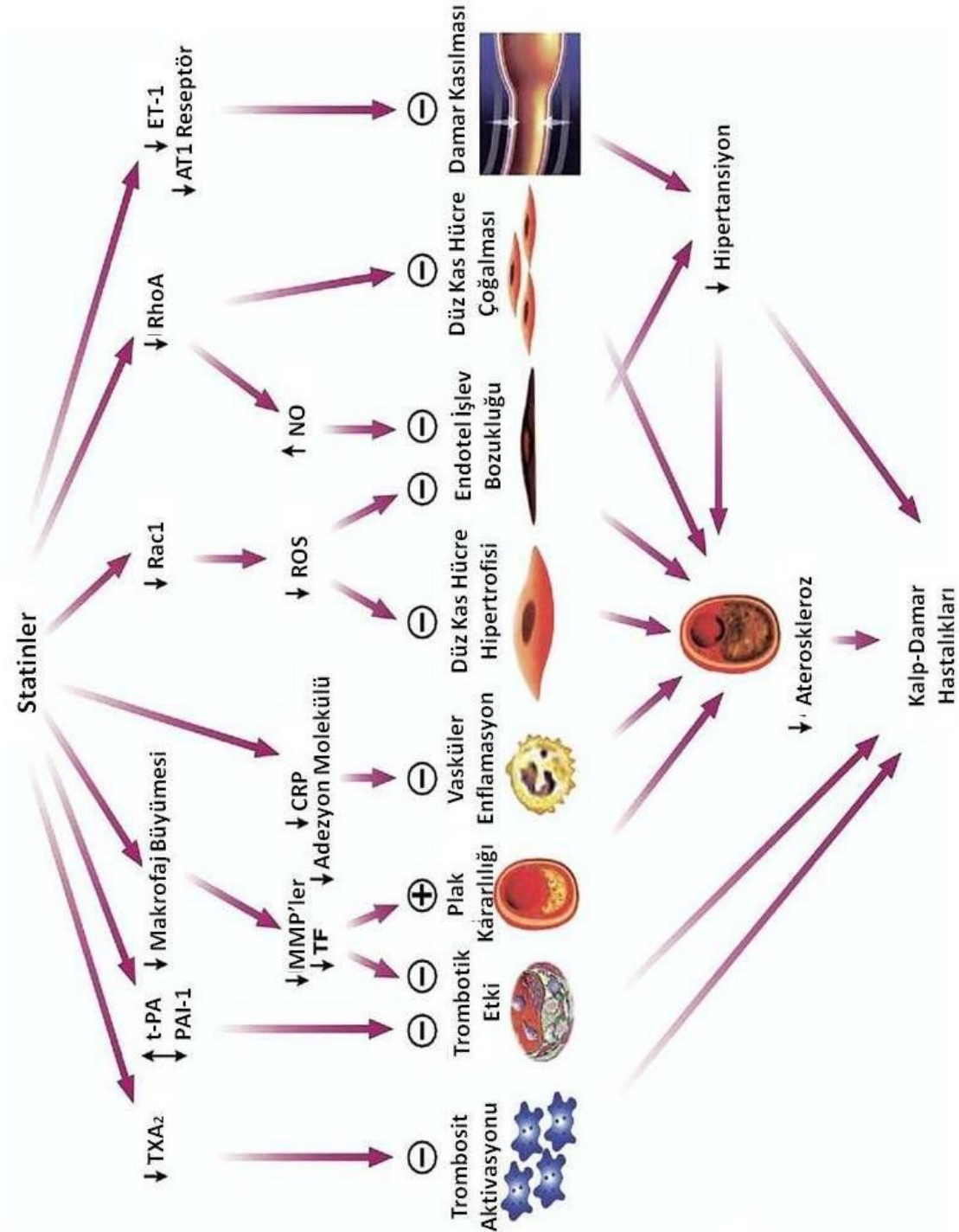


Şekil 2-6: Statinlerin çok yönlü etkisinde, steroid yapılı olmayan izoprenoidlerin rolü

Farklı statinlerin hücre düzeyindeki etkilerini anlamak için yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, statinlerin *CD11b*, *MCP-1*, *iNOS*, *PAI-1*, *MMP-9* ve *HMOX1* gibi genlerin anlatımını düzenleyerek, sitokin salınımı, iltihabi yanıtın baskılanması, monosit göçü, endotel işlevi ve trombus oluşumu gibi süreçlerde etkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 2-7) (Weber C ve ark 1997; Rosenson RS ve ark 1999; Romano M ve ark 2000; Kleemann R ve ark 2004; Liao JK ve ark 2005; Neuvonen PJ ve ark 2008; Palaniswamy C ve ark 2010; Rutishauser J 2011).

Tablo 2-2: Bazı statinlerin farmakokinetik özellikleri (Corsini A ve ark. 1999)

	Rosuvastatin	Atorvastatin	Simvastatin	Pravastatin	Fluvastatin	Pitavastatin	Lovastatin
T_{max} (saat)	3	2-3	1.3-2.4	0.9-1.6	0.4-2.1	0.6-0.8	2-4
Biyoyararlanım	20	12	5	18	24	80	5
Çözünürlük	Hidrofilik	Lipofilik	Lipofilik	Hidrofilik	Lipofilik	Lipofilik	Lipofilik
Protein Bağlama [%]	88	80-90	94-98	43-55	>98	96	95
Metabolit	Aktif	Aktif	Aktif	İnaktif	İnaktif	Aktif	Aktif
Metabolizması	CYP2C9 CYP2C19 Safra	CYP3A4	CYP3A4	Sülfasyon	CYP2C9	CYP2C8 CYP2C9	CYP3A4
$T_{1/2}$ (saat)	19	15	2-3	1.3-2.8	1.2	10-11	2.9



Şekil 2-7: Statinlerin kalp-damar hastalıkları için önemli olan çok yönlü etkileri (Liao JK ve ark. 2005)

2.2.2.2. Bifosfonatlar

Temel olarak, bir karbon atomu ile bağlanmış iki fosfat grubundan (P-C-P) oluşan bifosfonatlar, 19. yüzyılda sentezlenmiş ve uzun bir süre tekstil alanında kullanılmıştır. Kemik erimesini engelleme özelliği anlaşılınca tıpta da kullanıma girmiştir. Kemik erimesini, osteoklast hücrelerini baskılayarak engellediği gösterilen bifosfonatlar, etki mekanizmaları birbirinden farklı, azot içeren ve içermeyen bifosfonatlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar; (Russell RG ve ark 1999; 2011).

Klodronat ve etidronat gibi azot içermeyen bifosfonatlar, yapısal benzerliği nedeniyle inorganik fosfat (PPi) analogu (P-O-P) olarak davranır ve osteoklastlarda ATP'nin (A-ppp) yapısına girerek etki gösterir. Yapısına bifosfonat giren ATP (A-ppCp), hidroliz edilemediğinden, birikerek osteoklast ölümüne yol açar (Reszka AA ve Rodan GA 2003; Russell RG ve ark 2007).

Neridronat gibi azot içeren bifosfonatlar (N-BP) ise mevalonat yolağında yer alan farnesil pirofosfat sentaz (FPPS) enzimini baskılayarak etkisini gösterir (van Beek E ve ark 1999). Mevalonat yolağı tarafından üretilen farnesil FPP ve GGPP gibi izoprenoid lipidler, Ras, Rab, Rho ve Rac gibi küçük GTPaz'ların posttranslasyonel modifikasyonu (prenilasyon) için gerekli olduğu için, bu lipidlerin baskılanmasında, birçok hücrel sinyal iletimi aksamakta, hücre ölümü gerçekleşmektedir. Kemik dokusuna olan ilgisi nedeniyle bifosfonatların hücre öldürücü etkisi, kemik dokusundaki fagositik aktiviteye sahip olan osteoklast hücreleri üzerinde belirgin olarak ortaya çıkar (Russell RG ve ark 1999; 2007; 2008; Reszka AA ve ark 2003). Bifosfonat aracılı osteoklast apoptozunun, konneksin 43 kanallarının açılması ve ERK (Hücre dışı ileti ile düzenlenen kinaz, *Extracellular signal-Regulated Kinase*) sinyal yolunun aktivasyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Plotkin LI ve ark 2005). Bifosfonatların, osteoklast öncül hücrelerin birleşerek osteoklast oluşturmalarını da engelledikleri bildirilmiştir (Boonekamp PM ve ark 1986; Lowik CW ve ark. 1988).

Bifosfonatların Çok Yönlü Etkisi

Kemik dokusuna olan yüksek ilgisine rağmen bifosfonatların kemik dokusu dışında da bazı etkileri olduğu görülmüştür. Bu etkiler arasında, aterosklerotik plaktaki lipid birikiminin, fibroz oluşumunun, makrofaj aktivasyonunun ve arterial kalsifikasyonun baskılanması yer alır (Ylitalo R 2000; Price PA ve ark. 2001; Lomashvili KA ve ark. 2009; Corrado A ve ark. 2007). Statinler gibi bifosfonatların da LDL düzeyini etkilediği gösterilmiştir (Adami S ve ark. 2000; Montagnani A ve ark. 2003)

Bifosfonatların çok yönlü etkisi, statinlerde olduğu gibi mevalonat yolağın ara bileşikleri olan izoprenoidler ile açıklanmaktadır. Statinlerin de kemik erimesini engellemeleri (Staal A ve ark. 2003), bu iki ilaç grubunun çok yönlü etkilerinin ortak mekanizma üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

2.3. HEDEF GENLER

2.3.1. *SPP1* (Osteopontin, OPN)

Salgısal fosfoprotein 1 (*SPP1*) ve erken T lenfosit aktivasyonu-1 (*Eta-1*) olarak da bilinen osteopontin, ilk olarak transforme olmuş hücreler tarafından salgılanan bir fosfoprotein olarak tanımlanmış ve *SPP1* olarak isimlendirilmiş (Senger DR ve ark. 1979), daha sonra kemiğin hücre dışı yatak (*extracellular matrix, ECM*) yapısında tanımlandığı (Oldberg A ve ark. 1986) için *osteopontin* olarak isimlendirilmiştir. Başka bir grup tarafından da aktif T hücrelerinde bulunmuş ve *Eta-1* (*Early t-lymphocyte activation-1*) olarak isimlendirilmiştir (Patarca R ve ark. 1989). Kemik dokusunun temel bileşenlerinden olduğu kabul edilen *SPP1*'in, daha sonra farklı dokulardaki hücreler tarafından da salgılanan çok işlevli bir fosfoprotein olduğu anlaşılmıştır (O'Regan AW ve ark.1999; Chabas D ve ark. 2001; Wang KX ve Denhardt DT.2008; Morimoto J ve ark. 2010).

Özellikle Th1 hücrelerinin rol oynadığı iltihabi hastalıklar başta olmak üzere birçok immün hastalık ve kanser gelişiminde ve doku onarımı gibi fizyolojik süreçlerde görev aldığı bilinen SPP1'in işlevi fosforilasyon gibi yollarla kontrol edilir. İntegrin bağlayıcı RGD bölgesi içeren SPP1 proteini (OPN), hücre yüzeyindeki değişik integrinlere bağlanarak hücre adezyonunda düzenleyici olarak görev alır (Liaw L ve ark.1994; Barry ST ve ark. 2000). SPP1'in bu özelliği, monosit ve makrofajların göçü, sitokin salınımı ve fagositik aktivitelerinde de önemli rol oynar (Weber GF ve ark. 2002).

Statinlerin çok yönlü etkisinde de SPP1'in rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar vardır (Zhang J ve ark. 2010).

2.3.2. IKK/IKK/IKK

Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), hücrelerin viral veya bakteriyel uyarılara, iyonize edici radyasyona, sitokine ve serbest radikallere verdiği yanıtın düzenlenmesinde kilit rol oynayan ve immün yanıt, yangı, hücre büyümesi gibi biyolojik süreçlerde görev alan beş transkripsiyon faktörünün oluşturduğu bir ailedir. Bu ailede yer alan p50, p52, p65 (RelA), c-Rel ve RelB transkripsiyon faktörleri, amino (N-) uçlarında Rel homoloji bölgesi adı verilen DNA bağlanma/dimerizasyon bölgesine sahiptirler (Hayden MS ve ark. 2008).

NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi, IKK (kappa B inhibitörü) ve IKK (kappa B inhibitör kinazı) adlı iki protein ailesi tarafından kontrol edilir. Sekiz üyeden oluşan IKK ailesi, herhangi bir uyarı olmadığı normal koşullarda NF- κ B'nin sitoplazmadan çekirdeğe geçişini engelleyerek NF- κ B aktivitesini baskı altında tutar. Biri düzenleyici işleve, ikisi kinaz aktivitesine sahip, üç üyeden oluşan IKK kompleksi ise, belirli uyarılar varlığında IKK'lerin fosforilasyonunu tetikler. Fosforilasyonun ardından ubiquitinasyon ile proteolitik yıkıma uğrayan IKK, NF- κ B'nin serbest kalmasına ve çekirdeğe girerek DNA'daki κ B yanıt elementlerine homodimer veya heterodimer olarak bağlanmasına yol açar (Karin M ve ark. 2000; Hayden MS ve ark. 2008).

Anlatımları NF- κ B tarafından kontrol edilen genler arasında *IL-6*, *IL-8*, *IL-1 beta*, *TNF alfa*, *IFN gama*, *MCP-1*, *iNOS*, *COX-2*, *ICAM-1* ve *VCAM-1* gibi hücre göçü, hücre adezyonu, hücre farklılaşması ve hücre çoğalması gibi süreçlerde görev alan genler bulunur.

Kronik bir iltihabi yanıt olarak gelişen aterosklerozda NF- κ B sinyal yolağının önemi uzun zamandır bilinmektedir (Muroya T ve ark. 2003; Lu Y ve Wahl LM. 2005; Brasier AR ve ark. 2010). Aterosklerotik plaktaki endotel ve makrofajlarda artmış NF- κ B aktivasyonu, NF- κ B sinyal yolağının ateroskleroz gelişimini hızlandırdığını düşündürmüştür. Okside LDL'nin de tetiklediği NF- κ B sinyal yolu, ateroskleroz tedavisinde kullanılan statinlerin anti-aterojenik etkisi gibi bir çok etkisinde rol oynamaktadır (Muroya T ve ark. 2003; Lazzerini PE ve ark. 2007; Ahn KS ve ark. 2008; Mandosi E ve ark. 2010; Ghosh-Choudhury N ve ark. 2010; Liu ZQ ve ark. 2011).

NF- κ B sinyal yanıtının kontrolünde sinyal iletimini sağlayan IKK kompleksindeki üç proteinden IKK alfa ve IKK beta serin/treonin kinaz aktivitesine sahipken IKK gama (NEMO) düzenleyici işleve sahiptir (Scheidereit C 2006). Bu komplekste yer alan IKK alfa (IKKA/IKBKA/CHUK), NF-kappaB'ye bağlı gen anlatımının kontrolü için gerekli bir alt birimdir (DiDonato JA ve ark.1997; Hu Y ve ark. 1999; Senftleben UV 2001; Anest V ve ark. 2003). IKBKA, amino (N-) ucunda bir kinaz bölgesi, IKK kinaz aktivitesini düzenleyen bir HLH (*Helix-Loop-Helix*) bölgesi, ve dimerizasyondan sorumlu bir lösün fermuar yapısına sahiptir. IKB'ye *ankyrin* tekrar bölgeleriyle bağlanan ve serin/treonin kinaz aktivitesiyle fosforile eden IKBKA, makrofaj aktivasyonunun baskılanması ve MMP-9 (matriks metaloproteinaz 9) üretiminin düzenlenmesi üzerinden ateroskleroz patogenezinde rol oynamaktadır (Lu Y ve Wahl LM. 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Real-Time PZR cihazı (LC480)

PZR cihazları

Yatay elektroforez aleti

Jel görüntüleme sistemi

Elektroforez güç kaynağı

Mikrodalga fırın

Hücre sayım ve canlılık değerlendirme donanımı

Spektrofotometre

Mikrobiyolojik etüv

CO₂'li inkübatör

Çalkalamalı su banyosu

Laminar akışlı steril kabin

Çeker ocak

Hassas terazi

Mikropipetler

Vorteks

Isı bloğu

Soğutmalı santrifüj

Masa üstü mini santrifüj

Buzdolapları ve dondurucular (+4 °C, -20 °C ve -80 °C)

Buz makinesi

Sıvı azot tankı

Distile su cihazı

Otoklav

Hibridizasyon firmı

pH metre

3.2. Kimyasallar

Agaroz

DEPC

Etilen diamin tetra asit (EDTA)

Etidium bromid

Etil alkol

İzopropanol

Formaldehit

Formamid

Hidrojen peroksit

Mineral yağ

Sodyum hidroksit NaOH

Tris-base

Tris-HCl

RPMI

HEPES

D-glucose

L-glutamine

Sodium bikarbonat

Sodyum piruvat

Fetal bovine serum (FBS)

Ampisilin

DMSO (Dimetil Sülfoksit)

PBS çözeltisi

RNAzap

PMA

Simvastatin

Neridronat

Zaragozik Asit

HPBCD

SR1001

Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

Kültür Besi Yeri

RPMI kültür mediumu içeriği aşağıdaki formüle uygun olacak şekilde hazırlandı:

4,5 g/L D-glucose

2mM L-glutamine

1,5 g/L Sodium bikarbonat

1mM sodium piruvat

10mM HEPES

%10 fetal bovine serum

1X penisilin (100 IU/ml) ve streptomisin (100 µl/ml)

PBS (*Phosphate Buffered Saline*) Çözeltisi:

+4 °C'de muhafaza edilen kullanıma hazır steril, standart PBS çözeltileri kullanıldı. Mg⁺² ve Ca⁺² içeren PBS solusyonu hücre sayımı için, Mg⁺² ve Ca⁺² içermeyen PBS solusyonu hücre dizilerinin pasajlanması sırasında kullanıldı.

Hücre Dondurma Medyumu 1:

% 40 Fetal bovin serum

% 100 hacime antibiyotik ve serum içermeyen RPMI medyumu ile tamamlandı.

Kullanım aşamasına kadar +4 °C’de saklandı.

Hücre Dondurma Medyumu 2:

% 40 Fetal bovin serum

% 20 DMSO

% 100 hacime antibiyotik ve serum içermeyen RPMI medyumu ile tamamlandı.

Kullanım aşamasına kadar +4 °C’de saklandı.

Antibiyotik Antimikotik (Penisilin/sitreptomisin) Solüsyonu (100X):

Kuru buz içerisinde donuk halde temin edilen solusyon çözülür ve 5 ml olacak şekilde tüplere ayrıldı. Kullanım aşamasına kadar -20 °C’de saklandı.

