

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

X-BOX BİNDİNG PROTEİN 1'İN PRO-OPİOMELANOKORTİN SENTEZLEYEN
NÖRONLARDA LEPTİN SENSİTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Şafak MERT

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Erkan YILMAZ

Haziran

2013

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Şafak MERT

Doç. Dr. Erkan YILMAZ danışmanlığında Şafak MERT tarafından hazırlanan bu çalışma .../.../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilimdalında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :..... *İmza* :.....

Üye :..... *İmza* :.....

Üye :..... *İmza* :.....

Üye :..... *İmza* :.....

Üye :..... *İmza* :.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım

İmza :.....

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

X-Box Binding Protein 1'in Pro-opiomelanokortin Sentezleyen Nöronlarda Leptin Sensitivitesi Üzerine Etkisi

ÖZET

Obezite ve ilişkili tüm patolojiler son otuz yılda en önemli halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmişlerdir. Her ne kadar pek çok hastalık gibi obezitenin de bazı türlerinin tek gen bozukluklarından kaynaklandığı bilinse de, obezite insidansında son otuz yıl içerisinde gözlenen büyük artış sorunun tamamen genetik kaynaklı olma ihtimalini ortadan kaldırmaktadır. Günümüzde geçerli görüş obezitenin genetik yatkınlık ve çevresel faktörler nedeniyle gelişen metabolik dengenin kaybı neticesinde ortaya çıktığı yönündedir. Bugün itibariyle obezitenin hangi hücrel mekanizmaların hatalı çalışması nedeniyle geliştiği bilinmemektedir. Ancak son yıllarda endoplazmik retikulum stresi (ER stresi) ve pek çok metabolik hastalık arasında önemli ilişkilerin var olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde obezitenin önemli olgularından biri olan leptin direncinin nöral dokularda gelişen ER stresine bağlı olarak ortaya çıkabildiği de gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da hedefi daraltmak üzere, yeme davranışını baskılama konusundaki görevleri iyi bilinen pro-opiomelanokortin (POMC) sentezleyen hipotalamus arcuate çekirdek nöronlarındaki ER stresinin, deney hayvanlarının yeme davranışı, vücut ağırlığı ve ilişkili metabolik parametrelerde yattığı değişim incelenmiştir. Bu amaçla geliştirilen POMC nöron spesifik XBP1 knock out model organizma, geliştirilmesinde kullanılan transgenik soyların her ikisinin de (hem Cre rekombinaz transgenik) negatif kontrol olarak kullanıldığı bir deney düzeni içerisinde incelenmiştir. İki temel sonuç elde edilmiştir. Daha önceki çalışmalar dikkate alındığında literatürde yeterince değerlendirilmemiş olan Cre kontrol grubunun da bir fenotipinin olduğu gösterilmiş ve ayrıca çalışmanın ana hipoteziyle uyumlu bir şekilde POMC nöronlarında oluşturulan ER stresi modelinin leptin direncine yol açtığı da gösterilmiştir.

91 sayfa 2013

Anahtar Kelimeler: XBP1, UPR, Obezite, POMC, AgRP, Hipotalamus, ER Stresi

The Effect of X-Box Binding Protein 1 on Leptin Sensitivity of Pro-opiomelanocortin Synthesizing Neurons

ABSTRACT

Obesity and obesity related diseases became one of most important public health problems in last 3 decades. Although some forms of obesity arise from single gene mutations like many other diseases, the very high increase of incidence observed in last 3 decades rules out a possibility of a reason of the disease solely comes from genetic alterations. The generally accepted view for a reason of this current obesity epidemic is a combination of genetic predisposition and environmental factors which lead to loss of metabolic equilibrium. As of today's knowledge we still don't know which cellular mechanisms cause obesity when they go wrong. But in recent years growing number of studies show that there is a clear and important connection between endoplasmic reticulum stress (ER stress) and many other metabolic diseases. In a similar way, leptin resistance which is one of the most important events in obesity has been showed that can emerge related with ER stress. In this thesis work we investigate the changings in feeding behavior, body weight and related metabolic parameters of the mice which have ER stress in the pro-opiomelanocortin (POMC) synthesizing neurons of hypothalamic arcuate nucleus. For reaching this aim the model organism which is generated for POMC neuron specific XBP1 knock out was investigated with its two background strains (Cre recombinase transgenic and XBP1 floxed strains) as its negative controls. We have two important results. We clearly show that Cre recombinase have a phenotype, which is not an issue of having enough importance at the current literature. Also we show that generation of ER stress by genetic modulation in POMC neurons cause leptin resistance. This is compatible with the main hypothesis of this work.

91 pages 2013

Key Words: XBP1, UPR, Obesity, POMC, AgRP, Hypothalamus, ER Stress

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez danışmanım Doç. Dr. Erkan YILMAZ'a birlikte çalışmaya başladığımız 2009 yılından beri bana öğrettiği her şey için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Özellikle tez çalışmamın yurtdışındaki sürecinde kendisinden öğrendiklerimden üst düzeyde istifade ettim.

Associate Proffesor Umut ÖZCAN, MD'ye ise hem bana sağladığı iş imkânı hem de tez çalışmam sırasında gösterdiği kolaylık ve destek nedeniyle teşekkürü bir borç bilirim.

Yurtdışındaki çalışmalarım sırasında Dr. Işın ÇAKIR ve Dr. Serkan CABİ eşsiz dostluk ve üst düzey bilgi birikimlerini ilk günden itibaren benimle paylaştılar. Her ikisiyle yaptığım tartışmalardan hem çok şey öğrendim hem de tez çalışmama büyük katkı sağladım. Kendilerine de teşekkür ediyorum.

Mario Andres Salasar Hernandez ve Justin Lee de özellikle Ozcanlab bünyesinde çalışmaya başladığım ilk dönemdeki tüm çalışmaların esnasında bana sayısız yardımda bulunmuşlardır. Yardımcı bir el gerektiğinde beni hiç yalnız bırakmadılar. Çok teşekkür ediyorum.

Dr. Hilde Herrema ve Dr Jaemin Lee de değerli arkadaşlıklarından öte tezle ilgili yaptığım tüm sunumlardan sonra konuyu benimle tartışmaya önemli vakit ayırmış, soruları ve paylaştıkları bilgileriyle önemli katkılarda bulunmuşlardır. Teşekkür ediyorum.

Ozcanlab'ın tüm diğer çalışanları da her durumda yardımı esirgemediler. Böylesine yardımcı, iyi kalpli ve bilgili insanlardan oluşan bir laboratuvar ortamında çalışmak bu tezin yapılmasında önemli bir etken olmuştur. Hepsine yürekten teşekkür ederim.

Enstitümüz müdürlerinden Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK işsiz kaldığım ve doktora eğitimimin ciddi biçimde riske girdiği bir dönemde çok büyük bir destek vermiştir. Yurtdışına gidiş sürecimdeki desteğini de unutamam. Kendisine tüm bu destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, değerli dostlarım Altan Görkem GÜRÇAN ve Fethi GÜRÇAN'ın büyük maddi manevi destekleri sayesinde, yine büyük çoğunluğu onların evlerinde yazılarak hayata geçirilmiştir. Ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Obezite.....	4
2.1.1 Obezite ve endoplazmik retikulum stresi.....	6
2.2 Leptin.....	6
2.2.1 Leptin reseptörü ve leptin direnci.....	8
2.3 Endoplazmik Retikulum Stresi.....	11
2.5 Leptin-Melanokortin Sistemi ve Gıda Alımının Hormonal Kontrolü.....	15
2.6 Mevcut Literatürün Işığı Altında Bu Tez Çalışmasının Ana Hipotezi.....	21
3.METARYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1 Canlı Hayvanlarla Yapılan Çalışmalar.....	24
3.1.1 Cre-Lox rekombinasyonu.....	25
3.1.2 Deney gruplarının oluşturulması.....	25
3.1.3 Vücut ağırlıklarının takibi.....	26
3.1.4 Gıda alımlarının takibi.....	27
3.1.5 Hayvanların metabolik düzeylerinin ölçülmesi.....	27
3.1.6 Vücut sıcaklıklarının rektal prob kullanılarak ölçülmesi.....	27
3.1.7 Glikoz tolerans testi (GTT).....	27
3.1.8 İnsülin tolerans testi (ITT)	28
3.1.9 Vücut yağ doku yüzdelerinin DEXA ile belirlenmesi.....	28
3.2 Deney Grubundaki Hayvanların Dokuları ile Yapılan Çalışmalar.....	29
3.2.1 Kan leptin düzeylerinin ELISA ile ölçülmesi.....	29
3.2.2 Kan total kolesterol, serbest gliserol ve trigliserit düzeylerinin ölçülmesi.....	29
3.2.3 Farklı dokulardan saflaştırılan mRNA'ların qPCR analizleri.....	30
4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33

4.1 Vücut Ağırlığı Değişimleri.....	33
4.2 Serum Leptin Düzeyi ve Leptin Direnci.....	39
4.3 DEXA Ölçümleri ve Vücut Yağ Yüzdesi.....	41
4.4 Gıda Alımı.....	42
4.5 Glikoz ve İnsülin Tolerans Testleri (GTT ve İTT).....	47
4.6 Metabolik Kafes Verileri (CLAMS).....	49
4.7 Vücut Sıcaklığı Verileri.....	57
4.8 Trigliserit ve Serbest Gliserol Ölçümleri.....	58
4.9 Total Kolesterol Ölçümleri.....	61
4.10 qPCR Temelli Gen İfade Analizleri.....	63
5.SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 BMI ve ölüm riski ilişkisi.....	4
Şekil 2.2 Gıda alımı için düzey belirlenmesi.....	5
Şekil 2.3 Leptin ve keşfinin bilimsel önemi.....	7
Şekil 2.4 OB-R (LepR) ve gp130-ilişkili sitokin reseptörü ailesi arasındaki yapısal benzerlikler.....	9
Şekil 2.5 LepRb sinyali, geribesleme inhibisyonu ve ilgili fizyolojik düzenlemeler...	10
Şekil 2.6 UPR.....	14
Şekil 2.7 UPR elemanlarının işlevsel domainleri.....	15
Şekil 2.8 Yeşil flüoresan protein (GFP) ifade ederek görünür hale gelen LepRb nöronları.....	16
Şekil 2.9 Arcuate çekirdekdeki nöronlar leptin ve insülin reseptörleri ifade ederek çevresel dokulardan gelen sinyalleri enerji homeostazisini sağlamak üzere algılarlar	17
Şekil 2.10 Leptin sinyali POMC ve AgRP nöronlarını farklı biçimde etkilemektedir	18
Şekil 2.11 İnsülin ve leptin reseptör sinyali Irs fosforilasyonu basamağında kesişir	19
Şekil 2.12 AgRP ve POMC genlerinin promotörlerinde hem pSTAT3 hem de FoxO1 için hedef diziler bulunur.....	19
Şekil 2.13 Melanokortinler ve reseptörleri.....	20
Şekil 2.14 Merkezi sinir sistemindeki melanokortin reseptörlerinin ifade edildikleri beyin bölgesine göre farklı işlevleri vardır.....	21
Şekil 2.15 LepRb ifade eden plazmit ile transfekte edilmiş Hek293 hücrelerinde tunicamycin ile indüklenmiş ER stresinin LepRb fosforilasyonu, Jak2 fosforilasyonu ve STAT3 fosforilasyonuna etkisi.....	22
Şekil 2.16 LepRb ifade eden Hek293 hücrelerinde adenovirüs ile aşırı miktarda ifade edilen XBP1'in tunicamycin ile tetiklenmiş ER stresin LepRb sinyalini bozucu etkisini azalttığını gösterir westernblotlar.....	22
Şekil 2.17 Sinir sisteminde XBP1 silinmiş deney hayvanlarının leptin direnci geliştirmesi.....	23
Şekil 3. 1 RNA ekstraktının kontrolü.....	31
Şekil 4. 1 Aynı genotipten olup da farklı besinlerle beslenen gruplar arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını sınavan t-testi "p" değerlerinin, her ağırlık ölçüm günü için aldığı değerlerin değişimini gösterir tablo.....	33
Şekil 4. 2 Farklı genotip gruplarının, HFD ve Chow diyet ile beslendiklerinde	

gösterdikleri vücut ağırlığı değişimine ilişkin grafik.....	34
Şekil 4. 3 Chow diyet ile beslenen gruplar arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını sınavan t-testi "p" değerlerinin her ağırlık ölçümü için aldığı değerlerin zamana göre değişimini gösterir grafik.....	36
Şekil 4. 4 HFD ile beslenen gruplar arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını sınavan t-testi "p" değerlerinin her ağırlık ölçümü için aldığı değerlerin zamana göre değişimini gösterir grafik.....	36
Şekil 4. 5 Sadece knock out ve flox kontrol gruplarının, HFD ve Chow diyet ile beslendiklerinde gösterdikleri vücut ağırlığı değişimine ilişkin grafik.....	37
Şekil 4. 6 Aynı genotipten olup da farklı besinlerle beslenen gruplar arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını sınavan t-testi "p" değerlerinin, her ağırlık ölçüm günü için aldığı değerlerin değişimini sadece knock out ve flox kontrol grupları için gösterir tablo.....	38
Şekil 4. 7 Flox kontrol ve knock out grupları arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını, HFD ve chow diyet koşulları için ayrı ayrı sınavan t-testi "p" değerlerinin her ağırlık ölçümü için aldığı değerlerin zamana göre değişimini gösterir tablo.....	38
Şekil 4. 8 Deneysel kullanımları tüm grupların ortalama kan leptin düzeylerini ve bu ortalamaların standart hatalarını verir grafik.....	39
Şekil 4. 9 DEXA ile vücut yağ yüzdesi ölçüm sonuçları.....	41
Şekil 4. 10 Her hafta alınan gıda tüketim ölçümlerinin kafesteki hayvan sayısına bölünmesiyle elde edilmiş gıda alımı grafiği.....	43
Şekil 4. 11 Ardışık 3'er haftalık ortalamalar cinsinden gıda alım değerleri.....	45
Şekil 4. 12 Ardışık 3'er haftalık ortalamalar cinsinden kalori alım değerleri.....	46
Şekil 4. 13 HFD grubuna ilişkin GTT sonuçları.....	47
Şekil 4. 14 Chow diyet grubuna ilişkin İTT sonuçları.....	48
Şekil 4. 15 HFD grubu hayvanların CLAMS sistemi gözlemlerinden elde edilen, x ve y eksenlerindeki toplam yerdeğiştirme hareketlerini gösterir grafik.....	50
Şekil 4. 16 Chow diyet grubu hayvanların CLAMS sistemi gözlemlerinden elde edilen, x ve y eksenlerindeki toplam yerdeğiştirme hareketlerini gösterir grafik.....	51
Şekil 4. 17 CLAMS ısı üretimi verisi.....	53
Şekil 4. 18 Grupların ortalama RER değerleri.....	55
Şekil 4. 19 Grupların ortalama ΔO_2 değerlerini gösterir tablo.....	56
Şekil 4. 20 Her grubun ortalama vücut sıcaklıklarını, birer hafta arayla yapılan	

birbirinden farklı ölçümler için grup ortalamaları ve tüm bu ölçümlerin grup ortalamaları cinsinden gösterir grafik.....	57
Şekil 4. 21 Her grubun mg/ml cinsinden ortalama serum trigliserit düzeylerini gösterir grafik.....	59
Şekil 4. 22 Her grubun mg/ml cinsinden ortalama serum serbest gliserol düzeylerini gösterir grafik.....	60
Şekil 4. 23 Tüm grupların mg/ml cinsinden ortalama total kolesterol düzeylerini ve bu düzeylere ilişkin standart hataları gösterir grafik.....	62
Şekil 4. 24 Hipotalamus dokusunda qPCR incelemesi yapılan genlerin farklı genotip ve diyet gruplarına ilişkin ifade profilleri.....	65
Şekil 4. 25 Serebral Korteks XBP1 ifade profili.....	69
Şekil 4. 26 Hipofiz dokusunda qPCR incelemesi yapılan genlerin farklı genotip ve diyet gruplarına ilişkin ifade profilleri.....	71
Şekil 4. 27 Kahverengi yağ dokusunda qPCR incelemesi yapılan genlerin farklı genotip ve diyet gruplarına ilişkin ifade profilleri.....	75
Şekil 5. 1 Yapılan deneysel çalışmaların vücut ağırlığı üzerine etkisi.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1 Deneyde kullanılan kafes ve hayvanların sayıları ile aldıkları yem çeşidini gösterir çizelge.....	26
Çizelge 3. 2 Tez çalışması için tasarlanan primer çiftleri.....	31
Çizelge 4. 1 Ardışık ortalama yaklaşımını özetleyen çizelge.....	44
Çizelge 4. 2 Şekil 4.13'teki verilere ilişkin T testi p değerlerini gösterir çizelge.....	48
Çizelge 4. 3 Şekil 4.14'teki verilere ilişkin T testi p değerlerini gösterir çizelge.....	49
Çizelge 4. 4 Şekil 4.17 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	53
Çizelge 4. 5 Enerji üretiminde kullanılan farklı moleküllerin oksidasyonları sonucunda oluşan RER değerlerini gösterir çizelge.....	54
Çizelge 4. 6 RER için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	55
Çizelge 4. 7 Şekil 4.19 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	56
Çizelge 4. 8 Şekil 4.20 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	58
Çizelge 4. 9 Şekil 4.21 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	60
Çizelge 4. 10 Şekil 4.22 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	61
Çizelge 4. 11 Kan lipoproteinleri.....	61
Çizelge 4. 12 Şekil 4.23 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	62
Çizelge 4. 13 Şekil 4.24 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	66
Çizelge 4. 14 Hipotalamus ve serebral korteks dokularından yapılan qPCR'lar sonucu AgRP ve POMC için elde edilen C_T değerlerinin aynı dokudaki β -actin C_T değeri ile kıyaslanmasını gösterir grafik.....	69
Çizelge 4. 15 Şekil 4.25 için p değerleri çizelgesi.....	69
Çizelge 4. 16 Şekil 4.26 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	71

Çizelge 4. 17 Şekil 4.25 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.....	76
--	----

SİMGELER DİZİNİ

*	t testi p değerleri için “0,01 < p ≤ 0,05” aralığındaki değerler.
**	t testi p değerleri için “0,001 < p ≤ 0,01” aralığındaki değerler.
***	t testi p değerleri için “p ≤ 0,001” şeklindeki değerler.
Adrb3	β3-Adrenerjik Reseptör
AgRP	Agouti Related Protein
B6 (C57BL/6J)	Black6 diye anılan <i>Mus musculus</i> soy hattı
BMI	Vücut Kütle Endeksi (Body Mass Index)
CART	Cocaine and amphetamine regulated transcript
CLAMS	Columbus Instruments Comprehensive Lab Animal Monitoring System
COX7A1	Cytochrome c oxidase polypeptide 7A1, mitochondrial
DEXA	Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA / DEXA)
DIO	Diet Induced Obesity
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER Stresi	Endoplazmik Retikulum Stresi
F4/80	İnsan “EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 / EMR1” geninin fare homologu
FOXO1	Forkhead box protein O1
Grp78	78 kDa glucose-regulated protein (Binding immunoglobulin protein [BiP] veya heat shock 70 kDa protein 5 [HSPA5])
GTT	Glukoz Tolerans Testi
HDL	High Density Lipoprotein
HFD	High Fat Diet
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IHC	Immunohistochemistry
IP	İntraperitoneal
ITT	İnsülin Tolerans Testi
LDL	Low Density Lipoprotein
MCH	Melanin-concentrating hormone
mtCox1	Mitokondrial sitokrom c oksidaz I (MT-CO1 / COX1)
NPY	Neuropeptide Y

PGC1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
POMC	Pro-opiomelanocortin
PPAR γ 1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1
PPAR γ 2	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2
qPCR	quantitative real time Polymerase Chain Reaction
RER	Respiratory exchange ratio (respiratory quotient [RQ] / respiratory coefficient)
Serp1	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
Trh	Thyrotropin-releasing hormone TRH (thyrotropin-releasing factor [TRF] / thyroliberin / protirelin)
UCP1	Thermogenin (uncoupling protein 1)
UCP2	uncoupling protein 2
VLDL	Very-low-density lipoprotein
XBP1	X-box binding protein 1 (TREB5)
Xbp1s	Translasyonel olarak aktif, IRE1 α tarafından splay edilmiş XBP1 mRNA'sı
Xbp1u	Translasyonel olarak inaktif, IRE1 α tarafından splay edilmemiş XBP1 mRNA'sı

1. GİRİŞ

Bir hastalığa tedavi geliştirebilmek için, etkinliği tesadüfen fark edilmiş ilaçlar hariç, o hastalığa neden olan mekanizmanın bilinmesi gerekir. Ancak bundan sonra hatalı süreçleri düzeltecek tıbbi yaklaşımlar geliştirilebilir. Metabolik hastalıklar için de durum farklı değildir. Ancak metabolizma, bileşenlerinin çokluğu ve karşılıklı etkileşimlerinin sayısı itibarıyla çözümlenmesi zor bir hücresel süreçtir. Örneğin bir ağrı kesici ilaç ağrı hissine neden olan bir molekülü üreten bir enzimin inhibitörü olarak geliştirilebilir. Ayrıca ağrıyı algılayan reseptörün inhibitörü de aynı amaçla işlev görebilir. Fakat söz konusu olan obezite gibi çok değişkenli bir hastalık olduğunda manipüle ederek belirli bir iyileşme sağlanacak tek bir hedef bulmak imkânsız denecek kadar zordur. Kaynak özetleri bölümünde referansları ile birlikte aktarıldığı gibi obezite çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sadece obezite değil obezite nedeniyle gelişen hastalıklar da başlı başına büyük birer sağlık sorunu ve harcama kaynağıdır. Bu nedenle obezitenin tedavisi ve önlenmesi amacıyla büyük bir maddi kaynak harcanmaktadır. Yine de obezitenin son 30 yılda neden küresel bir salgın haline geldiği ve nasıl tedavi edileceği konusunda net bir görüş yoktur.

Bazı türleri tek gen hastalıkları şeklinde görülmekle birlikte obezite ancak son 30 yılda küresel bir salgın halini almıştır. Son 30 yıl içerisinde insanlığın gen havuzunun bu denli değişmiş olma ihtimali yoktur. O halde geriye üç ihtimal kalmaktadır. Yeme davranışının bozulması ve veya alınan gıdaların içeriğinin değişmesi ve veya yaşam tarzının değişmesinden kaynaklanan bir durum. Muhtemelen bu faktörlerin her üçü de mevcut sorun üzerinde belirli ölçüde pay sahibidir. Ancak bunlardan ancak yaşam tarzının değişmesinin yarattığı etkiler kolayca anlaşılır niteliktedirler. Zira durağan bir yaşam tarzı daha az kalori harcanması ve beraberinde kilo almayı gündeme getirebilir. Modern yaşamın “masa başı”, “bilgisayar başı” gibi tanımlamalarla anılan iş koşulları insanın biyolojisi ve evrimsel geçmişiyle kıyaslandığında normalde yaşanabilecekten çok daha az enerji harcanan bir yaşama işaret eder. Bu durum haliyle bir sorun kaynağı olarak tanımlanabilir. Fakat günümüzün obezite epidemisinin parçası olan her bireyin durağan bir yaşam sürdürdüğünü iddia etmek gerçekçi değildir. Aksine durağan bir yaşam sunma olasılığı zayıf olan işlerde çalışan insanlar da günden güne daha kilolu olmaktadır. Bu nedenle besinsel ve davranışsal değişikliklerin de hesaba katılması kaçınılmazdır.

Obezite epidemisi küresel bir sorun gibi görünmekle birlikte öncelikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gözlenen bir halk sağlığı sorunudur. Bu durum haliyle akıllara besinlerde ortaya çıkan değişimleri getirmektedir. Zira obezite adeta endüstriyel tarım ve hayvancılıkla doğru orantılı bir artış gösterir gibidir. Fakat bu tür istatistiksel çalışmalar da soruya net bir cevap vermekten uzaktır. Besinlerdeki değişim vücutlarımızı nasıl ve neden etkilemektedir? Bu değişimler neden kilo aldırma yönünde bir etki ortaya çıkartmaktadır? Davranışsal değişikliklerin buradaki payı nedir? Yediklerimiz, yeme davranışlarımızı değiştiriyor olabilir mi? Bu ve buna benzer daha pek çok soru halen ya cevapsız ya da ancak kısmen cevaplanabilmiş haldedir.

Endoplazmik retikulum stresi (ER stresi) de bir hücrel mekanizma olarak keşfinden bu yana pek çok metabolik hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Alzheimer'dan, tip 1 diyabete, çeşitli kanser türlerinden, otoimmün sistem hastalıklarına kadar pek çok patolojiyle yakından ilişkisi vardır. Son zamanlarda ER stres ile obezite arasında da önemli ilişkiler gösterilmiş ve obezite patolojisinin anlaşılmasında ER stres çalışmalarının da önemli katkıları olmaya başlamıştır. Ancak bugün hala ER stresin mi obeziteye neden olduğu yoksa obezitenin mi bir çeşit ER stresi kaynağı olarak, ER strese bağlı patolojilere yol açtığı kesin değildir. Belki her ikisi de belirli koşullarda belirli oranlarda geçerli olan durumlardır. Ancak her durumda obezite ve ER stres ilişkisi üzerinde bilimsel araştırmalar yapılmasına gerek vardır.

Ebetteki tüm bu tartışmaların odak noktasında beyin vardır. Zira vücudun metabolik hızını ayarlayan ve yeme davranışını belirleyen organ beyindir. Beyin tüm bu işlevleri evrimsel süreç içerisinde kazanılış olan genetik bilgi ile yapar. Zira besin maddelerini algılama, organizmanın içinde bulunduğu metabolik durumu tespit etme ve tüm bu verilere göre karar verme aşamalarının hepsi genetik program tarafından oluşturulan bazı nöral ağlar sayesinde başarılmaktadır. İşte bu sistemin çalışma detaylarının bilinmesi hangi girdilerin hatalı çıktılara sebep olduğunun anlaşılmasında kritik bir öneme sahiptir.

Yüksek yağlı diyetlerin beynin kandaki besin maddelerini algılama yeteneğini bozduğuna dair hipotezler vardır. Ayrıca aşırı kalorili ve lezzetli yiyecekleri tüketmenin beyinde hedonik bir tepkiye neden olduğu ve bunun bir bağımlılığa dönüşerek kişiyi sürekli olarak daha çok yemeye sürüklediği şeklinde hipotezler de vardır. Ancak tüm bu mekanizmalar içerisinde en az çalışılmış olanı yeme davranışını düzenleyen nöronlardaki ER stresinin etkileridir. Çünkü ER stresin hücrel sinyal ağlarını bozduğu bilinmektedir. Ayrıca bu

sinyal ağları yeme davranışını belirleyen nöronların reseptörlerinin sinyal iletmek amacıyla kullandıkları hücresel yolaklardır. Sonuçta bu hücresel mekanizmaların bozulması besinlerin, besinsel sinyalleri taşıyan leptin ve insülin gibi hormonların yanlış algılanmasına ve nöronlar arası sinyal iletiminin bozulması ile de verilen sinirsel kararların bozulmasına neden oluyor olabilir. Ancak bu çok bilinmeyenli bir sistemdir ve hatalı hücresel sinyal iletim mekanizmasının ne olduğunu ve veya bu hatanın nerede başladığını söylemek güçtür.