3.3. Kimyasalların Hazırlanışı

PMA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate*): 1 mg PMA (AppliChem, A0903,0005) 1 ml etanolde çözülerek 1,62 mM’lık ana stok hazırlandı. Ana stoktan 61,2 µl, 10 ml distile suda seyreltilerek 10 µM’lık ara çözelti elde edildi. Çözeltiler -20 °C’de saklandı. Ara çözelti, kullanım sırasında 1:10 oranında besi yeri ile sulandırılarak filtre edildi.

Simvastatin (Sim): 5 mg simvastatin (Sigma, S6196) 1194,5 µl DMSO ile çözünerek 10 mM’lık ana stok hazırlandı. Ana stoğun 1:10 oranda sulandırılması ile 1 mM çalışma çözeltisi hazırlandı. Ana stok ve çalışma çözeltisi +4°C’de saklandı.

Neridronat (Ner): 10 mg neridronat (Sigma, N6037) 1200 µl su ile çözülerek 30 mM ana stok elde edildi. Ana stoktan sulandırılarak 1 mM çalışma çözeltisi elde edildi. Her iki çözelti de -20 °C’de saklandı.

Zaragozik Asid (ZA): 5 mg zaragozik asid (Sigma, Z2626) 1320 µl su ile çözünerek 5 mM’lık ana stok hazırlandı. Ana stoğun 1:10 oranda sulandırılması ile 1 mM çalışma çözeltisi hazırlandı. Ana stok ve çalışma çözeltisi +4°C’de saklandı.

Hidroksi propil beta siklodekstrin (HPBCD): 1 g HPBCD (AppliChem, A0367, 5 mg) 2 ml suda çözülerek 500 mM çözelti hazırlandı. Çözelti +4 °C’de saklandı. Filtre edilerek kullanıldı.

SR1001: 5 mg SR1001 (Cayman, 10922), 1 ml DMSO ile çözülerek 10 mM’lık ana stok hazırlandı. Ana stoktan 1:10 oranında sulandırılarak 1 mM’lık çalışma çözeltisi hazırlandı. Her iki çözelti de -20 °C’de saklandı.

3.4. Hedef Gen Seçimi

Bifosfonat ve statinlerin çok yönlü etkileri arasında yer alan anti-aterojenik ve anti-enflamatuar etkide rol oynayabilecek olan genlerin promotor gibi düzenleyici bölgeleri, ROR-alfa tanıma dizilerinin varlığı bakımından incelendi. ROR-alfa hedef geni olabilecek genlerden *SPP1* ve *IKBKA* genleri seçildi.

SPP1 geninin 5’ komşuluğundaki 6000 bazlık bölge içinde, TFSEARCH kullanılarak 4 adet RORE (ROR yanıt elementi) bulundu. Bu yanıt elementlerinden birbirine yakın olan ilk ikisinin, TSS’den (Transkripsiyon başlangıç noktasından) 710 baz öncesinde (-710), üçüncüsünün TSS’nin 2510 baz öncesinde (-2510), dördüncüsünün ise TSS’nin 4360 baz öncesinde (-4360) yer aldığı görüldü. Bu RORE dizilerinden TSS’ye en yakın olanını içine alacak şekilde primer çifti tasarlandı.

IKBKA geninin 5’ komşuluğundaki 6000 bazlık bölge içinde, TFSEARCH kullanılarak 1 adet RORE dizisi bulundu. Genin transkripsiyon başlangıç noktasından 1190 baz öncesinde (-1190) yer alan bu diziyi içine alacak şekilde primerler tasarlandı.

Tablo 3-1: *ChIP* PZR’sinde kullanılan *IKBKA* ve *SPP1* promotor primerleri

Primer	Dizi	Uzunluk (baz)	Beklenen Bant Boyu (bç)
IKBKA-prom-F	CTCCAAGTCCATGGAAACCATGCA	24	118
IKBKA-prom-R	TGCAACCAGAATGTTGAGCACTGC	25	
SPP1-prom-F	TCGTGACTGCCTGCCCCTCTT	21	314
SPP1-prom-R	AAGCAGTTTCTGACTGAGAGCAGGA	25	

3.5. Biyoinformatik Analizler

Hedef genlerin ve promotorlarının dizi analizleri için üç kaynaktaki (<http://genome.ucsc.edu/>, <http://www.ensembl.org/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) referans diziler kullanıldı. Referans dizide seçilen bölgelerdeki olası ROR yanıt elementleri TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) üzerinden bulundu. Bulunan dizilere uygun primerler NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) üzerinden Primer3'de tasarlandı. *ChIP-Tiling Array* sonuçları NimbleGen'in SignalMap (<http://www.nimblegen.com/products/software/signalmap/index.html>) hizmeti kullanılarak incelendi. Hedef bölgelerin transkripsiyonel aktiviteleri ile ilgili kayıtlı veriler için USCS (<http://genome.ucsc.edu/>) hizmetinden yararlanıldı.

3.6. Besi Yeri Hazırlama

Önceden 50 ml'lik falkon tüplere ayrılarak dondurulan serumlardan 1 tüp eritildi. 500 ml RPMI-1640'dan bir miktar falkon tüpüne alındı ve 1250 mg D-glukoz ile 50 mg sodyum pirüvat eklendi. Çözündükten sonra 45 µm ve 20 µm'lik filtrelerden geçirilerek RPMI içine geri eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra RPMI içinden 55 ml temiz bir falkon tüpüne ayrıldı. Erimiş olan 50 ml'lik serum 45 µm ve 20 µm'lik filtrelerden geçirilerek RPMI içine eklendi. Serum eklenmesiyle hacmi 495 ml olan RPMI içine 5 ml penisilin/streptomisin eklenerek % 10 serum içeren 500 ml'lik besi yeri elde edildi.

LDL'siz besi yeri hazırlama işlemi, LDL'siz serum kullanımı dışında aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7. Hücre Dizisi

Hücre kültürü çalışmalarında THP-1 (ATCC No: TIB-202) monosit hücreleri ve bu hücre dizisinden farklılaşma sonucu elde edilen makrofajlar kullanılmıştır.

THP-1 hücre dizisi, akut monositik lösemili 1 yaşındaki Japon erkek hastadan 1987 yılında elde edilerek hazırlanmış bir monositik lösemi hücre dizisidir. Işık mikroskopisinde büyük, yuvarlak, serbest hücreler şeklinde görünür. Hücrelerin yaklaşık iki katına çıkma zamanı 26 saattir.

3.8. Hücre Çözme

Sıvı azot (-196 °C) içinde, vida kapaklı tüplerde saklanılan THP-1 hücreleri, sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra 37 °C'deki su banyosuna alındı ve erimesi için 3-4 dakika bekletildi. Tam olarak eridikten sonra 15 ml'lik falkona aktarılan hücrelerin üzerine kültür besi yerinden, 5 ml'ye tamamlanmaya kadar dikkatli bir şekilde eklendi. DMSO içeren dondurma

besi yerinden kurtulmak için, 1500 rpm'de 5 dakikalık santrifüj ile pelet şeklinde çöktürülen hücreler, 2 ml RPMI-1640 kültür besiyeri ile homojenize edildi. Hücre içeren besiyeri 200 µl alınarak 800 µl PBS içinde 1:5 oranında sulandırıldı ve hücre sayımı ve sağ kalım oranının ölçümü için kullanıldı (Vi-cell XR cell viability analyzer, Beckman coulter inc. Brea, CA, USA). Canlı hücre sayısına göre, ml'de $3-5 \times 10^5$ hücre olacak biçimde, 25 ml'lik flask içine 5 ml besiyeri ile ekildi. Flask, 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi.

3.9. Hücre Kültürü ve Pasajlama

İnkübatörde çoğalmaya bırakılan hücrelerin, günlük olarak mikroskopik kontrolü yapıldı. Yeterli sayıya ulaştığı düşünülen hücreler, flasktan 15 ml'lik falkon tüplerine alındı. 1500 rpm'de 5 dakikalık santrifüj sonucunda elde edilen pelet, 3 ml besiyeri ile homojenize edildi. Hücreli besiyeri 200 µl alınarak 800 µl PBS içinde 1:5 oranında sulandırılarak hücre sayımı ve sağ kalım oranı ölçüldü. Canlı hücre sayısına bağlı olarak 25 veya 75 ml'lik flaslara, ml'de $3-5 \times 10^5$ hücre olacak biçimde ekim yapıldı.

3.10. Makrofaj Farklılaşması

Flaslarda istenilen sayıya ulaşan ve santrifüj ile çöktürülen monositler, yeni RPMI-1640 besiyeri ile alınarak 6 kuyulu petrilere, her bir kuyuya 1 ml besiyeri ve 1×10^6 hücre olacak biçimde dağıtıldı. Her bir kuyuya, önceden hazırlanan ve 400 nM PMA içeren besiyerinden 1 ml eklenerek, finalde 200 nM PMA içeren, 2 ml'lik besiyeri ortamı sağlandı. Monositlerin bu besiyerinde makrofajlara farklılaşmaları mikroskopik olarak takip edildi. 48 saatin sonunda farklılaşmalarını tamamlayan makrofajlar, çalışmanın devamında kullanılmıştır.

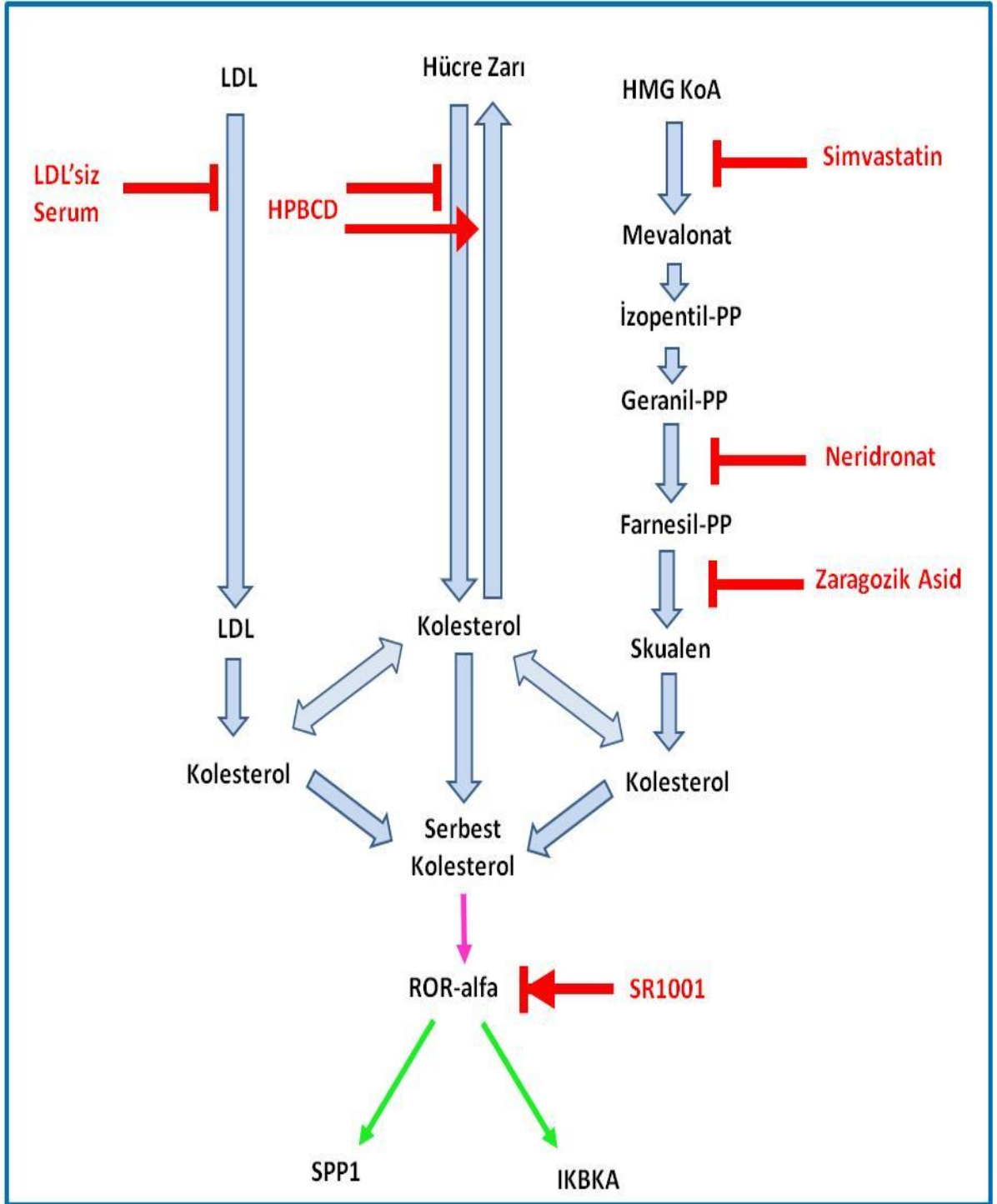
3.11. İlaç Uygulaması

Simvastatin ve neridronatın kolesterol/ROR-alfa eksenini üzerinden *SPPI* ve *IKBKA* gen anlatımlarına etkisini test etmek için, doğal ROR-alfa ligandı olan hücre içi serbest kolesterolün olası kaynakları farklı noktalardan kesilecek şekilde uygun koşullar belirlendi (Şekil 3-1).

Çalışılacak koşul sayısına göre miktarı belirlenen ve falkon tüplerine ayrılan RPMI-1640 besiyeri içine, simvastatin ve neridronatın 1 mM'lık çalışma çözeltilerinden, petri kuyusundaki final konsantrasyonları 10 µM olacak biçimde ekleme yapıldı. 1 mM'lık zaragozik asid çözeltilisinden ise, final konsantrasyonu 50 µM olacak biçimde ekleme yapıldı. Her biri iki ayrı falkon tüpüne eşit oranda bölünen ilaç uygulanmış besiyerlerinden birine, final konsantrasyonu 5 µM olacak biçimde SR1001, diğerine ise kullanılan SR1001 hacmine eşit oranda DMSO eklendi.

PMA uyarısı ile farklılaşmalarını tamamlayan makrofajların besi yerleri uzaklaştırılarak, her bir kuyuya 1 ml taze besi yeri eklendi. Kimyasalların eklenerek hazırlandığı ve içerikleri farklı besi yerlerinden, önceden belirlenen kuyulara birer ml eklenerek hacim 2 ml'ye tamamlandı.

Her bir koşulun çift olarak hazırlandığı çalışmanın tüm aşaması, kolesterol kaynağını kontrol etmek için, paralel olarak üç ayrı hücre grubunda çalışıldı. Gruplardan ikisinde LDL içeren standart serum ile hazırlanmış, birinde ise LDL içermeyen serum ile hazırlanmış besi yeri kullanıldı. LDL içeren iki besi yerinde çalışılan iki gruptan birinin içerisine, uygulamanın 20. saatinde, final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde HPBCD eklendi. Üç grubun besi yeri de, 24. saatte uzaklaştırıldı ve makrofajlar kazınarak toplandı. Soğuk PBS ile yıkandıktan sonra, buz üstünde RLT tamponu eklenerek pipetle homojenize edildi. Hücre homojenatları RNA izolasyonuna kadar -80 °C'de saklandı.



Şekil 3-1: Çalışmanın genel dizaynı ve doğal ROR-alfa ligandı olan serbest kolesterolü farklı noktalardan kontrol etmek için eklenen maddeler.

3.12. RNA İzolasyonu

RLT çözeltisi içinde -80°C 'de saklanan hücreler, 400 μl parçalayıcı çözelti (*Lysis Binding Buffer*) eklenerek ve 15 s vorteklenerek parçalandılar. Spin kolona aktarılan örnek 8000 g devirde 15 s santrifüj edildi. Olası bir genomik DNA bulaşmasını önlemek için, spin kolon üzerine % 10'luk DNazI çözeltisinden 100 μl eklendi ve 15 dakika $15-25^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Spin kolon üzerine 500 μl yıkama çözeltisi (*Wash Buffer I*) eklendi ve 8000 g devirde 15 s santrifüj ile spin kolon yıkandı. İkinci yıkama çözeltisinden (*Wash Buffer II*) 500 μl eklenerek, 8000 g devirde 15 s santrifüj ikinci yıkama işlemi yapıldı. İkinci yıkama çözeltisinden (*Wash Buffer II*) 200 μl eklenerek, 13000 g devirde 2 d santrifüj ile yapılan son yıkamanın ardından spin kolonun, alkol kalıntısından kurtulması için, boş olarak 13000 g devirde 1 d santrifüj edildi. Yeni ve temiz bir tüpe aktarılan spin kolona 50 μl ayrıştırıcı çözelti (*Elution Buffer*) ekledi ve 8000 g devirde 1 dakikalık santrifüjün ardından RNA izole edilmiş oldu. RNA örnekleri, cDNA sentezleme işlemine kadar -80°C 'de saklandı.

3.13. cDNA Sentezi

9,5 μl RNA ayrılan eppendorf tüplere 2 μl *Random Hexamer* eklendi. 65°C 'de 10 dakika bekletildikten sonra buz üstüne alındı.

Her örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı:

Ters transkriptaz reaksiyon tamponu	4 μl
Koruyucu RNaz inhibitörü	0,5 μl
Deoksinükleotid karışımı	2 μl
DTT	1 μl
Ters transkriptaz	1,1 μl
Toplam	8,6 μl

Her örneğe bu karışımdan 8,6 μl eklenerek 50°C 'de 30 dakika ve ardından 85°C 'de 5 dakika bekletilerek buz üzerine alındı. cDNA örnekleri -20°C 'de saklandı.

3.14. Nicel PZR

Nical PZR, insan beta aktin geni (*ACTB*), osteopontin geni (*SPPI*) ve IKBKA geni (*CHUK*) transkriptleri için hazırlanmış UPL (*Universal Probe Library*) problemleri ve primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Örneklerle birlikte, 1:1, 1:10, 1:100 ve 1:1000 oranında sulandırılmış bir cDNA da standart olarak çalışıldı.

H ₂ O	5 µl
Ana Probe Karışımı	2 µl
Prob	0,5 µl
Toplam	7,5 µl

Örnek sayısına göre hazırlanan primer-UPL prob içeren karışım 96'lık beyaz plate içindeki kuyulara 7,5 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her kuyuya 2,5µl cDNA eklenerek Roche LC480 cihazında aşağıdaki program üzerinden PZR işlemi gerçekleştirildi.

1 döngü	95 °C	10 d
45 döngü	95 °C	10 s
	60 °C	30 s
	72 °C	1 s
1 döngü	40 °C	30 s

Sonuçlar, standart örneklerden yararlanılarak çizilen standart eğri üzerinden hesaplanan göreceli nicel değerler üzerinden yorumlandı.