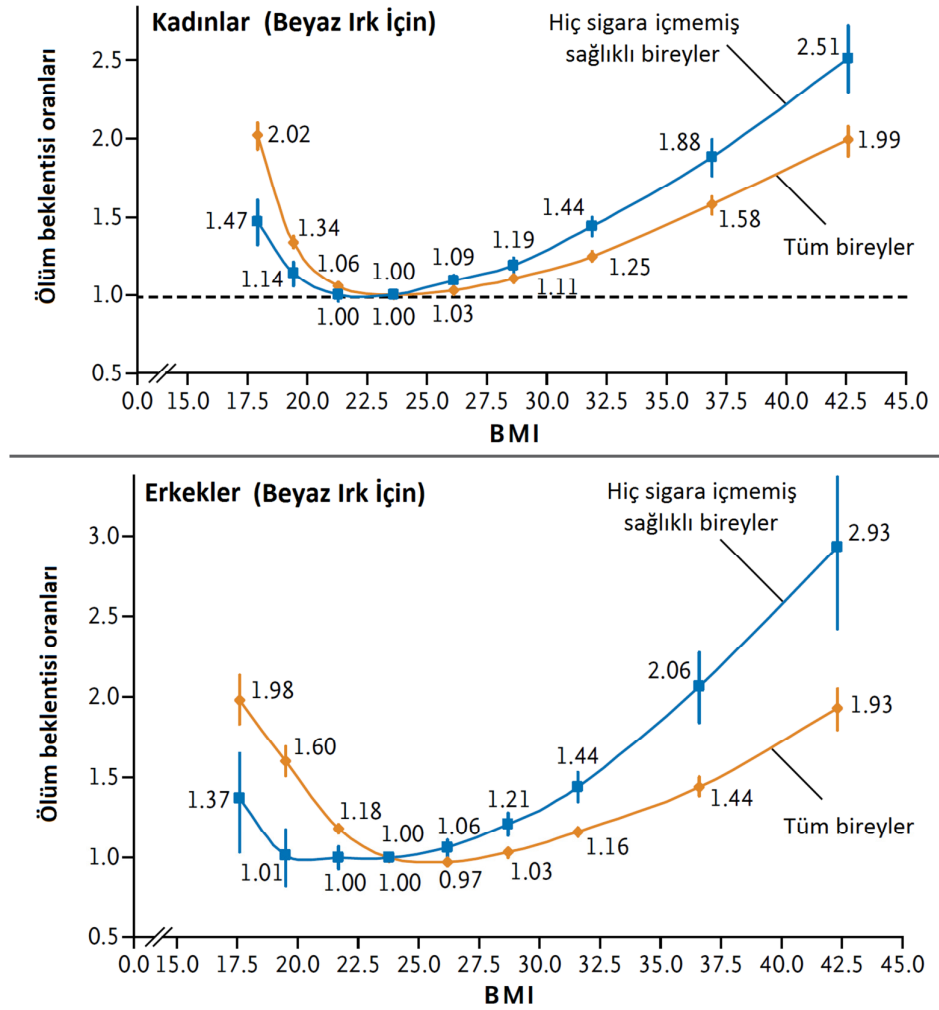
Leptin direnci obezitenin iyi tanımlanmış özelliklerinden birisidir. Zira leptinin kalıtsal olarak obez bir grup hayvandaki eksik protein olduğunun keşfiyle birlikte akıllara gelen ilk soru, obez bireylere leptin verilmesinin yaratacağı etki olmuştur. Ancak bu düşünce kısa zamanda ortadan kalkmıştır. Çünkü leptin geninde bir mutasyon taşıdığı için obez olan bireyler hariç obez bireylerin kan dolaşımalarında normalin çok üstünde bir leptin konsantrasyonu vardır. Ancak bu bireylerin merkezi sinir sistemi bu hormona gereken cevabı verememektedir. Leptin direnci olarak adlandırılan bu durum bir hücresel sinyal yolunun sekteye uğramasıdır ki ER stresi de çeşitli hücresel sinyal yollarının işlevini bu şekilde bozabilir.

İşte tüm bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında ER stresin leptin direnci üzerinde bir etkisi olup olmadığı incelenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

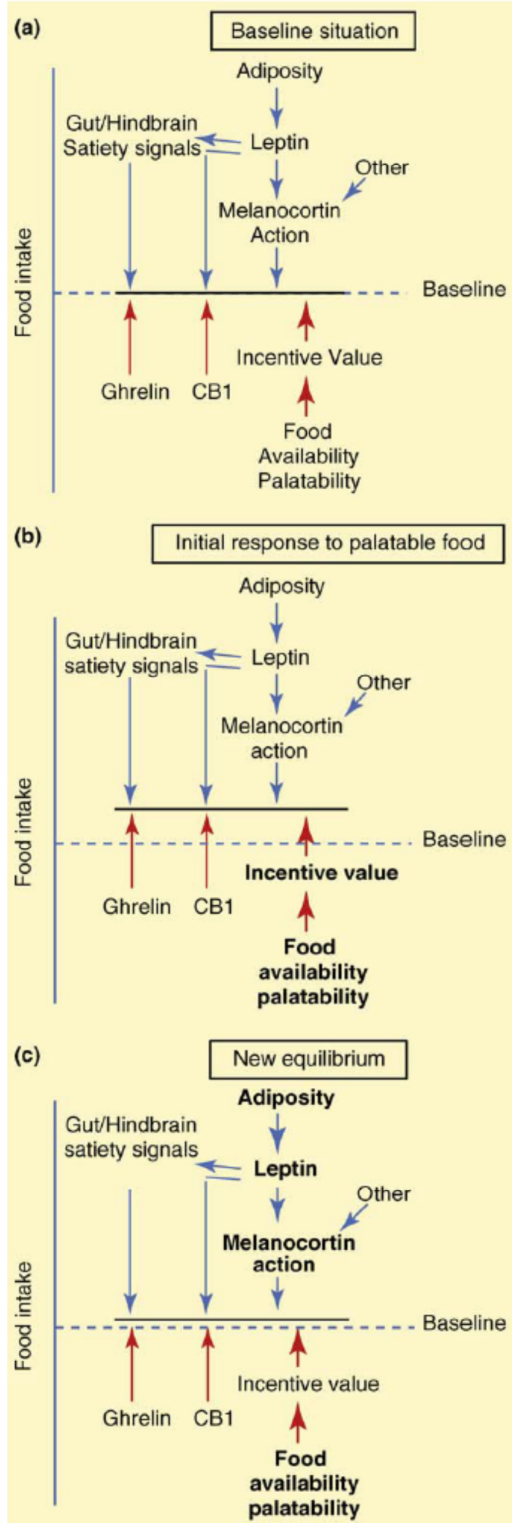
2.1 Obezite

Obezite, çağımızın en önemli halk sağlığı problemlerinden birisidir ve tip2 diyabet, kalp damar hastalıkları, metabolik sendrom ve ilişkili tüm hastalıklar için ciddi bir risk faktörüdür (Friedman 2000, Hofbauer et al. 2007). Sadece vücut kütle indeksi (BMI) ve sonraki ortalama 10 yıllık zaman dilimi içindeki ölüm beklentisi arasında belirgin bir ilişki vardır (şekil 2.1) (Berrington de Gonzalez et al. 2010). Bu durum obezitenin 1970'lerin sonu ve 80'lerin başından itibaren küresel bir salgın halini almış olmasıyla birlikte değerlendirildiğinde halk sağlığı açısından tehlikenin boyutları anlaşılır (Caballero 2007).



Şekil 2. 1 BMI ve ölüm riski ilişkisi. Her bir vücut kütle indeksi (BMI) değerine karşı, o değeri alan bireylerin sonraki 10 yıllık süre için herhangi bir nedene dayalı ortalama ölüm beklentisini, sigara içmeyen sağlıklı bireyler ve tüm örneklem için göreceli oranlar cinsinden verir grafik (Berrington de Gonzalez et al. 2010'dan Türkçeleştirilmiştir).

Obezitenin, genetik ve çevresel faktörlerin bileşkesi sonucu ortaya çıktığı hakkında belirli ölçüde bir görüş birliği olmakla birlikte, genetik alt yapının katkısının daha büyük olduğunu ve tersi biçimde davranışsal bozuklukların daha önemli olduğunu düşünen



araştırmacılar da vardır (Hewitt 1997, Casazza et al. 2013). Tamamen tek gen hastalıklarına bağlı obezite patolojileri bilinmektedir ve bu durum çeşitli genetik bozuklukların da davranışsal değişikliklerden bağımsız olarak başlı başına birer obezite nedeni olabileceğini ortaya koyar (Farooqi and O'Rahilly 2005). Bu hastalıklar genelde leptin, leptin reseptörü, melanokortinler (α MSH vb tüm POMC türevi moleküller), başta MC4R olmak üzere çeşitli melanokortin reseptörleri ve POMC'yi keserek türev peptitleri oluşturan prohormon konvertaz'lar ile ilgili mutasyonlardan kaynaklanır (Farooqi and O'Rahilly 2005, Brennan and Mantzoros 2006, Cone 2006).

Tüm genetik temelli tartışmalara rağmen obezitenin ancak son 30-40 yıllık süre içinde ciddi bir halk sağlığı sorunu haline geldiği gerçeği, dünyadaki tüm toplumları aynı ölçüde etkilemediği gerçeği ile birlikte ele alındığında, mevcut epideminin tek nedeninin genetik bozukluklar olamayacağı kolayca görülür. Bu nedenle pek çok araştırmacı yenilen yemeğin çeşidi ve yeme alışkanlığındaki değişikliklere

Şekil 2. 2 Gıda alımı için düzey belirlenmesi. Gıda alımını artırıcı ve azaltıcı kuvvetler arasındaki denge gıdanın ulaşılabilirliği ve lezzeti nedeniyle değişebilir. Oluşan yeni karar düzeyi daha çok besin tüketilmesi yönünde bir etki yaratmaktadır (grafik Myers et al. 2010'den alınmıştır).

odaklanmaktadır. Özellikle yemeğin daha lezzetli ve yemeğe erişimin daha kolay olmasının, tokluk hissedilen ve yemek yeme davranışının sonlandırıldığı sınırın değişmesine neden olduğu yönünde kanıtlar da vardır (şekil 2.2) (Myers et al. 2010).

Sonuç olarak mevcut obezite epidemisine pek çok genetik yatkınlık faktörü ve yeme davranışını değiştiren tür ve miktardaki gıdalar ile sedanter (durağan) yaşam tarzının bir bileşkesinin neden olduğunu söylemek mümkündür. Gerçekten de BMI %40 ila %70 arasında değişen oranlarda kalıtsal olup (O'Rahilly et al. 2003) vücut yağlanmasının %84 kadarını tek başına açıklar (Farooqi and O'Rahilly 2005). Bu durumda hem metabolizmayı düzenleyen genetik faktörlerin hem de değişen gıda alımının, gıda alımı ve enerji harcanması ile ilgili düzenlerini bozduğu kontrol mekanizmalarının nasıl çalıştıklarını bilmek, obezite ile mücadele etmek için son derece önemli bir hal almaktadır.

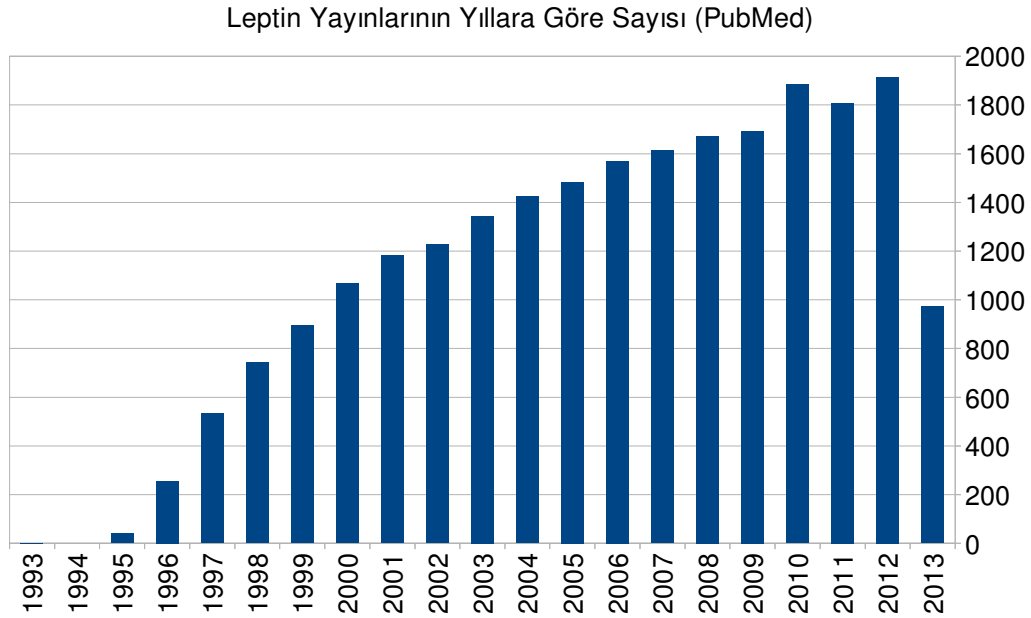
2.1.1 Obezite ve endoplazmik retikulum stresi

Bölüm 2.3'te açıklandığı gibi "Endoplazmik Retikulum Stresi" (ER Stresi) hücresel homeostazisin sağlanmasında kritik bir öneme sahiptir. İlginçtir ki hücre içinde aşırı miktarda biriken gıdalar da bir ER Stresi kaynağıdır (Park et al. 2010, Wek and Anthony 2010, Winnay et al. 2010). Ayrıca hücre içinde aşırı miktarda yağ depolanmasının özellikle yağ doku için bir "kronik düşük düzey inflamasyon (yangı)" kaynağı olduğu bilinmektedir (Hotamisligil 2006). Leptin de pek çok immün yanıtın düzenlenmesinde görev aldığı bilinen önemli bir hormondur ve pek çok inflamatuvar durum ile yakından ilişkilidir (Fantuzzi and Faggioni 2000). Ayrıca leptin reseptörü hem moleküler yapısı hem de downstream sinyal iletim mekanizmaları itibarıyla tipik bir sitokin reseptörüdür ve immün yanıtla ilgili pek çok sinyal yolağı, insülin sinyal yolağı ve leptin sinyal yolağı çeşitli basamaklarda kesişirler (Fantuzzi and Faggioni 2000). Sonuç olarak immün cevap, inflamasyon, ER stresi ve obezite arasında son yıllarda gittikçe artan oranda dikkat çeken bir bağlantı vardır (Hotamisligil and Erbay 2008, Hotamisligil 2008, Hotamisligil 2010 Hummasti and Hotamisligil 2010, Tripathi and Pandey 2012).

2.2 Leptin

Leptin geni ve ilişkili mRNA ve protein ürünleri, 1994 yılında Jeffrey M. Friedman ve Douglas L. Coleman tarafından ob/ob diye bilinen ve şiddetli kalıtsal obezite gözlenen bir fare soy hattının incelenmesi ile bulunmuştur (Zhang et al. 1994). Daha sonraki çalışmalar

leptinin yağ (adipoz) dokudan, dokunun miktarıyla orantılı olacak şekilde salgılandığını ortaya koymuştur (Maffei et al. 1995). Bu durumun akla getirdiği ilk düşünce olan “leptinin bir çeşit negatif geri besleme (feedback) sisteminin ana sinyal molekülü olabileceği” görüşü de takip eden dönemde bulunan ve merkezi sinir sisteminde ifade edilen leptin reseptörünün varlığı ile kanıtlanmıştır (Tartaglia et al. 1995, Friedman and Halaas 1998). Ayrıca leptinin insanlarda da aynı işlevleri yerine getirecek şekilde çalıştığı ve fare ile sıçanın insanda leptin sinyal yolunun çalışılması için uygun birer model olduğu anlaşılmıştır (Haniu et al. 1998, Brennan and Mantzoros 2006, Mantzoros et al. 2011). Böylece leptin, keşfedilmesi ile birlikte adipoz dokunun aslında durağan bir depo değil son derece etkin bir endokrin organ olduğunun anlaşılmasına neden olmuş olan çok önemli bir hormondur (şekil 2.3).



Şekil 2. 3 Leptin ve keşfinin bilimsel önemi. 16 Mayıs 2013 itibariyle PubMed’de listelenen leptin yayınlarının sayısının yıllara göre dökümünü gösterir grafik. Leptinin, bulunuşunun ardından ne kadar kısa bir zamanda önemli bir araştırma hedefi olduğu görülmektedir. Arama <("leptin"[MeSH Terms] OR "leptin"[All Fields]) NOT leptin[Author]> şeklindeki girdi ile yapılmıştır ve 1993 için 1, 1994 için 0 ve 1995 için 40 kayıt vardır. 2013’ün ilk 4,5 ayındaki yayın sayısı ise 1000’e yakındır.

Leptin, Yunanca zayıf anlamına gelen “leptos” (λεπτός) kelimesinden türetilmiştir. Gerçekten de leptin, olası bir besin kıtlığının engellenmesi için fizyolojik bir adaptasyon sinyali olarak çalışır (Ahima and Flier 2000). Protein yapısındaki 16kDa’luk bu hormon, açlık-tokluk hissi, metabolizma hızı, enerji harcama düzeyi ve üreme gibi pek çok metabolik olayda düzenleyici rol oynar (Brennan and Mantzoros 2006). Hem insanda hem

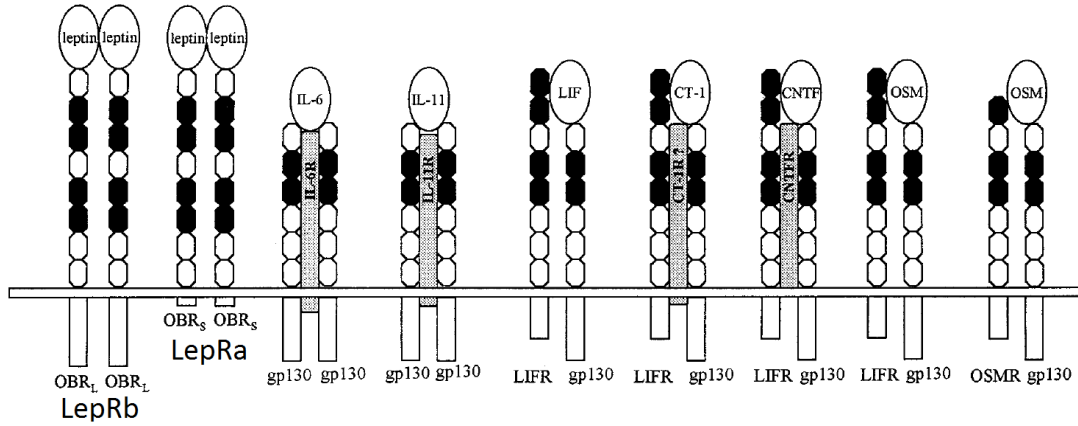
de farede 167 amino asit uzunluğundadır (<http://www.uniprot.org/uniprot/P41159> 2013 ve <http://www.uniprot.org/uniprot/P41160> 2013). Ancak sekresyon sinyali de içeren sinyal peptidinin kesilmesinden sonra dolaşıma verilen olgun protein hali 146 amino asit uzunluğundadır (Margetic et al. 2002). Yağ doku miktarının azalmasıyla birlikte kandaki düzeyi düşer ve merkezi sinir sistemi tarafından algılanan sinyal azalır. Leptin sinyalinin azalması depo besininin azaldığı anlamına gelir ve metabolizmanın, merkezi sinir sisteminde besin yetersizliği koşullarına uygun olarak yeniden düzenlemesine neden olur. Bu görüşü destekleyen en önemli kanıt işlevsel bir leptin geni olmayan ob/ob hayvanların aşırı açlığın fizyolojik tepkilerini göstermeleridir. Bu fareler sadece aşırı yemek yeme ihtiyacı ile kilo almaz fakat aynı zamanda üreme sistemleri de gelişmez. Bu hayvanlarda termogenez de sekteye uğrar ve bu nedenle sürekli olarak üşüme davranışı sergiler ve hareketliliklerini azaltırlar. Bağışıklık sistemi ve gelişimsel fonksiyonlarda da aksaklıklar görülür (Ahima and Flier 2000).

2.2.1 Leptin reseptörü ve leptin direnci

LEP-R diye de bilinen leptin reseptörü *LEPR* geni (ilgili fare geni *lepr* diye anılır) tarafından kodlanan bir proteindir. Hem insan da hem de farenin de dâhil olduğu diğer omurgalı canlılarda yağ dokudan salınan bir hormon olan leptinin bağlanıp sinyal ilettiği bir reseptör olarak çalışır (Tartaglia et al. 1995, Winick et al. 1997). Ayrıca CD295 olarak da tanımlanmıştır.

Leptin yağ doku kütlelerini hipotalamus üzerinde etki yaratarak düzenler. Hipotalamustaki reseptörüne bağlanan leptin tokluk hissi yaratır ve enerji harcanmasını gerektiren tüm metabolik süreçleri hızlandırır. Lep-R tek bir transmembran domaini olan (çözünür izoformu hariç) bir sitokin reseptörüdür (şekil 2.4) (<http://www.uniprot.org/uniprot/P48356> 2013, <http://omim.org/entry/601007> 2013 ve <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16847> 2013). Alternatif splicing ile 5 farklı izoformu oluşturulur. Bunlardan 130,8 kDa (1162 amino asit) büyüklüğünde olan “b” izoformu (izoform1) hipotalamusta sinyal iletiminde kullanılan fizyolojik olarak aktif izoformdur (LepRb). Sadece LepRb’nin işlevsiz olduğu db/db farelerin obez, diyabetik ve kısır olmaları ve db/db farelerle tüm leptin reseptör izoformları için knock out olan db^{3J}/db^{3J} farelerin fenotipleri arasında belirgin bir farkın olmayışı, leptin sinyali için “b” izoformun taşıdığı önemi ortaya koyar (Lee et al. 1996, Münzberg et al. 2005). Sadece bu izoformun nöronlarda ifade edildiği transgenik db/db farelerin obezite, diyabet ve kısırılıktan tamamen kurtulduklarının gözlenmiş olması, hem

leptin sinyali için beyindeki reseptörlerin önemini hem de “b” izoformunun işlev ve yeterliliğini kanıtlar (de Luca et al. 2005). Buna rağmen leptin reseptörünün başka bazı dokularda da ifade edildiği bilinmektedir ancak bu dokulardaki işlevi net değildir (Margetic et al. 2002). Reseptörün, bazıları çözünür formda kan plazmasında bulunan diğer izoformlarının olası görevleri hakkında çok fazla bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak son yıllarda özellikle “a” izoformunun “b” izoformu ile leptin varlığında heterodimer oluşturarak sinyal iletiminde çalıştığına dair bazı bulgular vardır (Bacart et al. 2010, Gong et al. 2013).

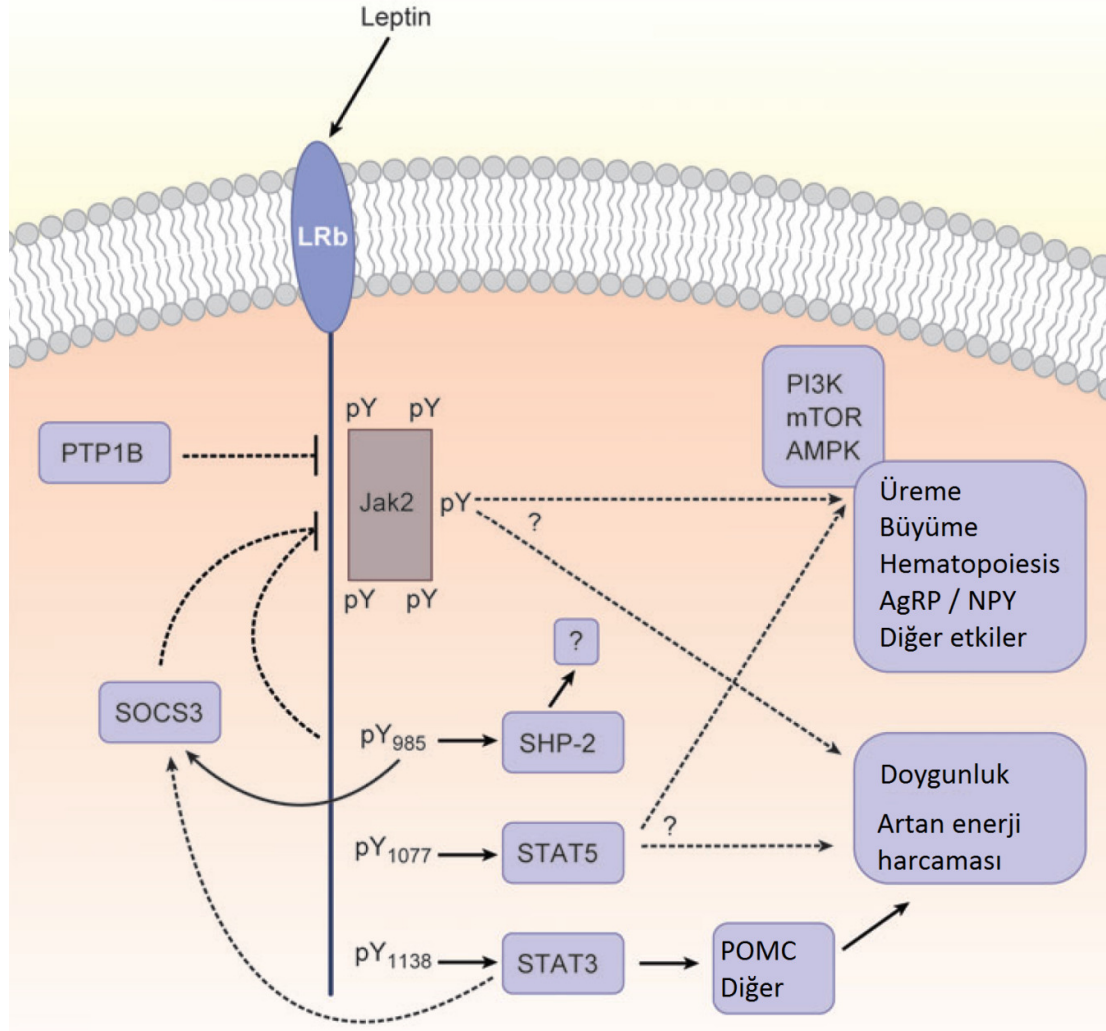


Şekil 2. 4 OB-R (LepR) ve gp130-ilişkili sitokin reseptörü ailesi arasındaki yapısal benzerlikler. Siyah dolgu ile işaretli bölgeler sınıf 1 sitokin reseptör ailesine ait korunmuş domainleri göstermektedir. Leptin reseptörünün kısa formları hariç (burada LepRa ile temsil edilmiştir), bu ailenin tüm üyeleri JAK/STAT sinyal yolunu aktive ederek çalışırlar (Fantuzzi and Faggioni 2000'den).

LepRb'nin sinyal iletim mekanizması, JAK/STAT yolağı diye bilenen tipik bir immün cevap sinyal yolağının STAT3 fosforilasyonu ile çalışan bir türevidir (Bates et al. 2004, Stark and Darnell 2012). Reseptörün enzimatik bir özelliği yoktur ancak hücre içi bölgesinde Jak2 için bir bağlanma bölgesi bulunur (Ihle and Kerr 1995, Taniguchi 1995, Kloek et al. 2002). Bir tirozin kinaz olan Jak2 reseptöre leptin bağlanmasıyla meydana gelen konformasyonel değişimle aktive olur ve hem kendisini hem de reseptörün bazı tirozin amino asitlerini fosforile ederek takip eden sinyal ağının oluşmasını sağlar (şekil 2.5) (White et al. 1997, Banks et al. 2000, Myers et al. 2008).

Şekil 2.5'te de görüleceği gibi leptin reseptör sinyali kendi içinde bir geribesleme inhibisyonu döngüsüne sahiptir. Yapılan çalışmalar 985 numaralı tirozin amino asidinin deneysel olarak lösin gibi fosforile edilemeyen bir diğer amino asit ile değiştirilmesinin leptin sinyalini artırdığını ortaya koymaktadır (Björnholm et al. 2007). Bu inhibitör leptin sinyalini üretemeyen fareler, HFD koşullarında daha zayıf kalmakta ve daha normal bir

endokrin fonksiyon sergilemektedirler. Yine de tüm bu olumlu değişimlerin büyük ölçüde dişi hayvanlar ile sınırlı olması leptin sinyal yolunun ne kadar karmaşık bir yapısı olduğunu ve çok sayıda etkileşim içerdiğini ortaya koyar.



Şekil 2. 5 LepRb sinyali, geribesleme inhibisyonu ve ilgili fizyolojik düzenlemeler. Leptinin bağlanması reseptörün konformasyonunu değiştirir ve Jak2'yi aktive eder. Jak2 de kendisini bazı tirozin amino asitleri üzerinden fosforile eder (pY). Aynı zamanda reseptörü de Y985, Y1077 ve Y1138 üzerinden fosforile eder. pY1138 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) ile etkileşime giren en önemli fosforilasyon bölgelerinden biridir. STAT3'ün bu etkileşimi ve takip eden fosforilasyonu çok önemli bir transkripsiyon faktörü olan pSTAT3 dimerinin oluşmasına neden olur. POMC SOCS3 gibi pek çok genin ifadesi pSTAT3 kontrolü altındadır. pY1077 de benzer şekilde STAT5 fosforilasyonu ve aktivasyonunu sağlar. pY985 bir tirozin fosfotaz olan SHP-2 ile etkileşir ve SOCS3 için de bir bağlanma bölgesi olarak tüm bu fosforilasyon sinyali için bir geribesleme inhibisyonu mekanizması oluşturur (Myers et al. 2008'den alınmıştır).