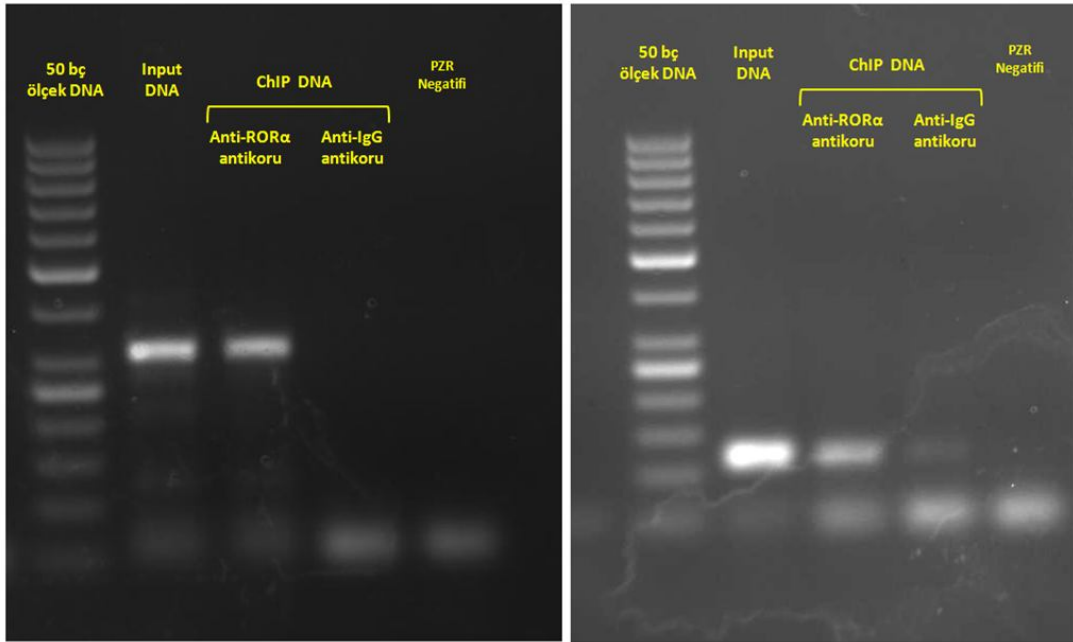
4. BULGULAR

4.1. *SPP1* ve *IKBKA* Promotorlarında ROR Yanıt Elementleri

Seçilen hedef genlerin transkripsiyon başlanıç noktalarından (TSS) 5000 baz öncesi ve 2000 baz sonrasını kapsayan bölgelerin, eşik skor 85.0 olacak şekilde TFSEARCH veri tabanında yapılan analiz sonucunda, *SPP1* promotorunda 4, *IKBKA* promotorunda 1 olası ROR yanıt elementi (RORE) bulundu.

4.2. Monositte ROR-Alfa'nın *SPP1* ve *IKBKA* Promotorlarına Bağlanması

SPP1 ve *IKBKA* gen promotorlarında, TFSEARCH kullanılarak bulunan ROR yanıt elementlerini kapsayacak şekilde tasarlanan primerler ve anti-ROR-alfa antikoru ile elde edilen kromatin immünopresipitasyon (*ChIP*) DNA'sı kullanılarak yapılan PZR'ler sonucunda, ROR-alfa transkripsiyon faktörünün *SPP1* ve *IKBKA* promotorlarına bağlandığı gösterildi (Şekil 4-1).

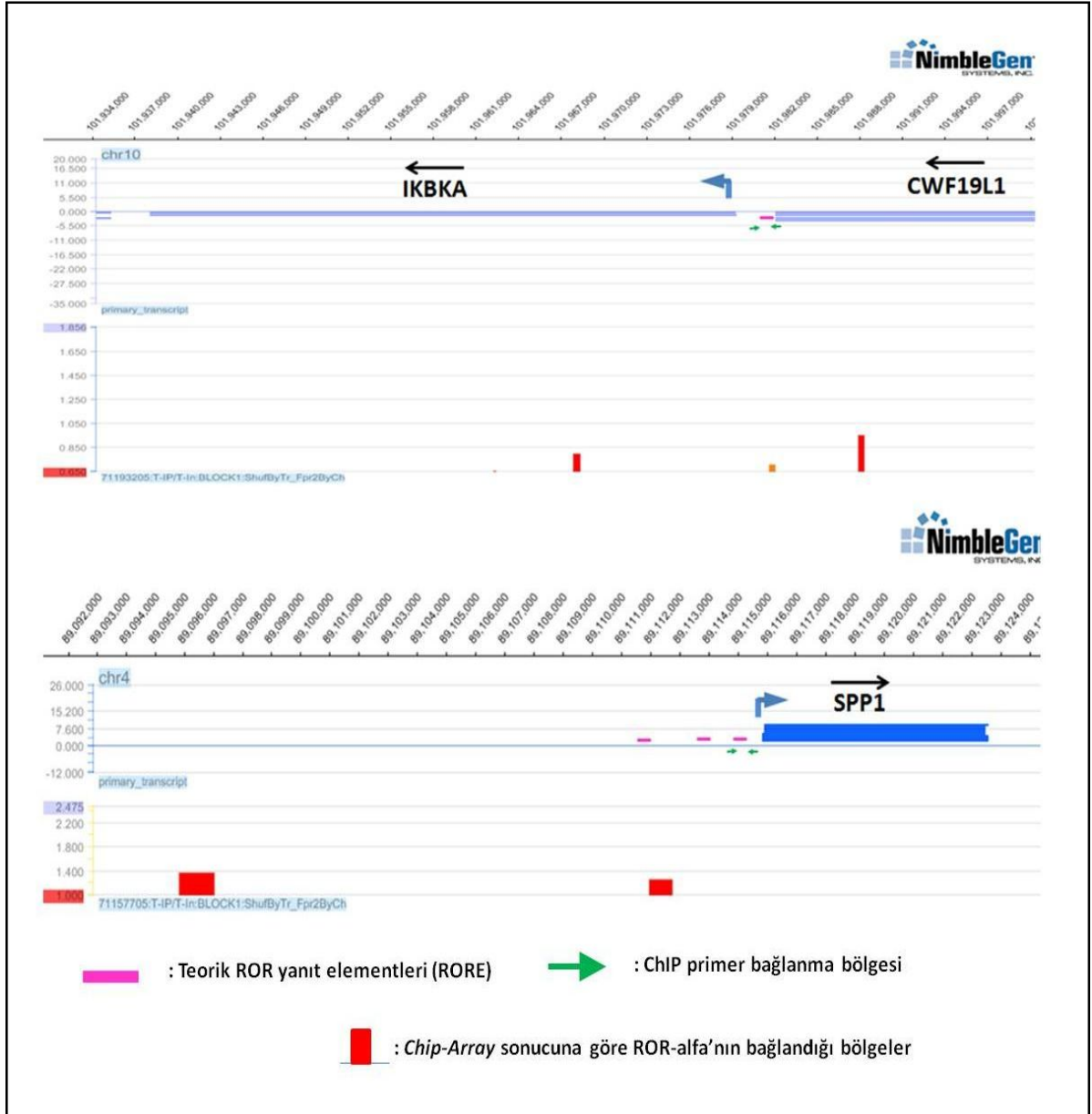


Şekil 4-1: *SPP1* ve *IKBKA* promotorlarına özgü primerlerle yapılan *ChIP*-PZR sonucu. Anti-ROR α antikoru kullanılarak elde edilen *ChIP* DNA'sındaki 118 ve 314 bç'lik bantlar, ROR-alfa'nın *SPP1* ve *IKBKA* promotorlarına bağlandığını gösteriyor.

4.3. *ChIP* PZR Sonuçlarının *ChIP-Array* Sonuçları ile Doğrulanması

Anti-RORalfa antikoru ile elde edilen *ChIP* DNA'sı ve immünopresipitasyon (*IP*) öncesi girdi DNA'sının (*Input DNA*), İ.Ü. 3680 nolu BAP projesi kapsamında Roche NimbleGen'de tüm genom array (*NimbleGen, Human ChIP-chip 2.1M Whole-Genome Tiling - 10 Array Set*) yöntemi ile incelenmesi ile elde edilen sonuçlar, *IKBKA* ve *SPP1*'in ROR-alfa hedef geni olduğunu desteklemiştir (Şekil 4-2). Ancak, *IKBKA* geninin TSS noktasına en yakın olan ve PZR ile incelenen RORE bölgesine zayıf olarak bağlandığı, TSS'den yaklaşık 10 kb sonrasında ve 8 000 baz öncesinde (*CWF19L1* geni içinde) yer alan iki bölgeye daha yüksek skorla bağlandığı görülmüştür.

SPP1 gen promotorunda yer alan üç RORE dizisinden, -4000 baz konumunda yer alan diziye ROR-alfa'nın bağlandığı görülmüştür. *ChIP* DNA'sı, büyük kısmı sonikasyon ile 100-2000 baz aralığına giren parçalara ayrıldığı için, *SPP1* promotor primerleri ile yapılan PZR'de de bu bağlanma görülebilmştir.

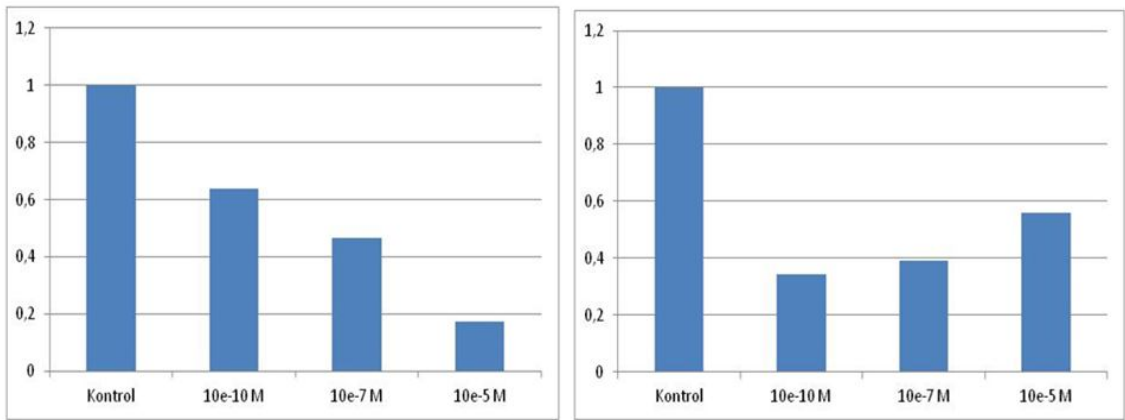


Şekil 4-2: *ChIP-array* sonuçlarına göre *IKBKA* ve *SPP1* genlerinin yakınlarında ROR-alfa'nın bağlandığı noktalar.

4.4. *SPP1* ve *IKBKA* Nicel PZR Sonuçları

4.4.1. Monositte *SPP1* ve *IKBKA* Gen Anlatımlarının ROR-Alfa Aktivitesine Bağlı Değişimi

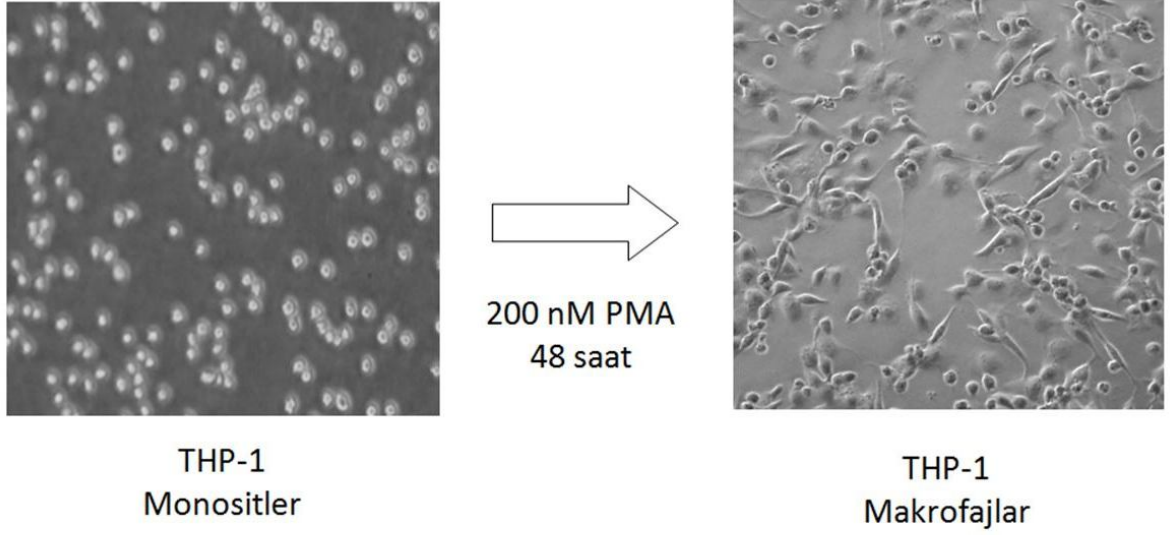
Farklı konsantrasyonlarda ($10e-10$ M, $10e-7$ M ve $10e-5$ M) yapay ROR-alfa ligandı, SR1001 uygulanan monositlerde *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımlarının azaldığı görüldü. *SPP1*, yüksek SR1001 konsantrasyonda baskılanırken *IKBKA*'nın düşük SR1001 konsantrasyonunda daha çok baskılandığı gözlemlendi (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: *SPP1* (solda) ve *IKBKA* (sağda) gen anlatımlarının, farklı SR1001 konsantrasyonlarında gösterdiği değişim.

4.5. Makrofaj Farklılaşması

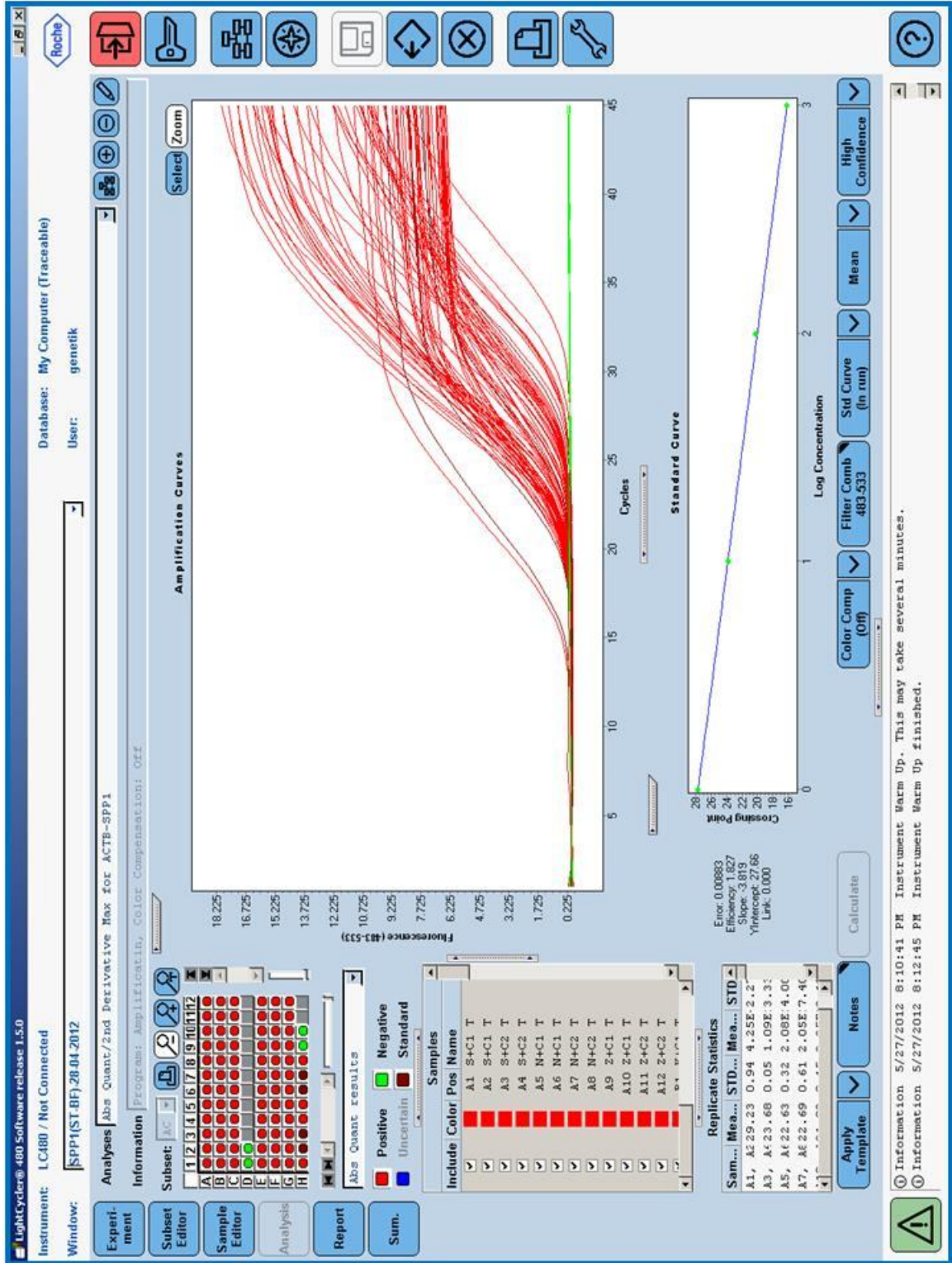
Farklı konsantrasyonda (10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM ve 500 nM) PMA içeren 2 ml RPMI-1640 besi yerlerinde bekletilen monosit hücreleri 24, 48 ve 72. saatlerde gözlemlenerek makrofaj farklılaşma süreçleri takip edildi. Morfolojik değerlendirme sonucunda, THP-1 monositlerinin makrofajlara farklılaşması için en uygun koşulun 200 nM PMA ile 48 saatlik uygulama olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4-4).