Leptin sinyalinin tek düzenleyicisi geribesleme inhibisyonu değildir. Tüm diğer sitokin reseptörleri gibi LepRb'nin de aşırı ligand uyarımı durumunda sinyali baskılanır (Knobelspies et al. 2010). Bu sürecin tüm detayları bilinmemektedir ve günümüzün önemli

araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Reseptörün leptin ile aşırı boyutta uyarılması bir süre sonra reseptörün sinyal iletme yeteneğini ciddi ölçüde düşürür. Bunun en iyi örneği obez bireylerde gözlenen hiperleptinemia durumudur. Aslında, leptin genleri hasarlı olanlar hariç, tüm obez bireyler aşırı yağ dokusu nedeniyle çok yüksek plazma leptin düzeylerine sahiptirler. Fakat bu hiperleptinemi durumu, yeme davranışının baskılanması için gereken sinyali üretememektedir. Buna leptin direnci denir ve *“obez bireylerdeki yüksek kan leptin düzeylerinin yeme davranışını baskılama veya azaltma kabiliyetini kaybetmesi”* olarak tanımlanır (Münzberg and Myers 2005, Myers et al. 2008, Myers et al. 2010). Leptin direnci, bilinen bir genetik bozukluk haricindeki obezite vakalarının tamamında gözlenmesi ve obezitenin de son 30 yıldır küresel bir salgın haline gelmiş olmasıyla birlikte ele alındığında, obezite çalışmaları için çok önemli bir hedef haline almıştır. Zira bu kadar kısa süre içerisinde değişen şey insanlığın gen havuzu olamaz. Çevresel şartlardaki değişimin genetik sistemin gıda alımı düzeyini ayarlayan mekanizmalarını bozmuş olması daha olasıdır ve leptin direnci ilk akla gelen sorunlardan birisidir (Myers et al. 2010, Casazza et al. 2013).

Knight et al. 2010'daki bir seri zekice tasarlanmış deneyle ispat edildiği üzere leptin direncine hiperleptinemia yani kronik ligand uyarımı neden olmaktadır. Merkezi bir leptin direncinin oluşmasını takiben ortaya çıkmış bir hiperleptinemia hipotezi çürütülmüştür. Buna rağmen leptinin özellikle median eminence¹ vasıtasıyla merkezi sinir sistemine taşınımı ile ilgili olası aksaklıklar hala birer araştırma konusudurlar (Lee 2009).

2.3 Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum tüm ökaryot canlıların en temel hücresel organelidir. Pek çok yaşamsal olay (protein üretimi, hücre içi sindirim, madde taşınması, besin depolanması vb) endoplazmik retikulum içerisinde cereyan eder. Ancak bu organelin de bir kapasitesi vardır ve bu kapasite aşıldığında pek çok ciddi sorun oluşur. Bu sorunlara ve neticesinde meydana gelen hücresel cevaplara topluca endoplazmik retikulum stresi denir (Schröder 2008, Ozcan and Tabas 2012). Pek çok hastalık çeşitli şekillerde endoplazmik retikulum stresi ile ilişkilidir (Lin et al. 2008).

¹ Median eminence hipotalamus ile hipofiz bezi arasındaki iletişimi sağlar ve bu nedenle kan beyin bariyerinin bulunmadığı nadir bölgelerden birisidir (bu tür bölgelere circumventricular organ denir) (Scott and Pepe 1987). Kandaki besin maddeleri ve çeşitli hormonların (ve bu arada leptin ve insülinin) özellikle hipotalamus arcuate çekirdeği tarafından algılanmasında bu yapının önemi büyüktür (Rodríguez et al. 2010).

Endoplazmik retikulum (ER) stresinin en önemli nedenlerinden biri üretilen proteinlerdir. Özellikle salgı yapan hücreler ele alındığında üretilmesi, doğru biçimde katlanması ve salgılanması gereken ne kadar çok protein olduğu kolayca görülebilir (Fonseca et al. 2009). Ayrıca yüksek düzeyde besin maddesi girişi, obez bireylerde yağ doku başta olmak üzere pek çok dokuya ait hücrelerin ER stresi ile karşı karşıya kalmasına neden olur (Tripathi and Pandey 2012).

ER içerisinde üretilen proteinlerin doğru şekilde katlanmasının işlev görebilmeleri ve doğru hücre içi bölgeye yollanmaları veya salgılanmaları açısından taşıdığı önem büyüktür (Schröder and Kaufman 2005). Bu nedenle tüm ökaryotlarda doğru katlanmamış proteinlerin ER lümeni içinde biriktiği durumda harekete geçen ve evrimsel olarak son derece korunmuş olan ve “katlanmamış protein cevabı / UPR (Unfolded Protein Response)” diye anılan bir hücresel tepki mekanizması vardır (Schröder and Kaufman 2005). Şekil 2.6’da özetlendiği gibi UPR’nin evrimsel olarak korunmuş ve tüm ökaryotlarda bulunan 3 kolu vardır. Bunlar ER membranı üzerinde bulunan ve ER stresinin düzeyini algılayabilen 3 farklı protein ve ilgili etkileşimleridir (Wiseman et al. 2010).

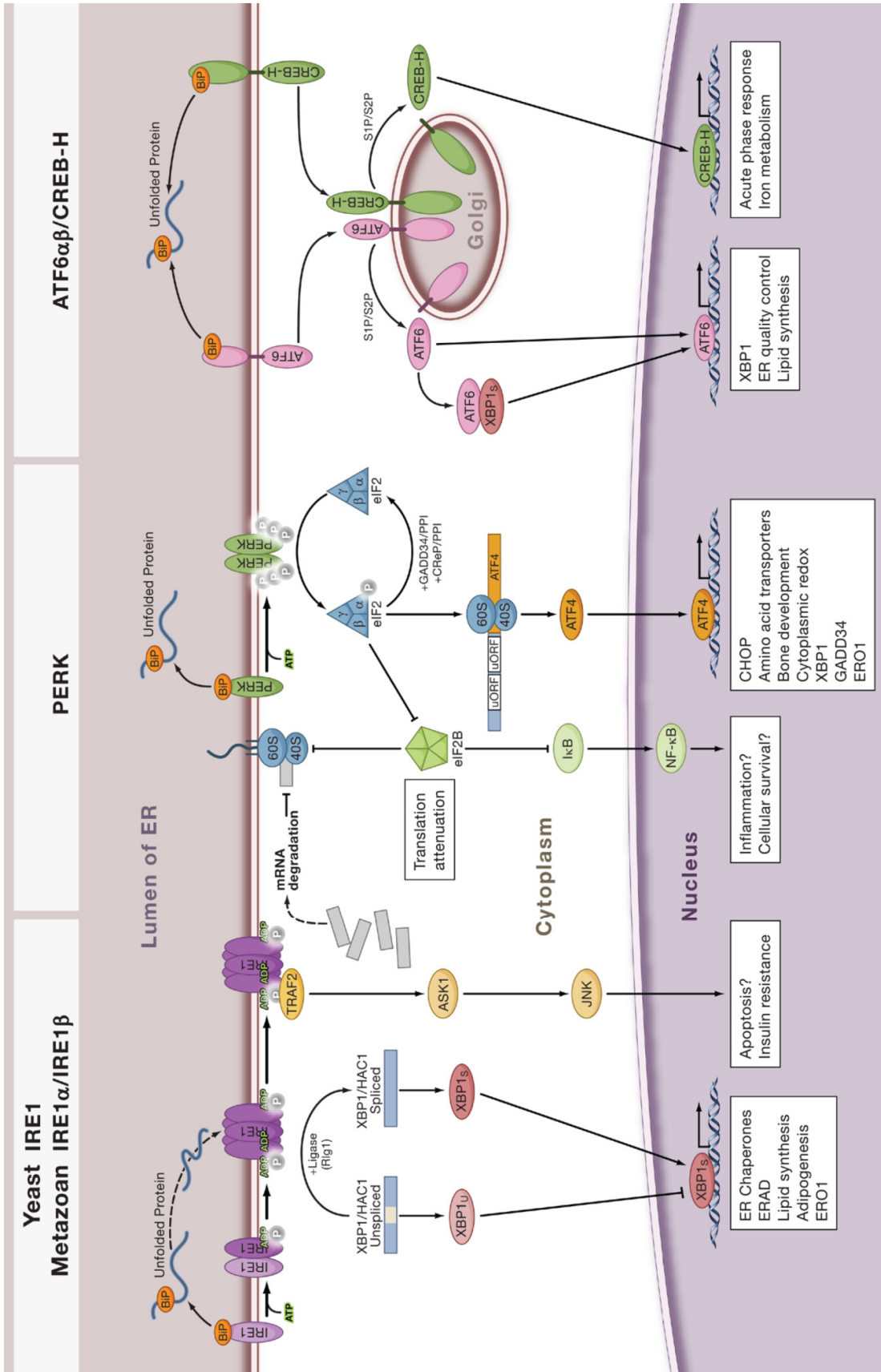
Çok hücreli canlılarda (metazoa’da) bulunan UPR sistemlerinden ilki IRE1-XBP1 sistemidir (S. cerevisiae’de IRE1-Hac1). S. cerevisiae’deki IRE1’in metazoa’da iki adet ortologu bulunur; IRE1 α ve IRE1 β . IRE1 [Inositol-Requiring Enzyme 1 / HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) tarafından kabul edilmiş gen sembolü: ERN1 (Endoplasmic Reticulum-To-Nucleus Signaling 1) IRE1 α için ve ERN2 IRE1 β için] ER içerisinde birikmiş olan katlanmamış proteinler ile etkileştiğinde aktive olan bir kinaz ve ribonükleazdır (<http://omim.org/entry/604033> 2013, Wiseman et al. 2010, Hetz et al. 2011). İlk olarak mayada keşfedilen Hac1’in metazoan homoloğu olan XBP1 (X Box-Binding Protein 1) mRNA’sının 3’ bölgesinden 26 nükleotidler bir bölgeyi kesip çıkartır. Böylece XBP1u mRNA’sı XBP1s mRNA’sına dönüşür ve oluşan XBP1s mRNA’sının transle olmasıyla çok kuvvetli bir transkripsiyon faktörü olan XBP1 proteini ortaya çıkar (<http://omim.org/entry/194355> 2013). Bu transkripsiyon faktörü pek çok ER ilişkili şaperonun ifadesini kontrol eder. Böylece ortaya çıkan gen ürünleri ER üzerindeki yükün azaltılmasını sağlar. Bu esnada IRE1, ER’da katlanması gereken proteinlere ilişkin mRNA’ları degrade ederek sürece katkı sağlar (Hollien and Weissman 2006, Hollien et al 2009). Ayrıca kronik ER stresi durumunda TRAF2 fosforilasyonu üzerinden apoptoz sinyali de üretir. Böylece ER stresin çözülemediği durumlarda hasarlı hücreler ortadan

kaldırılmış olur (Mauro et al 2006). Tüm bunlar birlikte ele alındığında IRE1'in aktive olmasının hücrede küresel anlamda gen ifade profilini değiştiren önemli bir etki yarattığı görülür (Hetz et al. 2011).

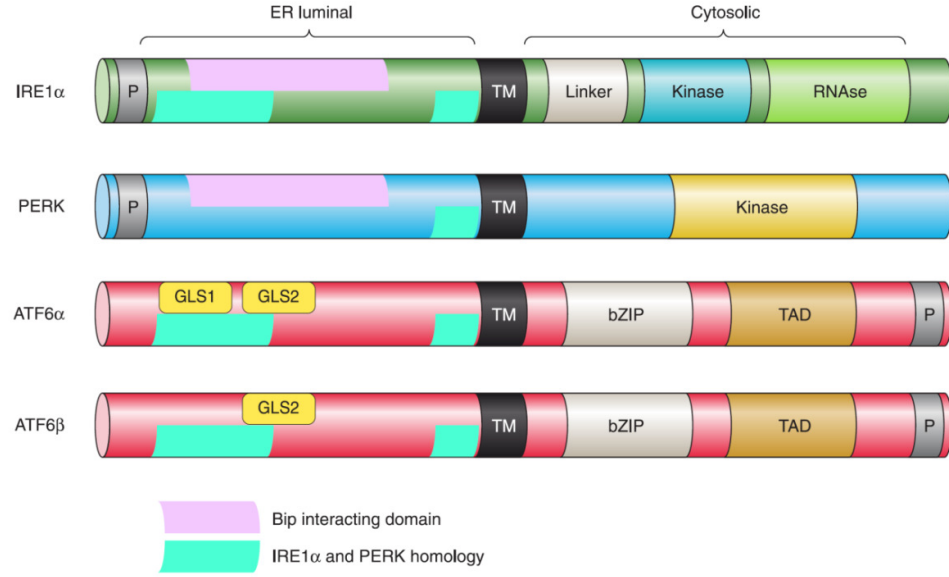
Metazoa'nın 2.UPR sistemi "PKR-like ER-localized eIF2 α kinase (PERK)" üzerinden yürüten bir fosforilasyona sinyal yolağıdır. Proteine ismini de veren ilk substratı olan Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2) α altbiriminin fosforile olması hücresel düzeydeki tüm translasyon olaylarının başlamasını engeller (Ron and Harding 2007). Böylece ER üzerindeki yük hızla azaltılır. Ancak eIF2 α fosforilasyonu translasyonel olayları genel olarak azaltsa da ATF4'ün (activating transcription factor 4) translasyonunu tersi biçimde artırır. ATF4 de kuvvetli bir transkripsiyon faktörüdür ve çekirdeğe giderek amino asit transporter'ları, ER içerisinde disülfid bağları kurarak protein katlanmasına yardımcı olan ERO1 gibi redoks enzimleri ve CHOP (CCAAT enhancer-binding homologous protein) adı verilen bir proapoptotik transkripsiyon faktörünün de aralarında bulunduğu bir grup genin ifadesi başlatır (Malhi and Kaufman 2011). Ayrıca XBP1 mRNA'sının ifadesini de artırarak UPR etkinliğinin çerçevesini genişletir (Wiseman et al. 2010).

ATF6 da UPR'nin diğer üyeleri gibi ER lümeni içerisindeki katlanmamış proteinlerin yarattığı stresi hem bu proteinlerle hem de ER şaperonu BiP ile olan etkileşiminin BiP'in katlanmamış proteinler tarafından artan kullanımı nedeniyle azalması sayesinde algılar. Böylece BiP'in ATF6'dan ayrılması onun golgiye taşınmasına neden olur ve orada iki farklı dizi özgül proteaz olan S1P ve S2P tarafından kesilir. 50 kDa'luk sitosolik domaini böylece serbest kalır. Bu domain bir transkripsiyon faktörüdür ve ER şaperonlarının ifadesini aktive eder (Yoshida et al. 2000, Yoshida et al. 2001). ATF6 hepatositlerdeki CREB-H ile homologtur ve bu protein de promotorlarında inflamatuvar cevap elementi içeren genlerin stres bağımlı olarak ifadesini sağlar (Bernales et al. 2006, Pavitt and Ron 2012).