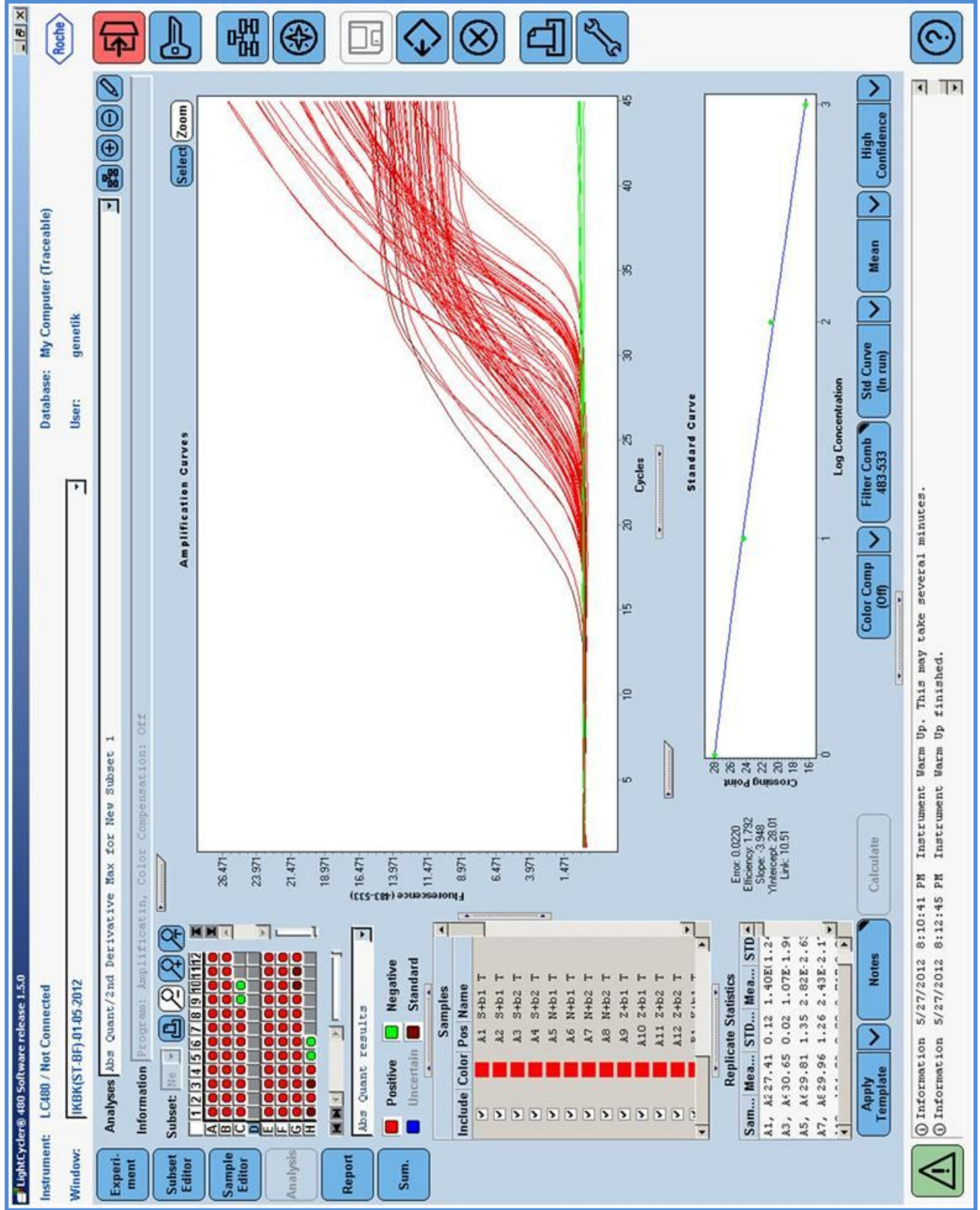
Şekil 4-4: Monositlerin PMA uygulaması ile makrofajlara farklılaşmaları

4.6. Nicel PZR Sonuçları

Referans gen olarak beta aktinin (ACTB) kullanıldığı ve hedef gen mRNA düzeyinin standart eğri üzerinden göreceli olarak hesaplandığı nicel PZR sonuçları, genel olarak makrofajda *SPPI* gen anlatımının *IKBKA*'ya göre daha yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 4-5 ve Şekil 4-6).



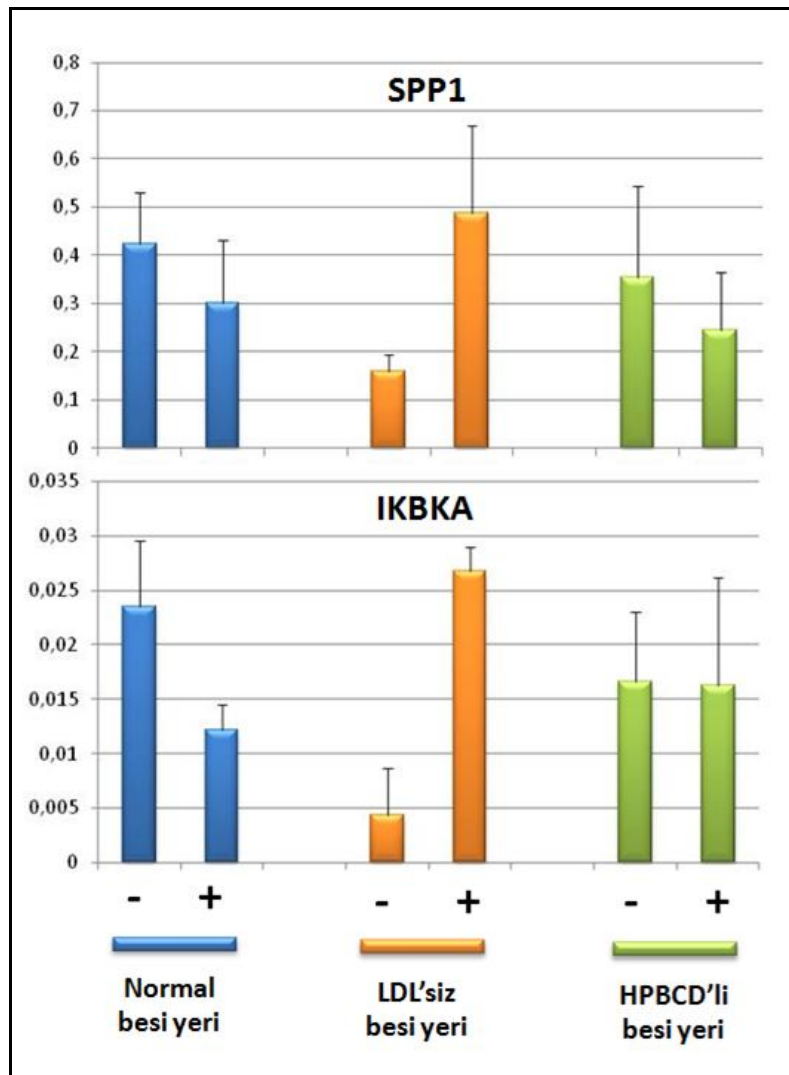
Şekil 4-5: Makrofağa *SPPI* mRNA düzeyinin nicel-PZR analizi



Şekil 4-6: Makrofajda *IKBKA* mRNA düzeyinin nicel-PZR analizi

4.6.1. Makrofajda SR1001'in Hedef Gen Anlatımına Etkisi

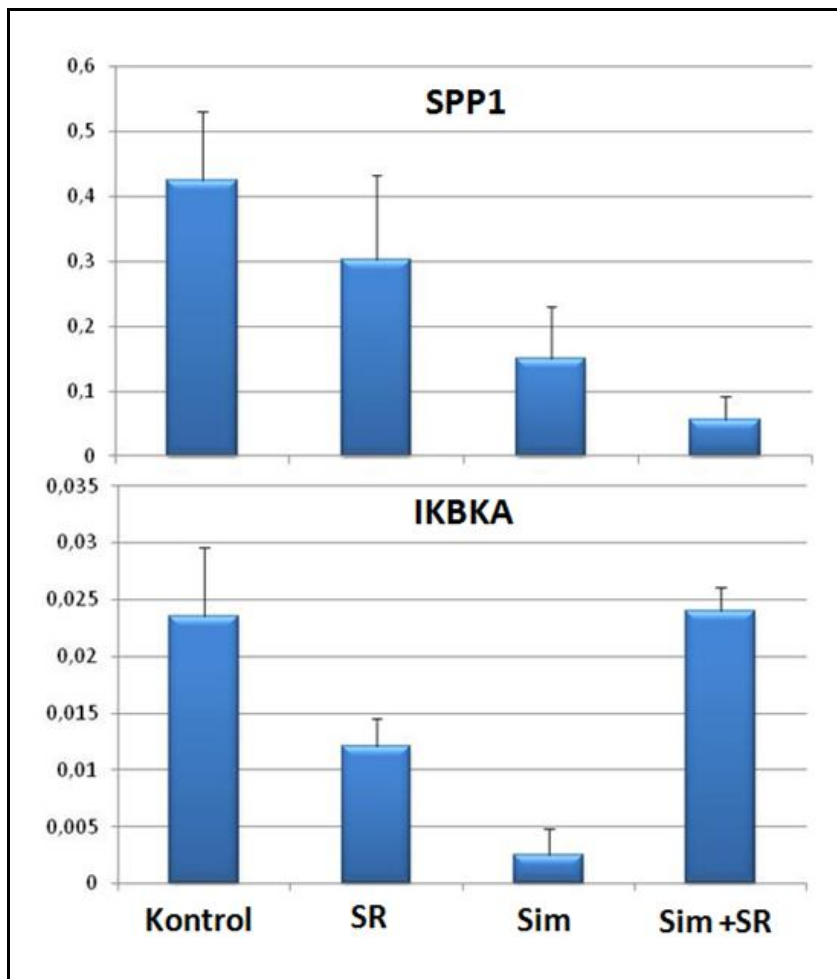
Normal besi yeri ortamında yapay ROR-alfa ligandı SR1001'in, monositlerde olduğu gibi makrofajlarda da *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımlarını baskıladığı görüldü. Dış kaynaklı (LDL) kolesterolün yokluğunda her iki genin de anlatımı önemli ölçüde düşerken, SR1001'in eklenmesi ile gen anlatımlarının yükseldiği ve normal düzeyine ulaştıkları dikkat çekti. Plazma zarına bağlı kolesterolün HPBCD ile uzaklaştırılması LDL yokluğu kadar olmasa da *SPP1* gen anlatımını baskıladığı görüldü. *IKBKA* ise HPBCD'li ortamda SR1001'den etkilenmedi (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: Farklı kültür koşullarında, SR1001'in *SPP1* ve *IKBKA* üzerine etkisi

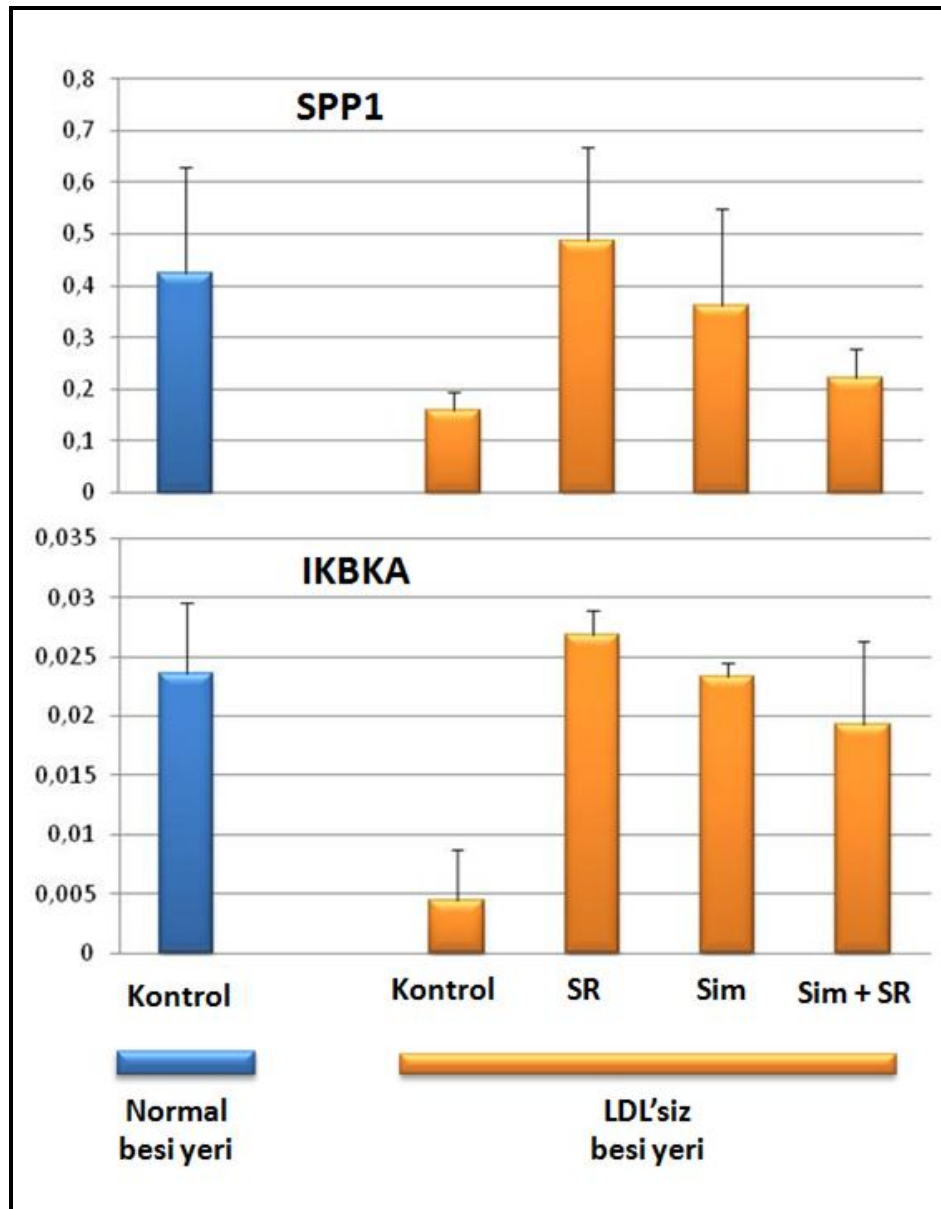
4.6.2. Simvastatinin Etkisi

Simvastatinin (Sim) *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımlarını baskıladığı ve bu baskılamanın yapay ROR-alfa ligandı olan SR1001'in (SR) baskılamasından daha fazla olduğu görüldü. Simvastatinin *SPP1* üzerindeki baskılama etkisi SR1001 varlığında daha da artış gösterirken, *IKBKA* üzerindeki baskılama etkisinin ortadan kalktığı ve *IKBKA* gen anlatımının normal düzeye çıktığı görüldü (Şekil 4-8).



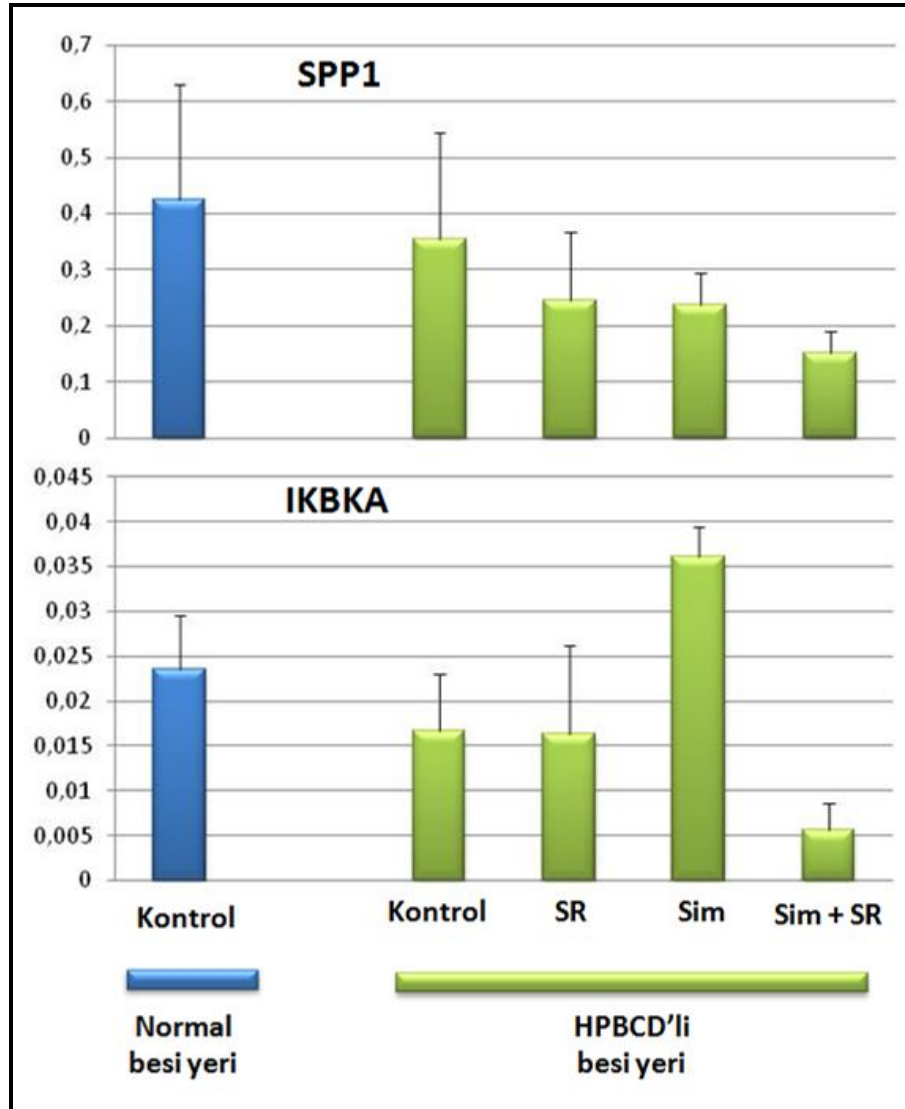
Şekil 4-8: Normal kültür koşullarında, simvastatin ve SR1001'in hedef genlere etkisi

Dış kaynaklı kolesterol (LDL) yokluğunun tek başına *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımlarını baskılamak için yeterli olduğu, ancak bu baskılanmanın, SR1001 ve simvastatin varlığında azaldığı görüldü. SR1001, hem *SPP1* hem de *IKBKA*'nın düzeyini normale çıkarırken, simvastatin ile birlikte uygulandığında her iki gen anlatımlarının baskılanmaya başladığı, fakat bu baskılanmanın LDL yokluğundaki kadar olmadığı dikkat çektii (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: LDL'siz koşulda, simvastatin ve SR1001'in hedef genlere etkisi

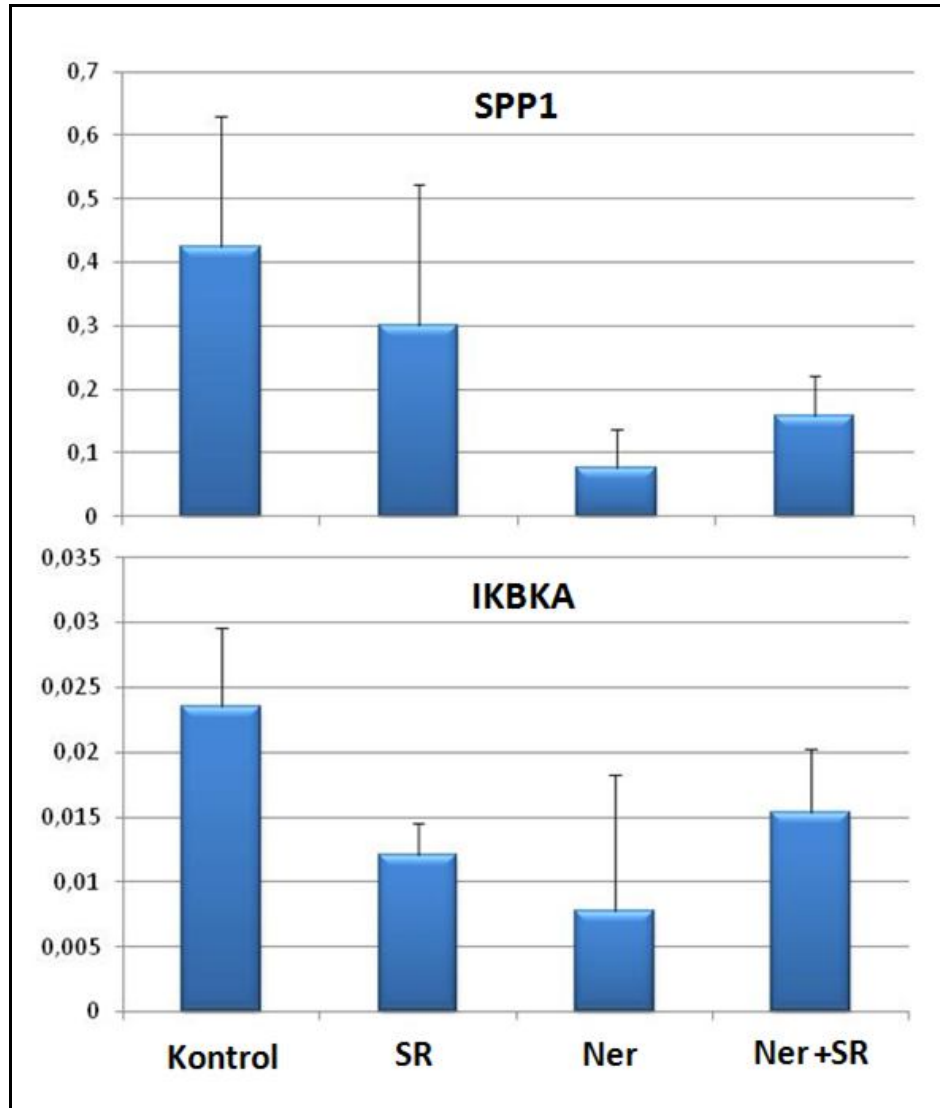
Membran kolesterolünün HPBCD aracılığıyla uzaklaştırılması, *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımlarında hafif bir azalmaya yol açarken, simvastatin ve SR 1001'in *SPP1* üzerindeki baskılama etkilerinin bu koşulda da devam ettiği görüldü. *IKBKA* gen anlatımı ise simvastatin varlığında artış gösterirken, simvastatin ve SR1001'in varlığında anlamlı derecede baskılanmıştır (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: HPBCD'li koşulda, simvastatin ve SR1001'in hedef genlere etkisi

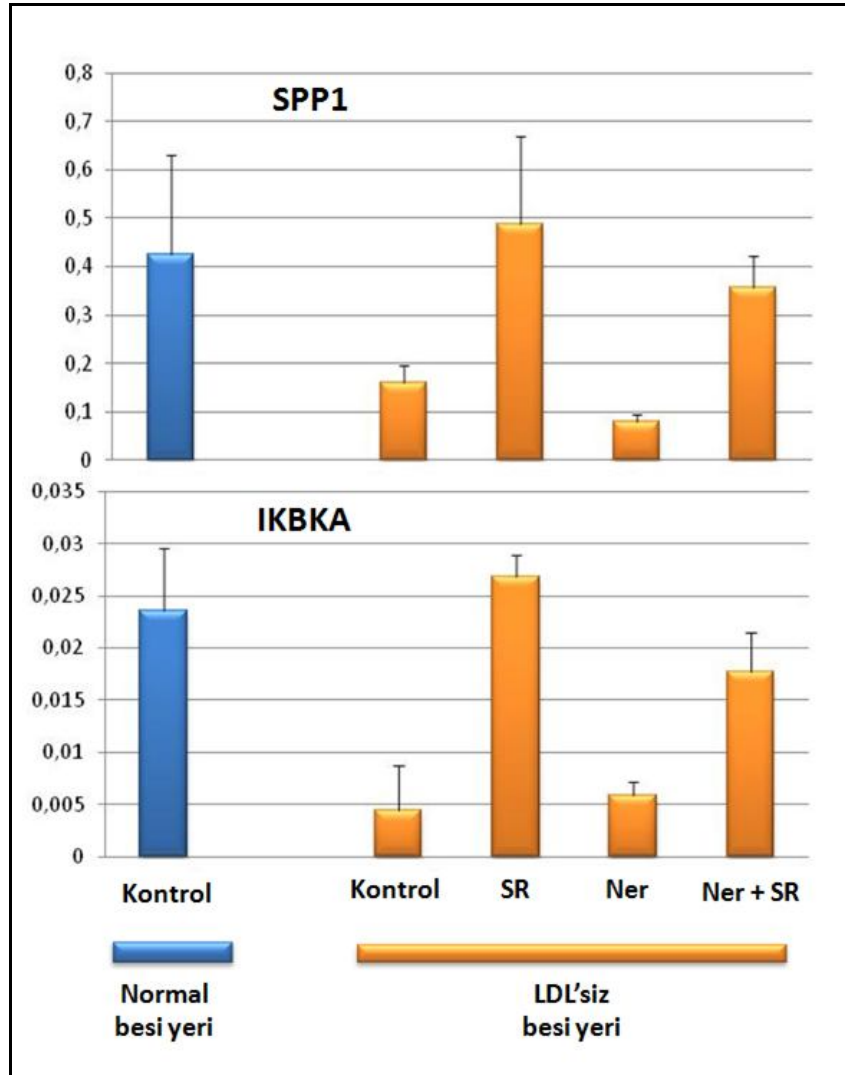
4.6.3. Neridronatın Etkisi

Neridronatın *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımları üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğu görüldü. Neridronatın bu baskılama etkisinin, *IKBKA*'da daha belirgin olmak üzere SR 1001 tarafından kısmen engellendiği görülmüştür (Şekil 4-11).



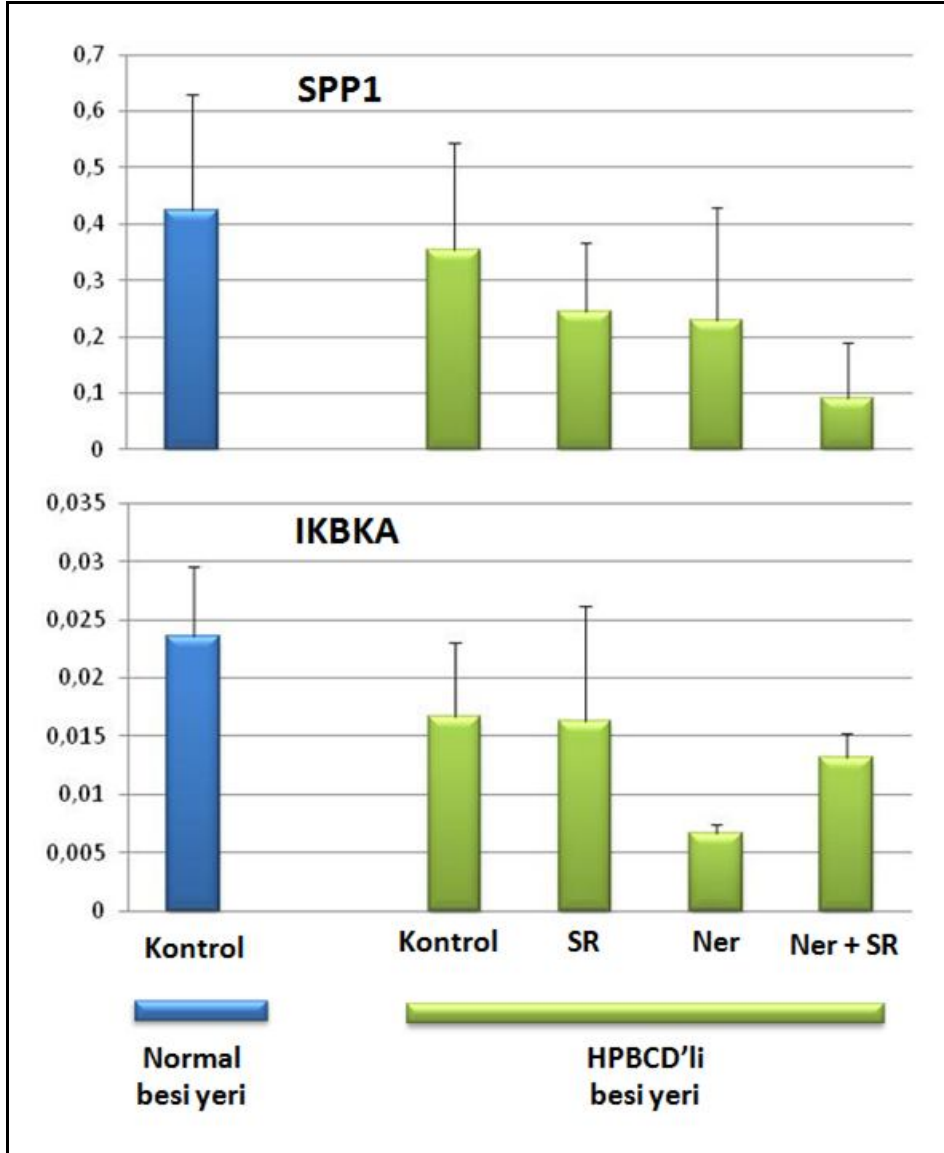
Şekil 4-11: Normal koşullarda, neridronatın ve SR1001'in hedef genlere etkisi

Dış kaynaklı kolesterol yokluğunun tek başına *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımlarında azalmaya yol açtığı ve neridronat varlığında da bu durumun devam ettiği görüldü. LDL yokluğunun yol açtığı baskılamanın, SR1001 tarafında ortadan kaldırıldığı dikkat çekti. SR1001'in LDL yokluğunda gösterdiği aktivatör etki, neridronat tarafında kısmen azalmıştır (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: LDL'siz koşulda, neridronatın ve SR1001'in hedef genlere etkisi

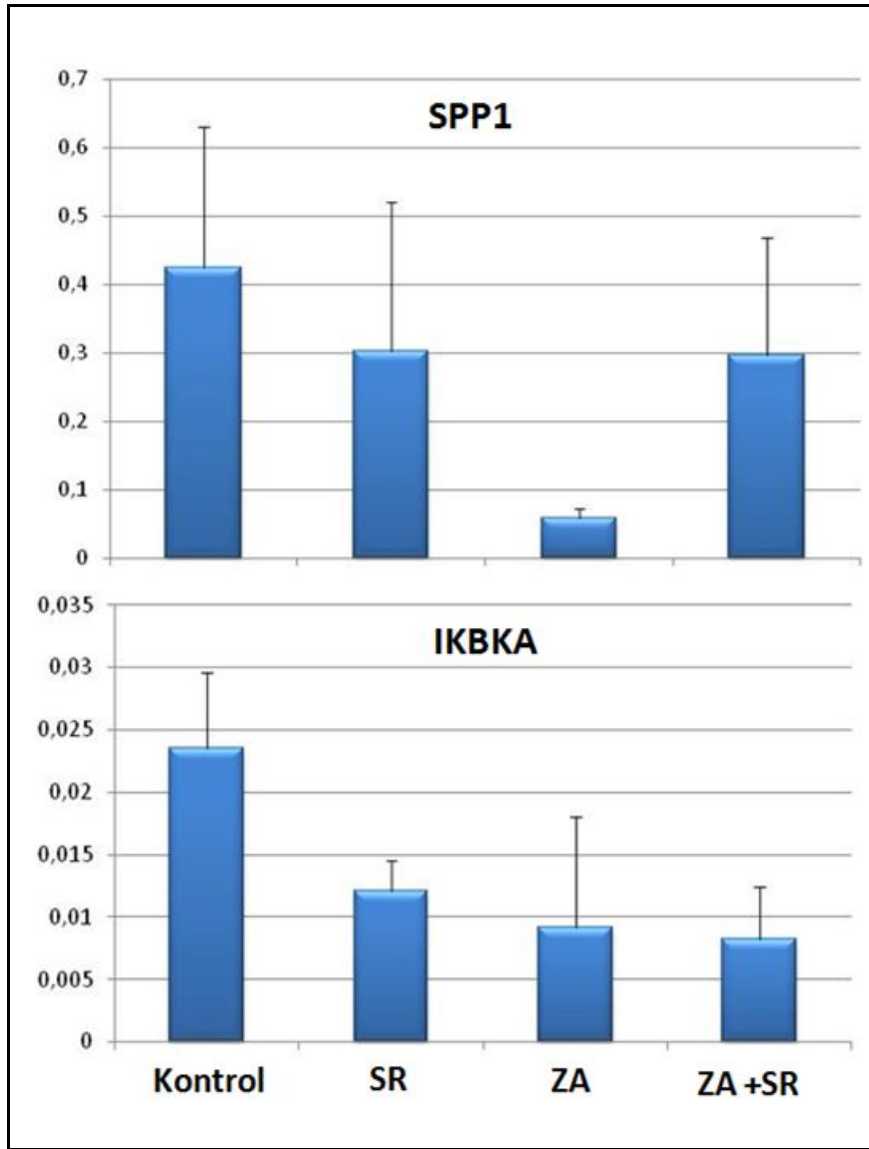
Membran kolesterolünün uzaklaştırıldığı durumda neridronatın *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımlarını baskılamaya devam ettiği görüldü. SR1001'in ise iki gen üzerinde de farklı etkisi olduğu gözlemlendi. SR1001, neridronatın *SPP1* üzerindeki baskılama etkisini arttırırken, *IKBKA* üzerindeki baskılama etkisini engellemiştir (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: HPBCD'li koşulda, neridronatın ve SR1001'in hedef genlere etkisi

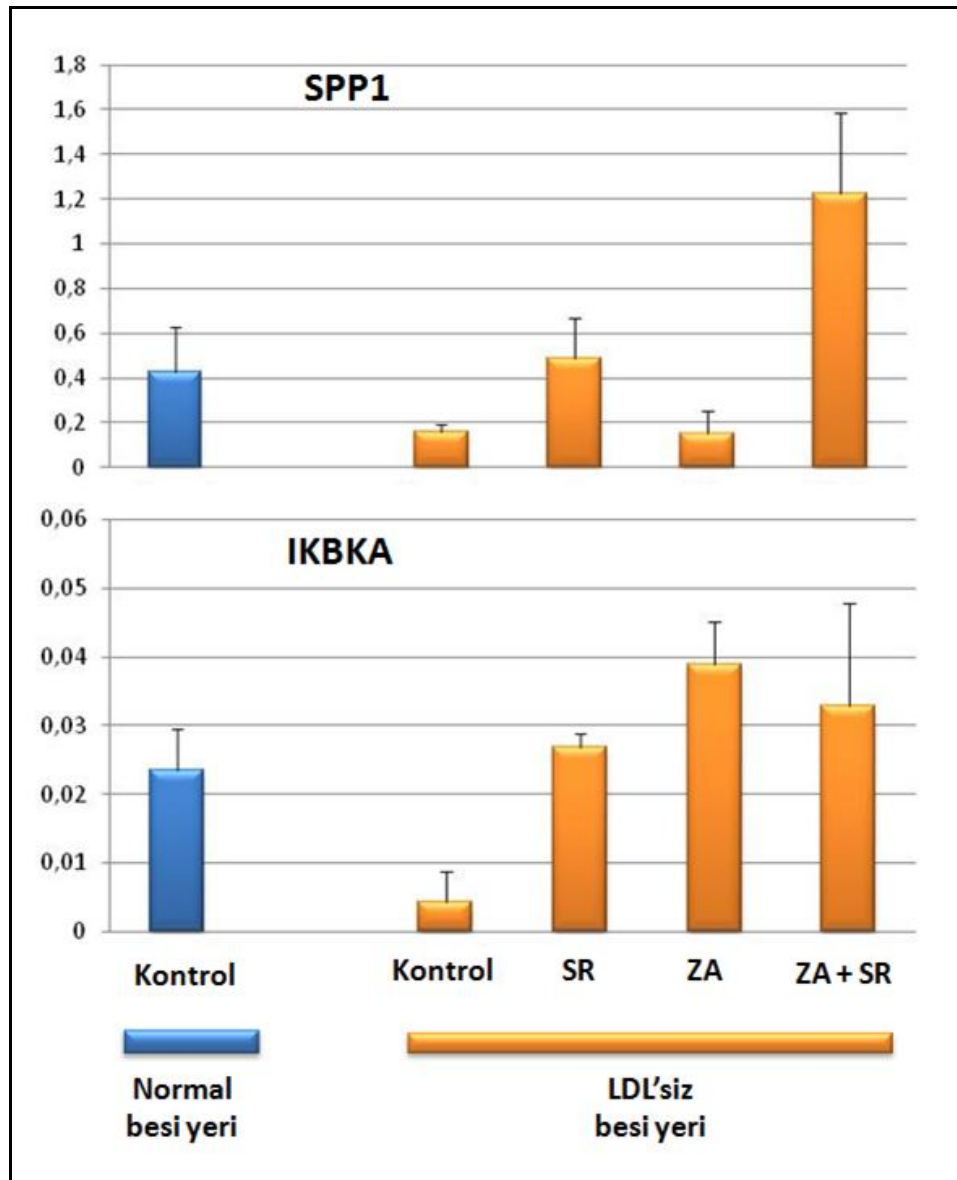
4.6.4. Zaragozik Asidin Etkisi

İç kaynaklı kolesterol sentezini baskılayan zaragozik asidin, *SPP1* gen anlatımında önemli derecede baskılanmaya yol açtığı, *IKBKA*'da ise bu baskılanmanın daha zayıf olduğu görüldü. Zaragozik asidin *SPP1* üzerindeki baskılama etkisi SR1001 varlığında kaybolurken, *IKBKA* üzerindeki baskılama etkisinin SR1001'den etkilenmediği dikkat çekti (Şekil 4-14).