Her üç sensör sisteminin çalışması için de BiP [Binding immunoglobulin protein / 78 kDa glucose-regulated protein (Grp78) / heat shock 70 kDa protein 5 (HSPA5)] ile kurdukları etkileşimler büyük önem taşır. ER lümeni içerisinde olun ve yeni sentezlenen proteinlerle etkileşerek doğru katlanmalarını sağlayan bu protein aynı zamanda UPR sisteminin üyeleri ile de etkileşir. ER içerisinde biriken katlanmamış proteinler BiP'in UPR proteinleri ile kurduğu etkileşimi azaltarak ER stres sinyali üretir (şekil 2.7) (Hetz et al. 2011).



Şekil 2. 6 (önceki sayfada) UPR. Katlanmamış protein cevabının evrensel olarak korunmuş 3 kolu vardır. Bu üç kolun her birinde ER şaperonlarından BiP (Grp78) ve veya katlanmamış ER proteinleriyle etkileşerek ER stresinin düzeyini algılayan ve ardından hücresel tepki için gereken sinyali başlatan bir sensör protein ve onun efektor proteinleri söz konusudur. Ortaya çıkan hücresel cevap ER stresini azaltıcı önlemlerle başlar ancak çözülmemeyen kronik ER stresi durumunda apoptotik mekanizmalar devreye girer. Sonuçta meydana gelen olayların bazıları doku özgülken (CREB-H gibi) bazıları da her doku türünde aynıdır (ATF4 gibi). Wiseman et al. 2010'dan alınmıştır.

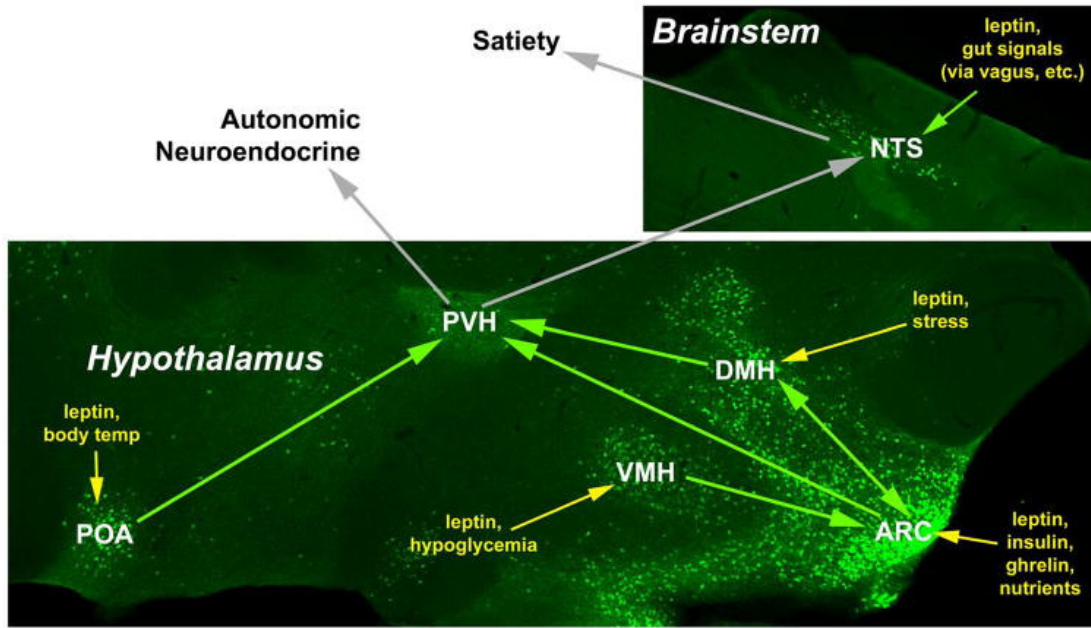


Şekil 2. 7 UPR elemanlarının işlevsel domainleri. UPR'nin her üç kolu da transmembran birer ER membran proteini içerir. Bu proteinlerin ER lümenine bakan kısımları ER stresinin düzeyini algılama işlevi yürütürken, sitozole bakan domainler efektor fonksiyonlarla ilgilidirler. Şekilde bu sensör proteinlerin ER şaperonu BiP ile etkileşen bölgeleri (Bip interacting domain) ve ATF6'nın IRE1α ve PERK ile homoloji gösteren bölgeleri işaretlenmiştir. Her sensör proteininin sitoplazmik kısımları işlevine özgül domainler bulundurulur (bZIP, basic leucine zipper [tipik bir transkripsiyon faktörü domaini]; GLS, Golgi localization sequences [ilgili proteinin golgiye taşınımı için sinyal içeren bölgeler]; TAD, transcriptional activation domain [transkripsiyon faktörlerinin RNAPol ile etkileşerek transkripsiyon düzeyini artırmasını sağlayan domain]; TM, transmembrane domain). Hetz et al. 2011'den.

2.5 Leptin-Melanokortin Sistemi ve Gıda Alımının Hormonal Kontrolü

Yeme davranışı (miktar ve sıklığı) bir grup beyin merkezi tarafından ayarlanır. Bunların en önemlilerinden biri de hipotalamustur (Rohner-Jeanrenaud et al. 1996). Pek çok fizyolojik sinyali, sinirsel impulsu, kan yoluyla gelen besin maddelerini ve hormonları algılayarak yemeyi azaltan veya artıran sinyaller üretir (Belgardt et al. 2009). Hipotalamus farklı görevler için bir araya gelmiş farklı yapıdaki nöronlardan oluşan çekirdekler (nüklei) şeklinde organize olmuştur. Bu çekirdeklerin yeme davranışı ve metabolizma açısından en önemlilerinden biri arcuate nükleus (Arc) olup, aynı zamanda median eminence ile ilişki halinde olan bölüm de burasıdır (Rodríguez et al. 2010). Burada bulunan iki grup nöron kan kökenli hormonların algılanmasında son derece önemlidir. Bu nöronlardan pro-

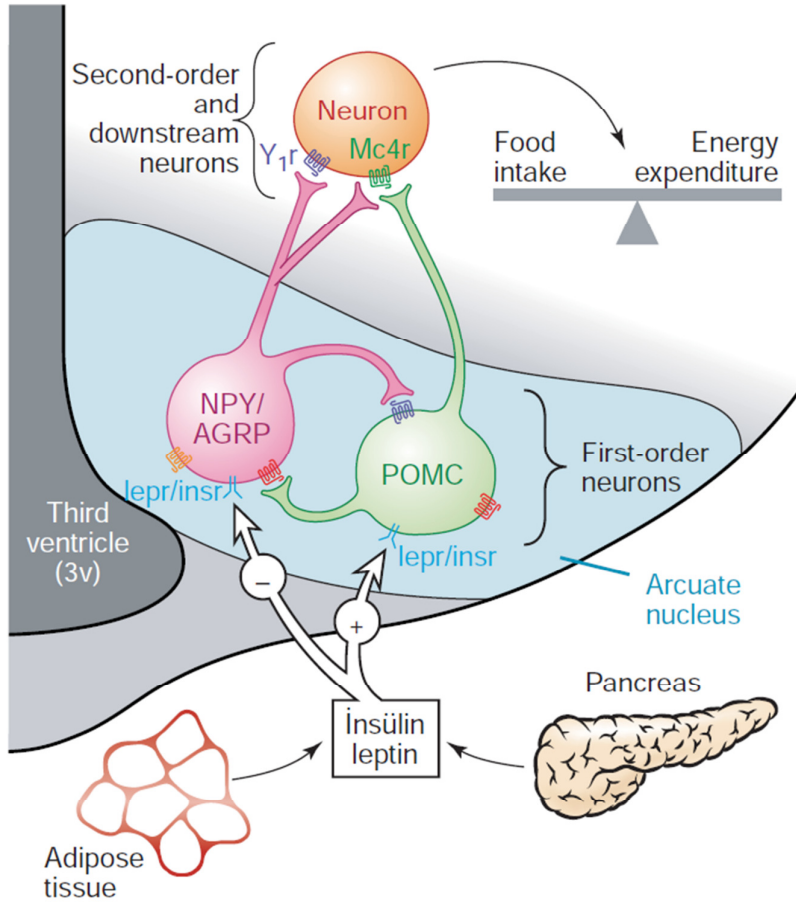
opiomelanakortin sentezleyenlere POMC, Agouti-related peptit ve nöropeptit Y sentezleyenlere ise AgRP/NPY (kısaca AgRP) nöronları adı verilir. POMC ve AgRP nöronlarının her ikisi de leptin ve insülin reseptörleri taşırlar. Gerçekten de Arc tüm fare beyinde en çok leptin reseptörü ifade edilen bölgedir (şekil 2.8) (Myers et al 2009). Ayrıca bu reseptörlerin, leptin reseptörü başta olmak üzere, beyindeki varlık ve işlevselliklerinin normal bir vücut ağırlığının sağlanması için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Balthasar et al. 2004).



Şekil 2. 8 Yeşil flüoresan protein (GFP) ifade ederek görünür hale gelen LepRb nöronları. LepRb promotörü ile birlikte aktarılan GFP'nin sadece taşıdığı promotörün ifade edildiği hücrelerde gözlenmesi dayalı bu transgenik hayvan tekniği sayesinde leptin reseptörlerinin beyindeki yerleşimlerini belirlemek mümkün olmuştur. En yüksek reseptör yoğunluğunun Arc (hipotalamus arcuate çekirdeği) bölgesinde olduğu görülmektedir. Myers et al 2009'den alınmıştır.

POMC ve AgRP nöronları aldıkları sinyaller karşısında birbirine zıt şekilde çalışıp projeksiyon yaptıkları (aksonlarının sinaps yaptıkları hedefte bulunan) beyin bölgelerini aktive veya pasifize ederek işlev görürler. Bu nöronların ayırt edici özellikleri, hedeflerindeki diğer nöronlarla, bu nöronların yüzeyindeki özel reseptörlerce algılanan kendilerine has ve peptit yapıda nörotransmitterler aracılığıyla iletişim kurmalarıdır (Yeo and Heisler 2012). Bu nedenle hem kendileri, ürettikleri özel proteinler sayesinde hem de projeksiyon yaptıkları hücreler, bu peptit yapılı nörotransmitterler için özgül olan reseptörlerin varlığı nedeniyle kolayca tespit edilebilmektedirler. Ayrıca kan beyin bariyeri sayesinde çevresel dokularda çok başka amaçlar için kullanılan peptitler merkezi sinir sisteminde nörotransmitter olarak kullanılabilir (Yeo and Heisler 2012). Örneğin

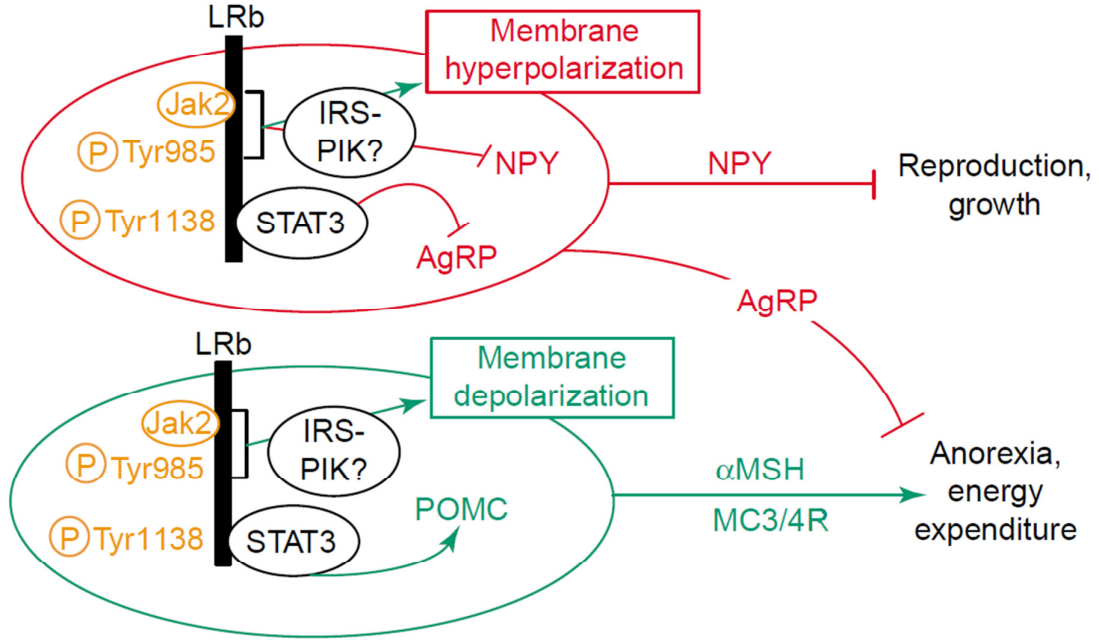
α MSH çevresel dokular için bir hormon iken merkezi sinir sisteminde POMC nöronlarının kullandığı bir nörotransmitterdir. Bu nöronların leptin ve insülin reseptörleri aracılığıyla sinyal alıp, aldıkları bu sinyale göre cevap üretmeleri şekil 2.9’da özetlenmiştir (Niswender et al. 2004). İnsülin ve leptinin POMC ve AgRP nöronları üzerindeki etkileri birbirine zıttır. Örneğin leptinin reseptörüne bağlanması POMC nöronunun impuls sıklığını artırırken AgRP nöronununkini azaltır (şekil 2.10) (Bates et al. 2003). Ayrıca bu nöronları projeksiyon yaptıkları 2.düzye nöronlar üzerindeki etkileri de farklıdır.



Şekil 2. 9 Arcuate çekirdekteki nöronlar leptin ve insülin reseptörleri ifade ederek çevresel dokulardan gelen sinyalleri enerji homeostazisini sağlamak üzere algırlarlar. İnsülin ve leptinin POMC ve AgRP nöronları üzerindeki etkileri birbirine zıttır. Bu nöronların aktive olduklarında yarattıkları etkiler de birbirine zıttır. Böylece gıda alımı ve enerji harcanması süreçleri birbirine zıt çalışan iki farklı itici gücün etkisi altında dengelenir. Niswender et al. 2004’ten alınmıştır.