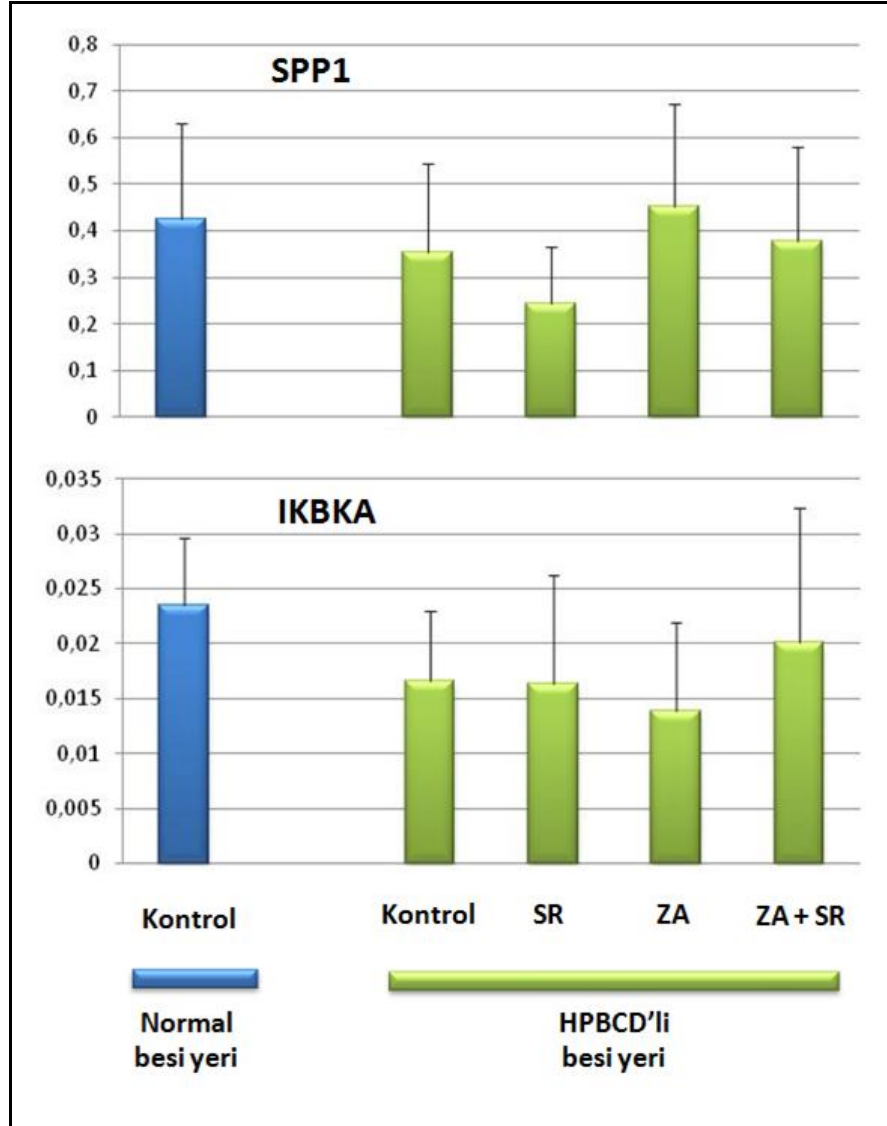
Şekil 4-14: Normal koşullarda, zaragozik asid ve SR1001'in hedef genlere etkisi

Dış kaynaklı kolesterol yokluğunun tek başına *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımlarını baskıladığı görüldü. LDL'siz besi yerinde zaragozik asidin baskılama özelliği *SPP1* için devam ederken *IKBKA*'da ortadan kaldığı gözlemlendi. SR1001 varlığı ise, zaragozik asidin *SPP1* üzerinde ki baskılama özelliğinin kaybolduğu, SR1001'in gen anlatımını yükselttiği dikkat çekti. *IKBKA*'da ise SR1001, zaragozik asidin neden olduğu artışı engelledi (Şekil 4-15).



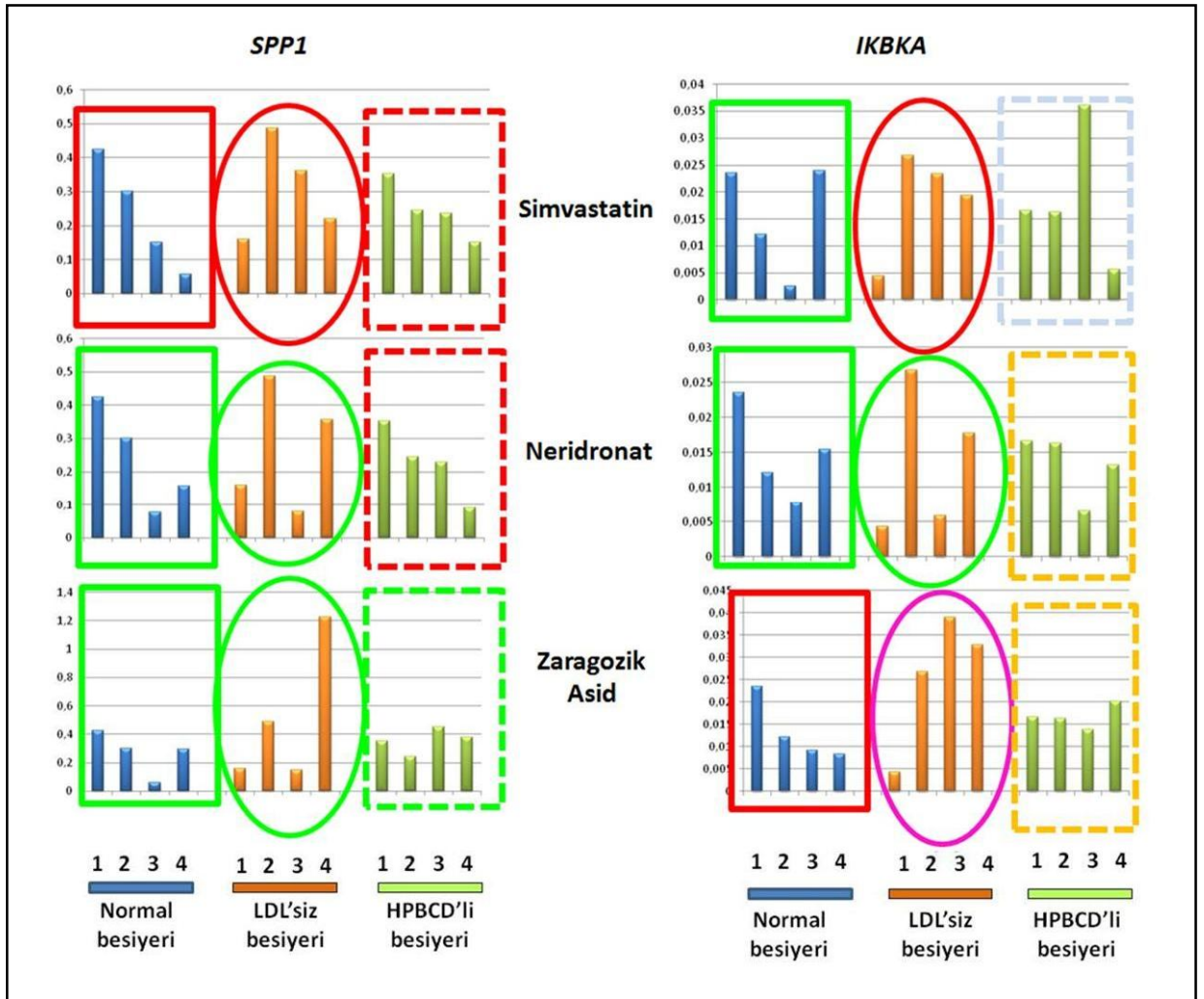
Şekil 4-15: LDL'siz koşulda, zaragozik asid ve SR1001'in hedef genlere etkisi

HPBCD'li ortamda, zaragozik asidin *SPP1* üzerindeki baskılama özelliğinin kalktığı, *IKBKA*'da ise zayıflayarak da olsa devam ettiği görüldü. SR1001 eklenmesi ise zaragozik asidin etkisini ters yönde etkilemiştir (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: HPBCD'li koşulda, zaragozik asid ve SR1001'in hedef genlere etkisi

Tüm sonuçlar karşılaştırıldığında, normal kültür koşulunda neridronatın *SPP1* üzerindeki etkisinin zaragozik asidin etkisi ile, *IKBKA* üzerindeki etkisinin ise simvastatinin etkisi ile benzer olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 4-17). Neridronatın *SPP1* üzerindeki etkisi ile zaragozik asidin etkisi arasındaki benzerlik LDL'siz koşulda da devam ederken, HPBCD'li koşulda simvastatinin etkisine benzer bir etki gösterdiği dikkati çekti. LDL'siz koşulda simvastatinin *IKBKA* ve *SPP1* üzerindeki etkileri benzerken, neridronatın da aynı koşulda iki gen üzerindeki etkileri benzer görünmektedir (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: Farklı koşullarda hedef gen anlatımlarındaki değişimlerin karşılaştırılması [1: Kontrol, 2: SR1001, 3: (Sim/Ner/ZA), 4: SR1001+(Sim/Ner/ZA)]

Simvastatin, neridronat ve zaragozik asidin *SPP1* ve *IKBKA* gen anlatımları üstündeki etkilerinde, SR1001 varlığına bağlı değişimler incelendiğinde, neridronat'ın *SPP1* üzerinde, zaragozik asid ile benzer bir etkisi olduğu dikkat çekmektedir. Bu benzerlik normal, LDL'siz ve HPBCD'li besi yeri ortamında da görülmüştür.

IKBKA ise, zaragozik asid varlığında SR1001'den yalnız HPBCD'li koşulda etkilenirken, normal kültür koşulunda simvastatin ve neridronat varlığında SR1001'den etkilenmektedir.

Tablo 4-1: Farklı (Normal, LDL'siz ve HPBCD'li) kültür koşullarında simvastatin, neridronat ve zaragozik asid varlığında hedef gen mRNA düzeylerinin SR1001'den etkilenme yönleri

	SPP1			
	SR1001 (-)	SR1001 (+)		
	Normal	Normal	LDL (-)	HPBCD (+)
Sim	↓	↓	↓	↓
Ner	↓	↑	↑	↓
ZA	↓	↑	↑	↓

	IKBKA			
	SR1001 (-)	SR1001 (+)		
	Normal	Normal	LDL (-)	HPBCD (+)
Sim	↓	↑	↓	↓
Ner	↓	↑	↑	↑
ZA	↓	↓	↓	↑

5. TARTIŞMA

Koroner kalp hastalıkları için en çok kabul edilen risk etmenlerinin başında yüksek kan kolesterol düzeyi gelir. LDL kolesterol düzeyindeki her mmol/L'lik düşüşün, koroner mortaliteyi % 20, genel olarak mortaliteyi % 12 oranında düşürdüğü gösterilmiştir (Baigent C ve ark 2005). Bu nedenle, koroner kalp hastalıklarını önlemek veya tedavi etmek için, LDL düzeyini kontrol altına almaya yönelik diyet önerilerinden, ilaç kullanımına, LDL aferezinden ileal baypasa kadar uzanan farklı tıbbi uygulamalar geliştirilmiştir. Bu uygulamalar içinde en yaygın olarak kullanılanlardan biri de statin tedavisidir.

Kolesterol biyosentezini, ilk basamağındaki HMG-KoA redüktaz enzimini baskılayarak engelleyen statinler, hücre içi kolesterol düzeyinin düşmesine ve hücrelerin kolesterol gereksinimlerinin artmasına neden olur. Hücrelerin, kolesterol gereksinimlerini karşılamak için dolaşımdan daha fazla LDL almaları, kan LDL düzeyinin düşmesi ile sonuçlanır (Istvan ES ve Deisenhofer J. 2001). Statinlerin kullanım amacı olan ve LDL düşürücü etki adı verilen bu etki, ilaç kullanımından 24 saat sonra ölçülebilir düzeye çıkar ve 6-7 gün sonra belirgin hale gelir. Kandaki LDL düşüşüne bağlı olarak da ateroskleroz gelişimi yavaşlamaya başlar. Ancak, statinlerin ateroskleroz gelişimini, 24 saat içinde de yavaşlatmaya başladığı dikkati çekmiştir. Ateroskleroz gelişimini yavaşlatmak dışında statinlerin, var olan aterosklerotik plağın kararlılığını artırma, trombosit kümelenmesini ve trombus gelişimini engelleme, anti-oksidan etki gibi diğer başka etkileri de saatler içinde gösterdiği anlaşılmıştır. Statin kullanımının erken aşamasında, LDL düşüşünden günler önce ortaya çıkan ve bu nedenle LDL azalmasından bağımsız geliştiği kabul edilen tüm bu etkiler, statinlerin çok yönlü etkisi olarak tanımlanmaktadır (Palaniswamy C ve ark 2010, Zhou Q ve Liao JK 2010).

Statinlerin çok yönlü etkisi, mevalonat yolağındaki ara bileşiklerin işlevleri ile açıklanmaktadır. Statinlerin hedef aldığı HMG-KoA redüktaz enzimi, yalnız kolesterolün değil, steroid yapıda olmayan izoprenoid bileşiklerinin de öncül maddesi olan mevalonatın sentezini katalizler.

Mevalonat yolağı ara bileşiklerinden olan izoprenoidler, kovalent olarak bağlandıkları Rho, Ras, Rab ve Rac gibi küçük GTPaz'ların hücresel zarlara

bağlanmalarını sağlayarak, reseptör aracılı sinyal iletiminde kilit rol oynarlar. Küçük GTPaz'ların rol aldığı sinyal ileti ağlarının son derece geniş bir etki alanına sahip olması, statinlerin çok yönlü etkilerini açıklamak için yeterli olasılık sağlamıştır (Van Aelst L 1997; Takai Y,2001). Bu nedenle, statinlerin çok yönlü etkisinde alternatif mekanizmaların araştırılmasına gereksinim duyulmamıştır. Benzer şekilde, mevalonat yolağını baskılayan ve kemik dokusuna olan yüksek ilgisi nedeniyle kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılan azot içerikli bifosfonatların da statinler gibi çok yönlü etkisi gözlenmiştir (Ylitalo R. 2000). Statinler kadar araştırılmamış olsa da bifosfonatların çok yönlü etkilerinin de kemik dokusu dışındaki hücrelerde steroid yapıda olmayan izoprenoidler ile açıklanmaktadır (Corrado A. 2007).

Statin ve bifosfonatların çok yönlü etkisinde izoprenoidlerin rolü artık kabul edilmiş olsa da, statin/bifosfonat kullanımından etkilenebilen hücre içi kolesterol düzeyinin olası etkisi de henüz dışlanamamıştır. Tez çalışmasında, aktivitesi hücre içi kolesterol düzeyine bağlı bir transkripsiyon faktörü olan ROR-alfa'nın, bifosfonat ve statinlerin çok yönlü etkisindeki olası rolünü incelenmeye çalışılmıştır.

Kolesterolün ROR-alfa ligandı olduğunun anlaşılmasıyla, statin veya bifosfonatların hücre içi kolesterol düzeyini düşürmesine bağlı olarak, ROR-alfa aktivitesinin de düşeceği düşünülmüştür. Fakat, azalan hücre içi kolesterol düzeyi LDLR üretimini hızlanmasına ve dışarıdan daha fazla kolesterol alınımına yol açtığı için, hücre içi kolesterol düzeyinin tekrar normal düzeye çıkacağı, bu nedenle de ROR-alfa aktivitesinde azalma olmayacağı öne sürülmüştür. Ancak, iç kaynaklı kolesterolün hücre içinde izlediği yol ile, hücreye LDLR aracılığıyla dışarıdan alınan kolesterolün izlediği yollar karşılaştırıldığında, hücre içi serbest kolesterole katkılarının eşit olmayabileceği de öne sürülebilir. Rhesus maymunlarında, statinlerin TLR yanıtı üzerindeki etkisinin izoprenoidlerden ayrı olarak kolesterole bağlı gerçekleştiğinin gösterilmesi (Van Der Putten C ve ark. 2011), statin ve bifosfonatların çok yönlü etkisinde hücre içi kolesterolün de rolü olabileceğini desteklemektedir.

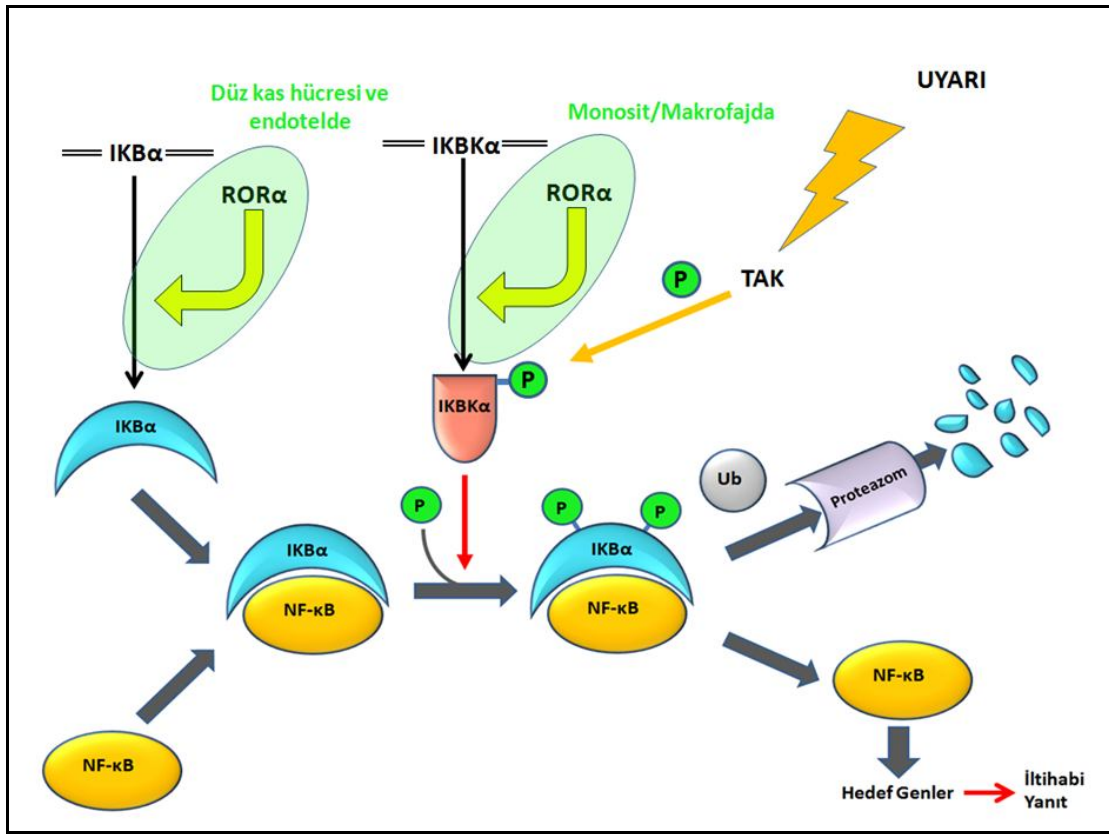
Tez çalışmasında, statinlerin çok yönlü etkilerinden en önemlileri olan anti-aterojenik ve anti-enflamatuar etkileri üzerinde odaklanılmış ve bu amaçla, ateroskleroz gelişiminde önemli rol oynayan makrofaj hücreleri ve bu hücrelerin aterosjenik işlevlerinde görev aldığı bilinen iki gen seçilmiştir. Bu genlerden biri, makrofajların göçü, fagositik aktivitesi ve sitokin salınımını etkilediği bilinen ve aterosklerotik plakta

yüksek düzeyde anlatımı olan *SPPI* geni (Liaw L ve ark 1994; Weber GF,2002), diğeri de iltihabi yanıtın düzenlenmesinde görev alan ve aterosklerotik plakta aktivitesi arttığı bilinen NF-κB'nin kinaz düzenleyicisi olan *IKBKA (CHUK)* genidir (Senftleben U ve ark 2001; Anest V ve ark 2003; Li T ve ark 2010).