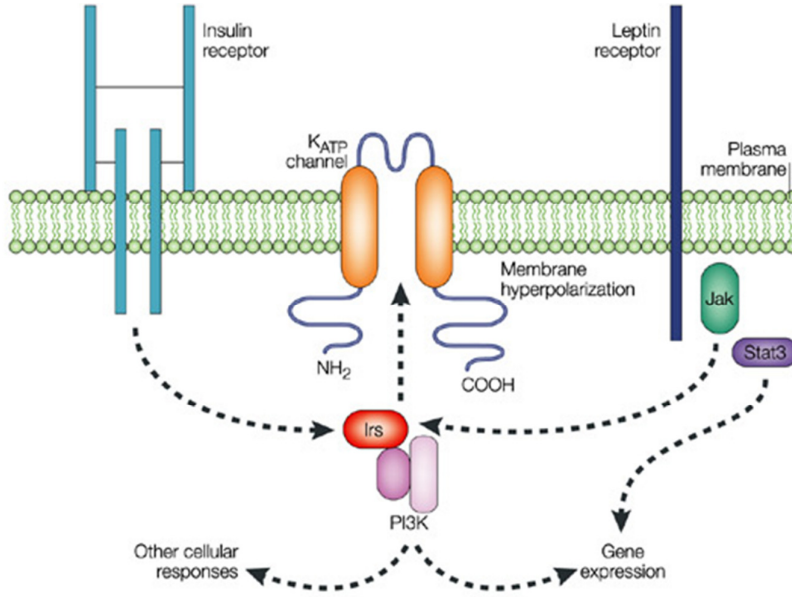
POMC nöronlarının saldığı α MSH merkezi sinir sistemindeki reseptörü olan 4 numaralı melanokortin reseptörüne (MC4R) bağlandığında yeme isteğini azaltıcı ve enerji harcanmasını artırıcı süreçleri başlatır (Balthasar et al. 2004). Oysaki AgRP nöronlarından salınan agouti-ilişkili protein (AgRP), MC4R üzerinde ters agonist olarak çalışır ve

reseptörün zemin sinyal üretim düzeyinin de altına inmesine neden olarak POMC nöronlarının aksine yeme isteğini artırıcı ve enerji harcanmasını kısıtlayıcı süreçleri başlatır (Seeley et al 2004). Yine AgRP nöronlarından salınan bir diğer peptit olan nöropeptit Y'nin (NPY) ise kendine has reseptörleri bulunur (Bates et al. 2003).



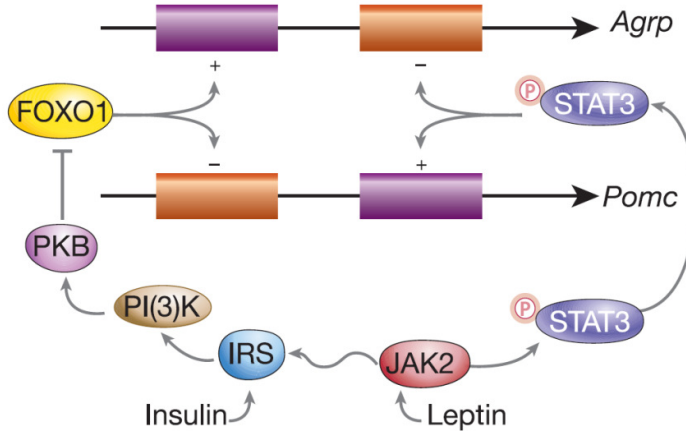
Şekil 2. 10 Leptin sinyali POMC ve AgRP nöronlarını farklı biçimde etkilemektedir. Hücre içi sinyal yolları başlangıçta aynı olsa da sonuçta ortaya çıkan etkiler itibariyle leptin sinyalinin POMC ve AgRP nöronlarındaki etkileri birbirine zıttır. Bates et al. 2003'ten.

Ayrıca leptin ve insülin sinyal yolları da belirli bazı basamaklarda kesişirler. Bu sayede bu iki hormonun etkileri eklemeli olarak ortaya çıkar (Barsh and Schwartz 2002). Arc nöronları üzerindeki leptin reseptörlerinin tek başına aktivite göstermesi belirli düzeyde bir impuls etkinliği yaratır. Ancak asıl etki pSTAT3 üzerinden gelişen gen ifadesiyledir. İnsülinin de leptinle birlikte aynı zamanda reseptörüne bağlanması nöronlar üzerindeki potansiyeli, nöronun türüne göre değişmek üzere, çok daha kuvvetli biçimde değiştirir (şekil 2.11) (Barsh and Schwartz 2002, Varela and Horvath 2012). Pro-opiomelanokortin'den türeyen tüm peptitlere melanokortinler denilir ve böylece vücut ağırlığı ve enerji harcanmasını kontrol eden bu sisteme de leptin-melanokortin sistemi adı verilir (Catania et al. 2010).



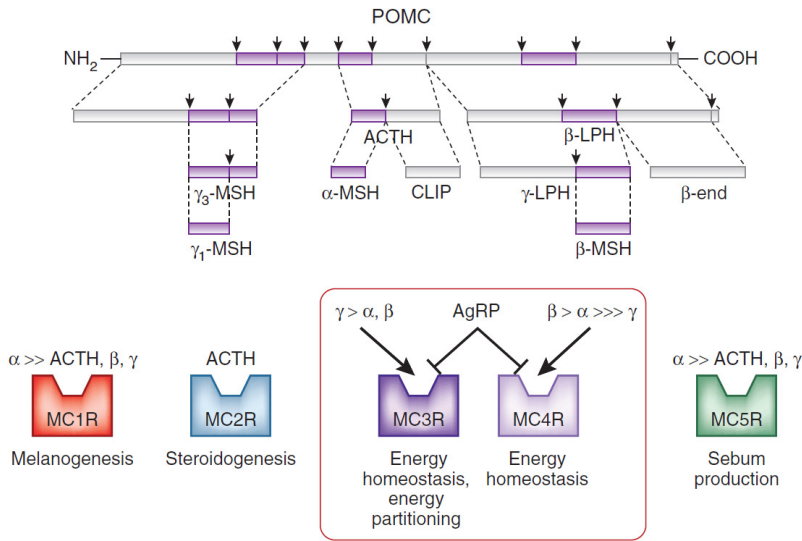
Şekil 2. 11 İnsülin ve leptin reseptör sinyali Irs fosforilasyonu basamağında kesişir. Tirozin rezidüsü üzerinden fosforile olan IRS proteini, fosfatidilinositol 3-kinaz'ı (PI3K) aktive eder. PI3K ise nöron plazma membranındaki ATP duyarlı potasyum iyonu kanallarını (K^+_{ATP}) aktive eder. Böylece bu reseptörleri taşıyan POMC ve AgRP nöronlarının membran potansiyelleri ve buna bağlı olarak da uyarılabilirlikleri değişir. Barsh and Schwartz 2002'den.

POMC ve AgRP nöronlarındaki leptin ve insülin kaynaklı gen ifade profili değişimleri de farklılıklar gösterir. Öyledir ki leptin ve insülinin etkisi altında POMC ifadesi artarken AgRP ifadesi baskılanır. Tersisi durumda ise AgRP ifadesi artarken POMC ifadesi baskılanır (şekil 2.12) (Morton et al. 2006).



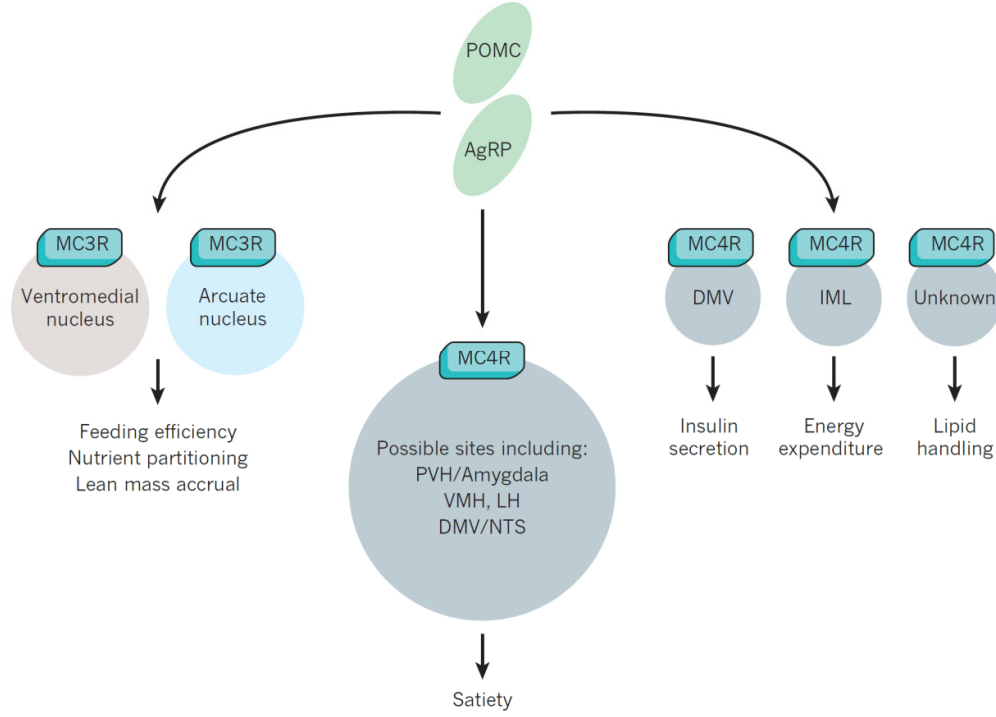
Şekil 2. 12 AgRP ve POMC genlerinin promotörlerinde hem pSTAT3 hem de FoxO1 için hedef diziler bulunur. Ancak bu transkripsiyon faktörlerinin bağlanması ilgili promotörleri farklı biçimde etkiler. FoxO1 POMC geninin ifadesini baskırlarken AgRP geninin ifadesini artırır. pSTAT3 için ise tersi geçerlidir. Leptin ve insülin sinyali STAT3 fosforilasyonu ve FoxO1 baskılanması ile POMC ifadesini artırıp AgRP ifadesini azaltırken, bu hormonlardan gelen sinyallerin azalması tersi bir etki ile AgRP ifadesini artırıp POMC ifadesini azaltır ki bu da gıda alımının artması ile sonuçlanır. Morton et al. 2006'dan alınmıştır.

Pro-opiomelanokortin ifadesini takiben farklı dokularda farklı proteazların etkinliği ile parçalanır ve α -MSH, β -MSH, γ -MSH, β -Endorfin, β -Lipotropin ve Kortikotropin veya daha iyi bilinen ismiyle Adrenokortikotropik Hormon (ACTH) üretilir. (şekil 2.13) (Yeo and Heisler 2012). Fare ve sıçan soy hattında ilgili proteaz kesim bölgeleri olmadığından γ ve β -MSH oluşmaz (Mountjoy 2010). Bu protein / peptit ürünlerinin merkezi sinir sistemindeki ve çevresel dokulardaki işlevleri farklıdır. Bunu sağlayan iki temel mekanizma bulunmaktadır. Birincisi kan beyin bariyeri nedeniyle çevresel dokulardaki melanokortinlerin merkezi sinir sistemi dokusuna giremeyişi, ikincisi ise farklı dokularda farklı reseptörlerin ifade ediliyor olmasıdır. Özellikle MC4R'ın yeme davranışının kontrolündeki önemi büyüktür. Bu reseptördeki mutasyonlar obezitenin genetik nedenleri arasında önemli bir yer tutar (Adan et al. 2006). Leptin etkinliğinin MC4R üzerinden yürüdüğü de uzun zamandır bilinmektedir (Seeley et al. 1997).



Şekil 2. 13 Melanokortinler ve reseptörleri. Tamamı POMC'den türeyen bu peptitlerin hepsine birden melanokortinler adı verilir. Kırmızı çerçeve içerisinde gösterilen etkileşimler reseptörlerinin sadece merkezi sinir sisteminde ifade ediliyor olması ve kan beyin bariyeri nedeniyle melanokortin geçişinin mümkün olmaması nedeniyle diğerlerinden farklı bir kullanım alınımlı sembolize eder. Ana peptit üzerindeki siyah oklar proteaz kesim bölgelerini işaret etmektedir. Şu ana kadar bilinen 5 farklı melanokortin reseptörü vardır. İlgili ligandların bağlanma güçleri reseptörlerin üzerinde gösterilmiştir. Yeo and Heisler 2012'den alınmıştır.

MC4R ve MC3R'nin merkezi sinir sisteminde bulunduğu konuma göre de işlevi değişmektedir. POMC nöronları beynin çok sayıda farklı bölgesine projeksiyon yaparlar ve bu bölgelerde bulunan MC4R ve MC3R'leri etkinleştirirler. Bu reseptör etkinliği bulunduğu bölgeye göre bir sonuç yaratır ve yeme davranışından metabolik hıza kadar pek çok ayarlama yapılıp (şekil 2.14) (Myers and Olson 2012).



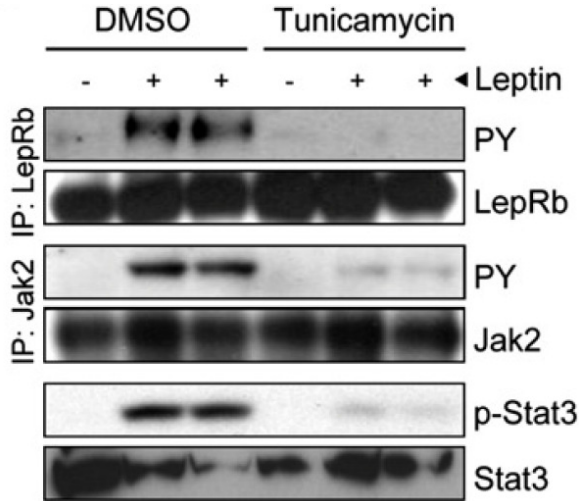
Şekil 2. 14 Merkezi sinir sistemindeki melanokortin reseptörlerinin ifade edildikleri beyin bölgesine göre farklı işlevleri vardır. Myers and Olson 2012’den alınmıştır. PVH; paraventriküler hipotalamik çekirdek, VMH; ventromedial hipotalamik çekirdek, LH; lateral hipotalamus, DMV; vagus’un dorsal motor çekirdeği, NTS; nucleus tractus solitarius, IML; omuriliğin intermediolateral hücre kolunu.