SPPI geninin osteoblastlarda ROR-alfa hedef geni olduğu ve ROR-alfa'nın kemik gelişimindeki rolünden sorumlu olduğu biliniyor olmasına rağmen (Meyer T ve ark 2000), monosit/makrofaj hücrelerinde *SPPI*'in ROR-alfa ile ilişkisi bilinmemekteydi. *ChIP-array* sonuçları, biyoinformatik analizlerle *SPPI* promotorunda bulunan 4 farklı RORE dizisinden TSS noktasına en uzakta olan RORE'nin ROR-alfa'yı bağladığını göstermiştir. Yapay ROR-alfa ligandı kullanılarak yapılan nicel PZR analizleri de bu bağlanmanın işlevsel olduğunu göstermektedir. Normal damara oranla 173 katlık artış (Levula M ve ark 2012) ile aterosklerotik plakta anlatımı en fazla artan genlerden olan *SPPI*'in monositlerde ROR-alfa'nın doğrudan hedef geni olması, ROR-alfa'nın koroner kalp hastalıkları açısından önemini desteklemektedir.

Özellikle kanser ve iltihabi hastalıklardaki rolü nedeniyle ilgi çeken NF-κB sinyal yolağı, aterosklerozdaki rolü nedeniyle kalp-damar hastalıkları yönünden de ilgi çekmeye başlamıştır (Dabek J ve ark 2010). Bu yolağın temel bileşenleri olan NF-κB transkripsiyon faktörlerinin yanında, bu yolağı negatif ve pozitif yönde kontrol altında tutan IKB ve IKK proteinleri de ilgi çekmektedir. Diğer birçok transkripsiyon faktörlerinden farklı olarak NF-κB'ler hücrede sürekli üretim halindedir ve IKB aracılığıyla inaktif olarak tutulurlar. IKK kompleksi tarafından IKB'nin uzaklaştırılması, NF-κB sinyal yolağının uyarılara hızlı yanıt vermesini sağlayan en önemli etkidir. IKB ailesinin bir üyesi olan IKBA, damar düz kas hücrelerinde ROR-alfa hedef geni olduğu gösterilen ve *staggerer (Ror^{-/-})* mutant farelerdeki uzamış hümmoral yanıtta sorumlu olan genidir (Delerive P ve ark 2001). Tiazolidindion türevi yapay bir ROR-alfa ligandı olan CGP52608 uyarısı ile *Ikba* anlatımında artış olduğu ve bu artışın farelerde anti-artrit etki gösterecek kadar anlamlı olduğu da bildirilmiştir (Wiesenberg I ve ark 1995; Missbach M ve ark 1996). İ.Ü. 3680 nolu BAP projesi kapsamında yapılan *ChIP-array* sonuçları, *IKBA* geninin endotel hücrelerinde (HUVEC) de ROR-alfa hedef geni olduğunu, ancak monositlerde (THP-1) hedef gen olmadığını göstermiştir. NF-κB sinyal yolunu negatif yönde etkileyen *IKBA* yerine pozitif yönde etkileyen *IKBKA*'nın monositlerde ROR-alfa hedef geni olarak

bulunması, ROR-alfa'nın önceden gösterilen anti-enflamatuar rolü ile çelişkili görünmektedir (Şekil 5-1). IKK kompleksi, ancak belirli uyarılar varlığında NF-kappa B sinyal yolağını aktive ettiği için, *IKBKA* gen anlatımının ROR-alfa'ya bağlı olası artışı doğrudan iltihabi yanıtı neden olmaktan çok uyarı varlığında verilen yanıtın hızını veya derecesini etkileyecektir. Yine de, ROR-alfa ve *IKBKA* ilişkisinin gerçekten fizyolojik bir anlamı olduğunu söyleyebilmek için *IKBA* ile birlikte değerlendirilmesi ve mRNA düzeyi dışında protein aktivitesine de bakılması gerekmektedir.



Şekil 5-1: ROR-alfa'nın NF-κB aktivasyonu üzerindeki hücre tipine bağlı zıt yönlü etkisi. Düz kas hücreleri ve endotelde iltihabi yanıtı IKBA üzerinden baskılayan ROR-alfa, monosit/makrofajlarda iltihabi yanıtı IKBKA üzerinden hızlandırabilir.

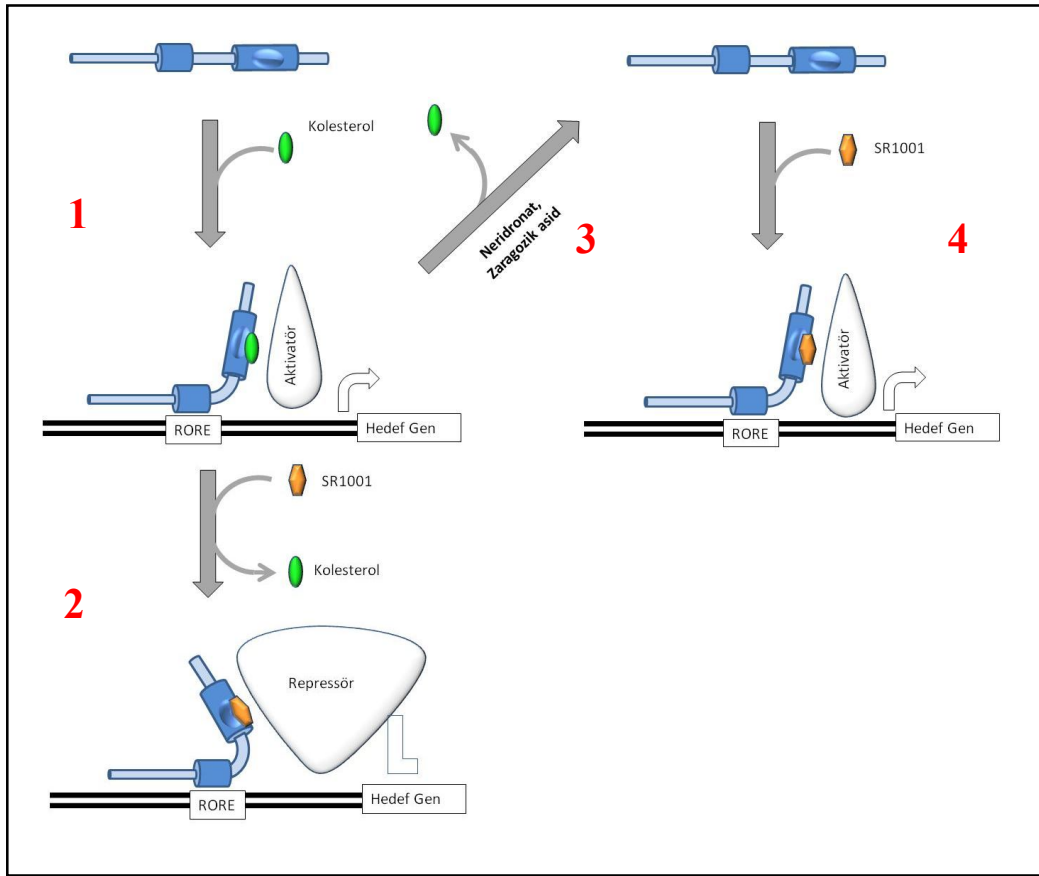
Monositte ROR-alfa hedef geni oldukları ve yapay ROR-alfa ligandı varlığında mRNA düzeyleri değiştiği görülen *SPPI* ve *IKBKA* genlerinin, statin ve bifosfonat varlığından da etkilendikleri görülmüştür. Her iki genin statin kullanımından etkilendiği daha önceden bildirildiği için, sonuçların literatür ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

Simvastatin ve neridronatın *SPPI* ve *IKBKA* gen anlatımları üzerine etkisini araştırırken, FPP ve GGPP gibi izoprenoid lipidlerin azalmasına bağlı olası etkinin dışlanması için, izoprenoid sentezini etkilemeden kolesterol sentezinin baskılandığı bir kontrol koşulu da çalışılmıştır. Bu amaçla, kolesterol sentezini daha ileriki bir adım olan skualeen sentaz aşamasında baskılayan zaragozik asid kullanıldı.

Zaragozik asid izoprenoid lipidleri etkilemeden kolesterol sentezini baskıladığı için, simvastatin ve neridronatın hücre içi kolesterol düzeyini değiştirerek neden olabileceği olası sonuçların, zaragozik asidin neden olacağı sonuçlara benzer olacağı varsayıldı. Bu nedenle öncelikle simvastatin ve neridronat ile aynı koşulda zaragozik asidin neden olduğu değişimler açıklanmaya çalışıldı ve bu sonuçlar referans olarak alındı. Zaragozik asid aracılığıyla iç kaynaklı kolesterol baskılanmaya çalışılırken, dış kaynaklı kolesterolün etkisini test etmek için LDL'siz serum ile hazırlanmış besi yerinde deney tekrarlanmıştır. Hücre içi serbest kolesterole kaynak olabilecek diğer bir yapı olan hücre zarındaki kolesterolü test etmek için de aynı koşul uygulanan üçüncü grup hücreye hidroksi propil beta siklodekstrin (HPBCD) uygulandı. Hidrofilik bir dış yüzey ve hidrofobik bir cep taşıyan siklodekstrinler, hidrofilik dış yüzeyi sayesinde yüksek çözünürlüğe sahipken, hidrofobik cebi aracılığıyla kolesterol gibi küçük hidrofobik molekülleri tutma ve taşıma özellikleri vardır. Bu nedenle siklodekstrinler, hücre yüzeyindeki kolesterol moleküllerini hücreden uzaklaştırabilme özelliğine sahiptir. HPBCD uygulanan hücrede önce membran kolesterolü, sonra hücre içi kolesterolü azalmaya başlar (Zidovetzki R ve Levitan I. 2007).

Normal kültür koşullarında SR1001'in *SPPI* ve *IKBKA* gen anlatımlarını baskılaması, ROR-alfa'nın antagonist bir ligandı olması ile açıklanabilir (Solt LA ve ark 2011). Ancak, hücre dışı kolesterol kaynağının olmadığı LDL'siz kültür koşullarında SR1001'in bu baskılama etkisinin kaybolması, SR1001'in ROR-alfa üzerinde antagonist etki gösterebilmesi için hücre dışı kolesterole gereksinim duyduğunu düşündürmektedir. Hücre dışı kolesterolün kısıtlandığı bu koşul altında, hücre içi kolesterol de zaragozik asid aracılığıyla kısıtlandığında, SR1001'in ROR-alfa üzerindeki etkisinin antagonist etkiden agonist etkiye döndüğü ve ROR-alfa'yı aktive ettiği görülmüştür. Bu bulgu, SR1001'in kolesterol varlığında ROR-alfa aktivitesini baskıladığını, kolesterol yokluğunda ise aktive ettiğini düşündürmektedir. SR1001'in ROR-alfa aktivitesini baskılaması, baskılayıcı proteinlerin (*co-repressor*) ROR-alfa'ya

bağlanmasını sağlayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Solt LA ve ark. 2011). SR1001'in, kolesterol varlığında ROR-alfa'yı baskılayıp, kolesterol yokluğunda aktive etmesi, ROR-alfa ligand bağlama bölgesine ligand olarak bağlandığında yol açtığı biçimsel değişikliğin, bağlı bulunan bir ligandı uzaklaştırarak yerine geçtiğinde yol açtığı biçimsel değişiklikten farklı olması ve ilk durumda baskılayıcı (*co-repressor*), ikinci durumda aktive edici (*co-activator*) proteinlerin bağlanmasına yol açması şeklinde açıklanabilir (Şekil 5-2). Diğer yapay ve doğal ROR-alfa ligandlarının kullanılacağı çalışmalar, bu bulgunun açıklanması için gerekecektir.



Şekil 5-2: Neridronat ve zaragozik asid varlığında SR1001'in hedef gen aktivasyonunu tetiklemesinin olası mekanizması. Normal koşullarda (1) kolesterolün ROR-alfa'ya bağlanması, ROR-alfa'nın DNA'ya bağlanmasını ve aktivatör (SRC2) ile etkileşimine neden olur. Bu durumda, ilgisi daha yüksek başka bir ligandın (SR1001) eklenmesi, DNA üzerindeki ROR-alfa'da ligand değişimine neden olur (2). Ligand değişiminin neden olduğu biçimsel değişiklik, repressör (NCoR) bağlanmasına yol açar. Kolesterolün uzaklaştırıldığı durumda (3) ise, SR1001 doğrudan serbest ROR-alfa'ya bağlanır ve ROR-alfa'nın aktivatör (SRC2) etkileşimi ile sonuçlanan biçimsel değişiklik yapar (4).

Simvastatin ve neridronatın *SPP1* gen anlatımı üzerindeki etkilerine bakıldığında, neridronatın etkisi ile zaragozik asidin etkisi arasındaki benzerlik dikkati çekmektedir (Şekil 4-17). Normal ve LDL'siz koşulda zaragozik aside benzer etki gösteren neridronatın, HPBCD varlığında ise simvastatine benzer bir etki gösterdiği de dikkati çekmektedir. Simvastatinin *SPP1* üzerindeki etkisinde mevalonat veya izoprenoidlerin daha baskın olduğu söylenebilir. Neridronatın ise zaragozik asid gibi mevalonattan bağımsız, kolesterole bağımlı etkisi yanında, simvastatin gibi izoprenoid aracılı etkisi de olduğu görülmektedir. LDL'siz koşulda *SPP1* üzerindeki baskılama etkisinin SR1001 varlığında ortadan kalkması, neridronatın kolesterole bağlı etkisinde ROR-alfa'nın rolü olabileceğini göstermektedir. Statinlerin aortik sklerozlu hastalarda, hipertansiyon hastalarında ve hiperkolesterolemik hastalarda *SPP1* düzeyini düşürdüğünü gösteren çalışmalar (Tanaka N ve ark. 2006; Lorenzen JM ve ark. 2009; Hamilton AM ve ark. 2010), statin ve bifosfonatların çok yönlü etkilerinde *SPP1*'in önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Zaragozik asidin *IKBKA* üzerindeki etkisine bakıldığında, *SPP1*'de olduğu gibi baskılandığı görülür. Neridronatın *SPP1*'i zaragozik asidden daha fazla, simvastatinin de neridronattan daha fazla baskılaması, izoprenoidlerin baskın olduğunu düşündürmektedir. Ancak, bu baskılanmanın ROR-alfa ligandı SR1001 varlığındaki değişimi ROR-alfa'nın kolesterolden bağımsız etkisi de olabileceğini akla getirmektedir. Zaragozik asidin *SPP1* üzerindeki baskılama etkisi SR1001 varlığından etkilenmezken, neridronat ve simvastatinin *SPP1* üzerindeki baskılama etkisinin SR1001'den etkilendiği ve bu etkilenmenin simvastatinde çok daha belirgin olduğu dikkati çekmektedir. Simvastatinin *SPP1* üzerindeki baskılama etkisinin, membran kolesterolünün uzaklaştırıldığı durumda ortadan kalkması, hücre içi serbest kolesterol dışında membrana bağlı kolesterolün de bu süreçte rol oynayabileceğini akla getirmektedir. ROR-alfa'nın farklı izoformlarının hücre içi dağılımları arasında fark olduğu, ROR-alfa1'in çekirdek dışında, hücresel zarlara da bağlı bulunabildiği (Aschrafi A ve ark 2006) dikkate alınırsa, membran yerleşimli kolesterolün ROR-alfa için ligand olabileceği veya ROR-alfa'nın transkripsiyon kontrolü dışında non-genomik etkileri de olabileceği düşünülebilir.

Simvastatin, neridronat ve zaragozik asidin *SPP1* ve *IKBKA* üzerindeki etkileri, SR1001 varlığı açısından incelendiğinde (Tablo 4-1), neridronatın *SPP1* üzerindeki etkisinin, zaragozik asid gibi SR1001'e bağlı olduğu görülür. Bu da, neridronatın *SPP1* gen anlatımını kolesterol ve ROR-alfa aracılığıyla etkiliyor olabileceğini göstermektedir. *IKBKA* geninde ise simvastatin ve neridronatın SR1001'den etkilenmesine rağmen zaragozik asidin etkilenmemesi, statin ve bifosfonatların ROR-alfa aracılığıyla, fakat kolesterolden bağımsız etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Statinlerin *IKBKA* gen anlatımı üzerindeki etkileri konusunda yeterli çalışma olmasa da, IKK kompleksinin aktivitesi ile statinlerin çok yönlü etkileri arasındaki ilişki bilinmektedir (Ortego M, 2005). Statinlerin gerek *IKBKA* aktivitesi, gerekse *SPP1* düzeyi ile ilişkisinde (Kawamura H, 2004, Ghosh-Choudhury N2006) Ras ve PI3K'nin rol oynadığı da bilinmektedir. Statin ve bifosfonatların kolesterolden bağımsız olarak etkiledikleri Ras ve PI3K gibi sinyal yollarının osteopontin (*SPP1*), NF- κ B ve ROR-alfa'yı etkiliyor olması (Kawamura H,2004; Ghosh-Choudhury N, 2006; Lechtken A, 2007), kolesterol ve ROR-alfa'ya bağlı etkilerin izoprenoidler tarafından gölgelenmiş olabileceğini de düşündürür.

Makrofajlarda *SPP1* ve *IKBKA* genlerini ROR-alfa hedef genleri olduğunu gösteren tez çalışması, statin ve bifosfonat grubu ilaçların çok yönlü etkisinde, ROR-alfa'nın kolesterole bağımlı veya kolesterolden bağımsız rol oynayabileceğini de göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Adami S., Braga V., Guidi G., Gatti D., Gerardi D., Fracassi E. (2000). Chronic intravenous aminobisphosphonate therapy increases high-density lipoprotein cholesterol and decreases low-density lipoprotein cholesterol. *J Bone Miner Res*, 15, pp. 599-604
- Ahn KS, Sethi G, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2008). Simvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand through modulation of NF-kappaB pathway. *Int J Cancer*. Oct 15;123(8):1733-40.
- Alpy F, Tomasetto C (2005). Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J Cell Sci*;118:2791–2801.
- Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD, Baldwin AS. (2003). A nucleosomal function for I κ B kinase α (IKK α) is essential for NF- κ B dependent gene expression. *Nature* 423: 659-663.
- Aschrafi A, Meindl N, Firla B, Brandes RP, Steinhilber D (2006). Intracellular localization of ROR α is isoform and cell line-dependent. *Biochim Biophys Acta*. Aug;1763(8):805-14. Epub 2006 May 17.
- Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, ve ark. (2005). Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*.;366(9493):1267-78.
- Bain, DL, Heneghan, AF, Connaghan-Jones, KD, Miura, M.T., (2007). Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 201–220.
- Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E, Horgan CM (2000). Analysis of the α 4 β 1 integrin-osteopontin interaction. *Exp Cell Res*.;258:342–51.
- Becker-Andre, M., I. Wiesenberg, N. Schaeren-Wiemers, E. Andre, M. Missbach, J.-H. Saurat & C. Carlberg. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 269: 28531–28534.
- Bulyanko YA, O'Malley BW (2010). Nuclear Receptor Coactivators: Structural and Functional Biochemistry. *Biochemistry*.

- Boukhtouche F., Doulazmi M., Frederic F., Dusart I., Brugg B., Mariani J. (2006) RORalpha, a pivotal nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: from development to ageing *Cerebellum*, 5, pp. 97–104
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J. K., DeLamarter, J. F. ve Becker-Andre, M. (1994) RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endo.* 8, 757±770
- Carson-Jurica, M.A., Schrader, W.T., O'Malley, B.W., (1990). Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr. Rev.* 11, 201–220.
- Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D ve ark. (2001). The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science*; 294:1731–5.
- Chauvet C, Bois-Joyeux B, Berra E, Pouyssegur J, Danan JL. (2004) The gene encoding human retinoic acid-receptor-related orphan receptor alpha is a target for hypoxia-inducible factor 1. *Biochem J.* Nov 15;384(Pt 1):79-85.
- Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. (1999) New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*; 84: 413-428.
- Corrado A., Santoro N., Cantatore F.P.. (2007) Extra-skeletal effects of bisphosphonates. *Joint Bone Spine*, 74, pp. 32-38
- Dąbek J, Kułach A, Gąsior Z. (2010) Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB): a new potential therapeutic target in atherosclerosis? *Pharmacol Rep.* Sep-Oct;62(5):778-83. Review.
- Delerive P., Monte D., Dubois G., Trottein F., Fruchart-Najib J., Mariani J., ve ark. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response *EMBO Rep.*, 2 (2001), pp. 42–48
- Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, ve ark. (1998) Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/ TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA.*;279(20):1615–22.
- Endo A. (199) The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res.*;33(11):1569–82.
- Evans R.M. (1988) The steroid and thyroid-hormone receptor superfamily, *Science* 240 889–895.

- Evans, R., (2005). The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol. Endocrinol.* 19, 1429–1438.
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* Dec;58(4):685-704. Review.
- Germershausen JI, Hunt VM, Bostedor RG, Bailey PJ, Karkas JD, Alberts AW (1989). Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*; 158: 667 - 675.
- Ghosh-Choudhury N, Mandal CC, Choudhury GG (2007). Statin-induced Ras activation integrates the phosphatidylinositol 3-kinase signal to Akt and MAPK for bone morphogenetic protein-2 expression in osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* Feb 16;282(7):4983-93. Epub 2006 Dec 19.
- Ghosh-Choudhury N, Mandal CC, Ghosh-Choudhury N, Ghosh Choudhury G (2010). Simvastatin induces derepression of PTEN expression via NFkappaB to inhibit breast cancer cell growth. *Cell Signal.* 2010 May;22(5):749-58. Epub Jan 11.
- Giguere V. (1999), Orphan nuclear receptors: from gene to function, *Endocr. Rev.* 20 689–725
- Goldstein JL, Brown MS. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.*; 343(6257): 425-430.
- Goldstein JL, Brown MS. (2009) The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;29:431–438.
- Hamilton AM, Boughner DR, Drangova M, Rogers KA.(2010) Statin treatment of hypercholesterolemic-induced aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Pathol.* 2011 Mar-Apr;20(2):84-92. Epub Feb 18.
- Hamilton BA, Frankel WN, Kerrebrock AW, Hawkins TL, FitzHugh W, Kusumi K, ve ark. (1996). Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature.* 1996 Feb 22;379(6567):736-9. Erratum in: *Nature* May 23;381(6580):346.
- Hayden MS, Ghosh S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.*;132:344-362.
- Hu Y, Baud V, Delhase M, ve ark. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science.*;284:316-320.
- Istvan ES, Deisenhofer J. (2001) Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*; 292: 1160-1164.

- Jakel H, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. (2006) Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha as a therapeutic target in the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. *Drug News Perspect.* Mar;19(2):91-7. Review.
- Jetten AM, Joo JH. (2006) Retinoid-related orphan receptors (RORs): roles in cellular differentiation and development. *Adv Devel Biol* 16: 314–354,.
- Jetten AM. (2009) Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e003. Epub Apr 3. Review.
- Joy TR, Hegele R: (2009) Narrative review: statin-related myopathy. *Ann Intern Med,* , 150, 858–868.
- Kallen JA, Schlaeppi J, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I ve ark. (2002) .X-ray structure of the RORa LBD at 1.63Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORa. *Structure* 10: 1697–1707,
- Kallen J, Schlaeppi JM, Bitsch F, Delhon I, Fournier B. (2004) Crystal structure of the human RORalpha Ligand binding domain in complex with cholesterol sulfate at 2.2 Å. *J Biol Chem* 279: 14033–14038.
- Karin M, Ben-Neriah Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.*;18:621-663.
- Kawamura H, Yokote K, Asami S, Kobayashi K, Fujimoto M, Maezawa Y ve ark.. (2003) High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):276-81. Epub Dec 11.
- Kim EJ, Yoo YG, Yang WK, Lim YS, Na TY, Lee IK, ve ark. (2008). Transcriptional activation of HIF-1 by RORalpha and its role in hypoxia signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct;28(10):1796-802. Epub 2008 Jul 24.
- Klar J, Asling B, Carlsson B, Ulvsbäck M, Dellsén A, Ström C, ve ark. (2005). RAR-related orphan receptor A isoform 1 (RORa1) is disrupted by a balanced translocation t(4;15)(q22.3;q21.3) associated with severe obesity. *N. Eur J Hum Genet.* Aug;13(8):928-34
- Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, ve ark. (2004). Evidence for antiinflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. *Blood.*;103:4188-4194.

- Kurebayashi S, Ueda E, Sakaue M, Patel DD, Medvedev A, Zhang F, ve ark. 2000. Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10132–10137,
- Lange Y, Steck TL. (2008) Cholesterol homeostasis and the escape tendency (activity) of plasma membrane cholesterol. *Prog Lipid Res*;47:319–332.
- Lau P., Bailey P., Dowhan D.H., Muscat G.E. (1999) Exogenous expression of a dominant negative RORalpha1 vector in muscle cells impairs differentiation: RORalpha1 directly interacts with p300 and myoD *Nucleic Acids Res.*, 27, pp. 411–420
- Lau P, Fitzsimmons RL, Raichur S, Wang SC, Lechtken A, Muscat GE (2008). The orphan nuclear receptor, RORalpha, regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity. *J Biol Chem.* Jun 27;283(26):18411-21. Epub 2008 Apr 25.
- Lazzerini PE, Lorenzini S, Selvi E, Capecchi PL, Chindamo D, Bisogno S, ve ark.(2007). Simvastatin inhibits cytokine production and nuclear factor-kB activation in interleukin 1beta-stimulated synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* Sep-Oct;25(5):696-700.
- Lechtken A, Hörnig M, Werz O, Corvey N, Zündorf I, Dingermann T, ve ark. (2007) Extracellular signal-regulated kinase-2 phosphorylates RORalpha4 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jul 6;358(3):890-6. Epub May 11.
- Lehto M, Olkkonen VM. (2003) The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signalling. *Biochim Biophys Acta*;1631:1–11.
- Levula M, Oksala N, Airla N, Zeitlin R, Salenius JP, Järvinen O. (2012) Genes involved in systemic and arterial bed dependent atherosclerosis--Tampere Vascular study. *PLoS One.*;7(4):e33787. Epub 2012 Apr 11.
- Li T, Morgan MJ, Choksi S, ve ark. (2010) MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol.*;11:799-805.
- Liao JK. (2005) Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol.* Sep 5;96(5A):24F-33F. Review.

- Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. (1994) Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res.*;74:214–24.
- Lind U, Nilsson T, McPheat J, Stromstedt PE, Bamberg K, Balendran C ve ark. (2005). Identification of the human ApoAV gene as a novel RORalpha target gene. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 233–241
- Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, ve ark. (2008). SEARCH Collaborative Group. SLC01B1 variants and statin-induced myopathy – a genomewide study. *N Engl J Med.*;359(8):789–99.
- Liu ZQ, Liu B, Yu L, Wang XQ, Wang J, Liu HM. (2011) Simvastatin has beneficial effect on pulmonary artery hypertension by inhibiting NF-kB expression. *Mol Cell Biochem.* Aug;354(1-2):77-82. Epub 2011 Apr 5.
- Lomashvili KA, Monier-Faugere MC, Wang X, Malluche HH, O'Neill WC. (2009) Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney Int.* 2009 Mar;75(6):617-25. Epub Jan 7.
- Lowik CW, van der Pluijm G, van der Wee-Pals LJ, van Treslong-De Groot HB, Bijvoet OL. (1988) Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: the effect of a bisphosphonate. *J Bone Miner Res.* Apr;3(2):185-92.
- Lu Y, Wahl LM. (2005) Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKK α /NF-kB pathway. *J Leukoc Biol*;78:259-65.
- Mandosi E, Fallarino M, Gatti A, Carnovale A, Rossetti M, Lococo E, ve ark. (2010) Atorvastatin downregulates monocyte CD36 expression, nuclear NFkappaB and TNFalpha levels in type 2 diabetes. *Atheroscler Thromb.* Jun 30;17(6):539-45. Epub 2010 Feb 5.
- Mesmin B, Maxfield FR. (2009) Intracellular sterol dynamics. *Biochim Biophys Acta*;1791:636–645.
- Meyer T, Kneissel M, Mariani J, Fournier B. (2000). In vitro and in vivo evidence for orphan nuclear receptor RORalpha function in bone metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9197–9202.
- Missbach M, Jagher B, Sigg I, Nayeri S, Carlberg C, Wiesenberg I (June 1996). "Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z

- receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha with potent antiarthritic activity". *J. Biol. Chem.* 271 (23): 13515–22.
- Montagnani A., Gonnelli S., Cepollaro C. ve ark.(2003) Changes in serum HDL and LDL cholesterol in patients with Paget's bone disease treated with pamidronate. *Bone*, 32, pp. 15-19
- Morimoto J, Kon S, Matsui Y, Uede T. (2010) Osteopontin; as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Drug Targets*; 11:494–505.
- Muroya T, Ihara Y, Ikeda S, Yasuoka C, Miyahara Y, Urata Y, ve ark. (2003) Oxidative modulation of NF-kappaB signaling by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*;309:900-5.
- Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M. (2008) Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. *Clin Pharmacokinet.*;47(7):463-74. Review.
- Ohoka N, Kato S, Takahashi Y, Hayashi H, Sato R. (2009) The orphan nuclear receptor RORalpha restrains adipocyte differentiation through a reduction of C/EBPbeta activity and perilipin gene expression. *Mol Endocrinol.* Jun;23(6):759-71. Epub 2009 Mar 26.
- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.*;83: 8819–23.
- Ordóñez-Morán P, Muñoz A. (2009) Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle.* Jun 1;8(11):1675-80. Review.
- O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. (199) Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol*; 162:1024–31.
- Oskarsson B. (2011) Myopathy: five new things. *Neurology.*;76(7 Suppl 2):S14–9.
- Palaniswamy C, Selvaraj DR, Selvaraj T, Sukhija R (2010). Mechanisms underlying pleiotropic effects of statins. *Am J Ther.* Jan-Feb;17(1):75-8. Review.
- Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, ve ark. (1989). Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med.*;170:145–61.

- Peake KB, Vance JE. (2010) Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Lett.* Jul 2;584(13):2731-9. Epub 2010 Apr 21. Review.
- Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. (2005) Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem.*;280:7317-7325
- Price PA, Faus SA, Williamson MK. (2001) Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, pp. 817-824
- Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. (2008) Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab*;8:512-521.
- Raspe E., Duez H., Gervois P., Fievet C., Fruchart JC, Besnard S. (2001) Staels Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by the orphan nuclear receptor RORalpha. *J. Biol. Chem.*, 276, pp. 2865-2871
- Reszka AA, Rodan GA. (2003) Mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Osteoporos Rep.* Sep;1(2):45-52. Review.
- Romano M, Diomedede L, Sironi M, ve ark. (2000) Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest.*;80:1095-1100.
- Rosenson RS, Tangney CC, Casey LC (1999). Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. *Lancet.*;353:983-984.
- Russell RG, Rogers MJ, Frith JC ve ark. (1999) The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res*, 14 (Suppl 2), pp. 53-65
- Russell RG. (2007) Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics.* Mar;119 Suppl 2:S150-62. Review.
- Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. (2008) Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*;19:733-59.
- Russell RG. (2011) Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* Jul;49(1):2-19. Epub 2011 May 1. Review.
- Rutishauser J. (2011) Statins in clinical medicine. *Swiss Med Wkly.* Nov 21;141:w13310. doi: 10.4414/smw.2011.13310. Review.

- Senftleben U, Cao Y, Xiao G, ve ark. (2001) Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*;293:1495-1499.
- Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. (1979) Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*. 16:885–93.
- Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, ve ark. (2003): ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, , 361, 1149–1158.
- Scheidereit C. (2006) IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*.;25:6685-6705.
- Schaeren-Wiemers N, Andre E, Kapfhammer JP, Becker-Andre M (1997). The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm. *Eur J Neurosci* 9: 2687–2701,.
- Solt LA, Griffin PR, Burris TP. (2010) Ligand regulation of retinoic acid receptor-related orphan receptors: implications for development of novel therapeutics. *Curr Opin Lipidol*. Jun;21(3):204-11. Review.
- Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, ve ark. (2011) Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature*. Apr 28;472(7344):491-4. Epub 2011 Apr 17.
- Staal A, Frith JC, French MH, ve ark. (2003). The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res*.; 18:88-96
- Superko HR, Momary KM, Li Y. (2012) Statins personalized. *Med Clin North Am*. Jan;96(1):123-39. Epub 2012 Jan 31. Review.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 81(1): 153-208.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C.(1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*; 11(18): 2295-2322.
- van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Papapoulos S. (1999) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl

- pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.*;255:491-494
- Van Der Putten C, Kuipers HF, Zuiderwijk-Sick EA, Van Straalen L, Kondova I, Van Den ve ark. (2011) Statins amplify TLR-induced responses in microglia via inhibition of cholesterol biosynthesis. *Glia.* 2012 Jan;60(1):43-52. doi: 10.1002/glia.21245. Epub Sep 30.
- Lorenzen JM, Neunhöffer H, David S, Kielstein JT, Haller H, Fliser D. (2009) Angiotensin II receptor blocker and statins lower elevated levels of osteopontin in essential hypertension--results from the EUTOPIA trial. *Atherosclerosis.* 2010 Mar;209(1):184-8. Epub Sep 12.
- Tanaka N, Momiyama Y, Ohmori R, Yonemura A, Ayaori M, Ogura M, ve ark. (2000) Effect of atorvastatin on plasma osteopontin levels in patients with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Aug;26(8):e129-30.
- Kawamura H, Yokote K, Asami S, Kobayashi K, Fujimoto M, Maezawa Y, ve ark. (2003) High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):276-81. Epub Dec 11.
- Ortego M, Gómez-Hernández A, Vidal C, Sánchez-Galán E, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Tuñón J, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibitors reduce I kappa B kinase activity induced by oxidative stress in monocytes and vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005 May;45(5):468-75.
- N. Vu-Dac, P. Gervois, T. Grotzinger, P. De Vos, K. Schoonjans, J.C. Fruchart, J ve ark. (1997) Staels Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor RORalpha. *J. Biol. Chem.*, 272 pp. 22401–22404
- Wang KX, Denhardt DT. (2008) Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*;19:333–45.
- Wang Y, Kumar N, Solt LA, Richardson TI, Helvering LM, Crumbley C, Garcia-Ordonez RA, Stayrook KR, Zhang X, Novick S, Chalmers MJ, Griffin PR, Burriss TP. Modulation of RORalpha and RORgamma activity by 7-oxygenated sterol ligands. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:5013–5025.
- Weber C, Erl W, Weber KS, ve ark. (1997) HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11bdependent adhesion of monocytes to endothelium and

reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.*;30:1212–1217.

Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H, Ashkar S. (2002) Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol.*;72:752–61.

Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schröder M, Carlberg C (February 1995). "Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand". *Nucleic Acids Res.* 23 (3): 327–33.

Xu Z, Farver W, Kodukula S, Storch J. (2008) Regulation of sterol transport between membranes and NPC2. *Biochemistry*;47:11134–11143.

Ylitalo R. (2000) Bisphosphonates and atherosclerosis. *Gen Pharmacol.* Dec;35(6):287-96. Review.

Zhang J, Xu Y, Pan L, Chen T, Chen Z, Zhao R. *Can J.* (2010) Effect of simvastatin on collagen I deposition in non-infarcted myocardium: role of NF-kB and osteopontin. *Physiol Pharmacol.* Nov;88(11):1026-34.

Zhou Q, Liao JK. (2009) Statins and cardiovascular diseases: From cholesterol lowering to pleiotropy. *Curr Pharm Des*; 15: 467 – 478.

Zhou Q, Liao JK. (2010) Pleiotropic effects of statins. Basic research and clinical perspectives. *Circulation Journal.*;74(5):818-26.

Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jun;1768(6):1311-24. Epub 2007 Apr 6. Review.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Çağrı	Soyadı	Güleç
Doğ. Yeri	Zonguldak	Doğ. Tar.	29.08.1973
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	57670555088
Email	cagri@istanbul.edu.tr	Tel	0536 475 77 03

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik A.D.	2006
Lisans	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	1995
Lise	İzmir- Ödemiş Lisesi	1991

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağ. ve Hast. A.D.	2008-
2.	Biyolog	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya A.D.	2006-2008
3.	Biyolog	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Acil Biyokimya Lab.	2005-2006
4.	Biyolog	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Merkez Acil Laboratuvarı	2002-2005

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

- 1- The variations of BOP gene in hypertrophic cardiomyopathy. Abaci N, Güleç C, Bayrak F, Kömürcü Bayrak E, Kahveci G, Erginel Unaltuna N. Anadolu Kardiyol Derg. 2010;10(4):303-9.
- 2- Sequence variations of NKX2-5 and HAND1 genes in patients with atrial isomerism. Hatemi AC, Güleç C, Cine N, Vural B, Hatırnaz O, Sayitoğlu M, Oztunç F, Saltık L, Kansız E, Erginel Ünaltuna N. Anadolu Kardiyol Derg. 2011 May 11.
- 3- Hypoxia induces erythropoietin receptor expression on K562 cell line. Abaci N, Cosan F, Güleç C, Azaklı H, Emrence Z, Sirma – Ekmekçi S, Cakiris A, Oku B, Ustek D. Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 2011, 25(3), 1-2305
- 4- SET oncogene is upregulated in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Sirma Ekmekci S, Ekmekci CG, Kandilci A, Güleç C, Akbıyık M, Emrence Z, Abacı N, Karakaş Z, Ağaoğlu L, Ünüvar A, Anak S, Devocioğlu Ö, Ustek D, Grosveld G, Özbek U. Tumori