2.6 Mevcut Literatürün Işığı Altında Bu Tez Çalışmasının Ana Hipotezi

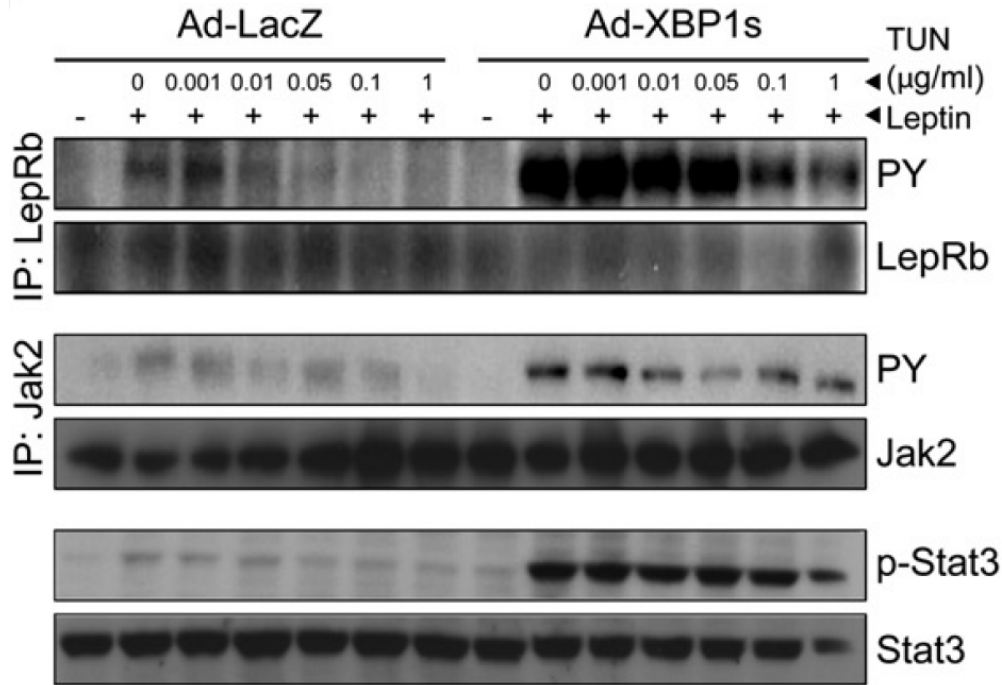
Yukarıda aktarılan literatür göstermektedir ki leptin direnci günümüzün en önemli halk sağlığı problemlerinden olan obezitenin gelişiminde merkezi bir öneme sahiptir. Yine açıkça ortadadır ki obezite hem ER stresine sebep olmakta hem de ER stresi hücre içi sinyal yollarının bozulmasına neden olarak obeziteye sebep olabilecek pek çok genetik mekanizmanın bozulmasına neden olmaktadır. Sonuçta ER stresi ile obezitenin moleküler düzeyde ilişkisini incelemek önemli ve anlamlı bir araştırma hedefi haline gelmektedir.

Ozcan et al. 2009’da yayınladıkları ilginç bir çalışmada ER stresinin leptin direnci gelişiminde önemli bir rol oynadığına dair ilk kanıtları ortaya koymuşlardır. Ozcan ve arkadaşları önce hücre kültüründe ER stresinin LepRb sinyalini azalttığını göstermiş (şekil 2.15) daha sonra da yine hücre kültüründe yüksek XBP1 etkinliğinin LepRb sinyalini kuvvetlendirdiğini göstermişlerdir (şekil 2.16). Ardından nestin promotörü taşıyan Cre rekombinaz transgenik hayvanlarla XBP1 floxed hayvanları çaprazlayarak nöron spesifik

XBP1 knock out hayvan üretmişlerdir. Araştırmacılar bu hayvanların son derece yüksek bir leptin direnci geliştirdiğini ve HFD koşullarında XBP1 floxed kontrollerinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla kilo aldıklarını ortaya koymuşlardır (şekil 2.17).

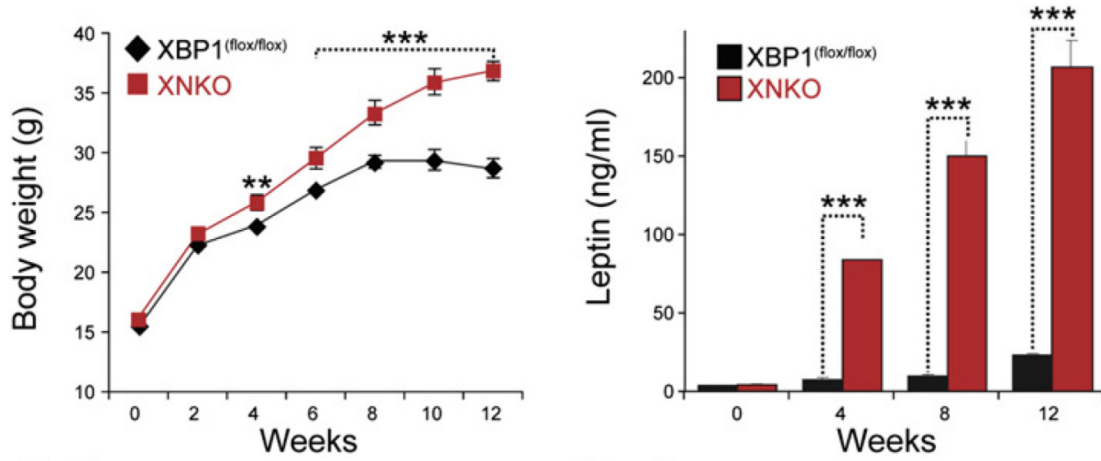


Şekil 2. 15 LepRb ifade eden plazmit ile transfekte edilmiş Hek293 hücrelerinde tunicamycin² ile indüklenmiş ER stresinin LepRb fosforilasyonu, Jak2 fosforilasyonu ve STAT3 fosforilasyonuna etkisi. Ozcan et al 2009'dan.



Şekil 2. 16 LepRb ifade eden Hek293 hücrelerinde adenovirüs ile aşırı miktarda ifade edilen XBP1'in tunicamycin ile tetiklenmiş ER stresin LepRb sinyalini bozucu etkisini azalttığını gösterir westernblotlar. XBP1 ifadesinin negatif kontrolü olarak LacZ kullanılmıştır. Ozcan et al. 2009'dan.

² Tunicamycin ER içindeki glikozilasyon enzimlerini inhibe ederek protein katlanmasını bozan ve yapay bir ER stresi yaratmak amacıyla sıklıkla kullanılan bir kimyasaldır.



Şekil 2. 17 Sinir sisteminde XBP1 silinmiş deney hayvanlarının leptin direnci geliştirmesi. Nöron spesifik XBP1 knock out hayvanlar (XNKO) ile onların flox kontrollerinin (XBP1^(flox/flox)) HFD koşullarında beslenirken zamana bağlı vücut ağırlığı ve kan leptin düzeyleri değişimi. Ozcan et al. 2009'dan. ***p < 0,001

Tüm bu literatür bilgisi ve gelinen nokta dikkate alındığında ER stresinin merkezi sinir sistemi üzerinde etki göstererek bir leptin direnci yarattığı hedef nöron grubunun tespiti önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasının ana hipotezi bu nöron grubunun, yeme davranışını baskılayan sinyalleri üreten ve üzerindeki leptin reseptörleri ile doğrudan doğruya kan leptin düzeylerini algılayan POMC nöronları olabileceğidir. Eğer bu nöronlarda meydana gelen ER stresi leptin sinyalini etkiliyorsa bu durum hem kilo alma ile sonuçlanabilir hem de bu nedenle kronik bir hiperleptinemiye neden olup bir leptin direnci geliştirebilir. Bu tez çalışmasında üretilen POMC spesifik Cre rekombinaz üreten XBP1 floxed deney hayvanlarının incelenmesi ile bu hipotez test edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında model olarak seçilen *Mus musculus* B6 suşunun POMC nöron spesifik XBP1 geni silinmiş bir soyu ile bunun kontrolü olarak, yabanıl türe eşdeğer (aynı genetik alt yapıya sahip) soyları kullanılmıştır. Yapılan deney ve çalışmalar iki ana grup altında sınıflandırılabilir. Bunların özet halindeki bir dökümü aşağıda verildiği gibidir.

A.) Canlı Hayvanlarla Yapılan Çalışmalar

- Hayvanların vücut ağırlıklarının takibi
- Hayvanların gıda alımlarının takibi
- Hayvanların CLAMS sistemi kullanılarak metabolik ölçümlerinin yapılması
- Hayvanların vücut sıcaklıklarının rektal prob kullanılarak ölçülmesi
- Glikoz tolerans testi (GTT)
- İnsülin tolerans testi (ITT)
- Hayvanların yağ doku yüzdelerinin DEXA ile belirlenmesi

B.) Deneysel Grubundaki Hayvanların Dokuları ile Yapılan Çalışmalar

- Hayvanların kan leptin düzeylerinin ELISA ile ölçülmesi
- Hayvanların kan total kolesterol ve trigliserit düzeylerinin ölçülmesi.
- Farklı dokulardan saflaştırılan mRNA'ların qPCR analizleri

Yapılan tüm çalışmalar Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesinin Eğitim ve Araştırma Hastanesi olan Boston Children's Hospital'ın Endokrinoloji kürsüsüne bağlı araştırma laboratuvarlarından, Associate Professor Umut ÖZCAN, M.D.'nin laboratuvarı (Ozcanlab <http://www.ozcanlab.com/> 2013) ve söz konusu üniversitenin diğer laboratuvar imkânları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bütün canlı hayvan çalışmaları ise yine aynı üniversite hastanesinin hayvan çalışmaları için kurulmuş bulunan araştırma laboratuvarında (ARCH: Animal Resources of Children's Hospital / Karp and Enders Buildings, Longwood Ave.) gerçekleştirilmiştir.

3.1 Canlı Hayvanlarla Yapılan Çalışmalar

Çalışmada kullanılan canlı, genetik temeli itibariyle *Mus musculus*'un Black6 (B6) diye bilinen C57BL/6J soyudur. Bu fare soyu Jackson laboratuvarlarınca satılmaktadır (stok numarası: 000664 <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html> 2013). Çalışmada kullanılan pro-opiomelanokortin sentezleyen nöronlara (POMC nöron) özgül olarak XBP1 geni silinmiş varyete ise, bu soyun özel olarak üretilmiş iki varyantının çaprazlanmasıyla elde edilmiştir. Bunlar sırasıyla genomunda, POMC geninin promotorunu 5' bölgesinde

bulunduran bir Cre rekombinaz geni taşıyan transgenik bir soy (B6.FVB-Tg(Pomc-cre)1Stl/J) (stok numarası: 010714 <http://jaxmice.jax.org/strain/010714.html> 2013) ile genomdaki Xbp1 geni LoxP dizileri arasına alınmış (floxed) bir diğer transgenik soydur. Bu Xbp1 floxed soy ise doğrudan doğruya bu soyu geliştiren Dr. Laurie H. Glimcher'dan alınmıştır (Ozcan et al. 2009, Hetz et al. 2008). Bu soyda, Xbp1 geninin 2 numaralı ekzonu LoxP dizileri arasına alınmıştır. Cre rekombinaz ifade eden her hücrede kesilerek ortadan kaldırılır ve işlevsiz bir Xbp1 geni oluşmasına yol açar. Çalışmada kullanılan gen silinmiş (knock out) hayvandaki Cre rekombinaz ifadesi POMC genine ilişkin promotörün kontrolü altında olduğundan sadece POMC ifade eden hücrelerde Xbp1 genini silmek mümkün olmuştur.

3.1.1 Cre-Lox rekombinasyonu

Cre-Lox rekombinasyonu istenen gen veya genleri silinmiş (knock out), sadece belirli bazı dokularda silinmiş ve tüm vücutta veya yine sadece belirli bazı dokularda aşırı ifade edilen genleri olan deney hayvanları oluşturmak için sıklıkla kullanılan bir sistemdir. Dizi özgül rekombinasyona (site-specific recombination) dayalı bu teknik DuPont firmasından Dr. Brian Sauer tarafından geliştirilmiştir (Sauer 1987, Sauer and Henderson 1988). Tekniğin esası, bakteriyofaj P1'in Cre rekombinaz adlı enzimi aracılığıyla, 34bç'lik LoxP dizilerine özgül olarak bağlanıp, bu dizilerin yerleşimlerine göre, aynı DNA zinciri üzerinde kesip çıkartma rekombinasyonu yapmasına dayanır (Sternberg and Hamilton 1981, Nagy 2000, <http://cre.jax.org/introduction.html> 2013). Böylece uygun yönelimdeki iki LoxP dizisi arasındaki DNA parçası Cre rekombinaz ifade eden her hücrede aradan kesilip çıkartılır ve atasal DNA molekülünün açıkta kalan uçları da birleştirilir. Bu sayede bu teknik, Cre rekombinazın ifade edildiği hücre ve zaman, LoxP dizilerinin arasında işlevsel bir gen veya işlevsel bir genin çalışmasını engelleyen bir dizinin yerleştirilmesi gibi çeşitli varyasyonlarla kullanılarak, istenilen gen silinmiş veya gen aktarılmış model organizmanın üretilmesine olanak vermektedir.

3.1.2 Deney gruplarının oluşturulması

Heterozigot ve homozigot Xbp1 floxed hayvanlar ($Xbp1^{f(+/-)}$ ve $Xbp1^{f(+/+)}$), heterozigot $POMC^{Cre}$ hayvanlar ($POMC^{Cre(+/-)}$) ve çifte heterozigot $POMC^{Cre(+/-)}$, $Xbp1^{f(+/-)}$ hayvanlarla çitleştirilip deneyde kullanılan üç farklı genotipte yavru döl üretmeleri sağlanmıştır. Bunlar sırasıyla gen silinmiş ($POMC^{Cre(+/-)}$, $Xbp1^{f(+/+)}$), floxed kontrol grubu ($POMC^{Cre(-/-)}$, $Xbp1^{f(+/+)}$) ve Cre kontrol grubu ($POMC^{Cre(+/-)}$, $Xbp1^{f(-/-)}$) şeklindedir. F1 kuşağı 5 haftalık

olduğunda genotiplenmiş ve 6.haftada her genotipten çizelge 3.1’de gösterildiği gibi sadece erkek hayvanlardan oluşacak şekilde ikişer kafes kurulmuştur. Böylece dışı hayvanların hormonal döngülerinden etkilenmeyecek ve her kafesin kendine eş bir biyolojik kontrolünün de bulunduğu bir deney kurulumu hedeflenmiştir.

Cre rekombinazın aşırı ifadesinden kaynaklanabilecek etkileri en aza indirebilmek için Cre kontrol ve Knock out hayvanların sadece tek bir Cre rekombinaz kopyası taşımaları sağlanmıştır. Bu amaçla çiftleştirme kafesleri kurulurken kullanılan hayvanlardan sadece birinin Cre rekombinaz taşınması sağlanmıştır. Elde edilen yavru döllerin genotiplenmesi ile deney gruplarında kullanılacak hayvanlar seçilmiştir.

Yem Çeşidi	Fenotip	Genotip	Kafes / Hayvan Sayısı
Klasik Yem	Knock out	POMC ^{Cre^(+/-)} , Xbp1 ^{f(+/+)}	2 / 10
Klasik Yem	Flox Kontrol	POMC ^{Cre^(-/-)} , Xbp1 ^{f(+/+)}	2 / 8
Klasik Yem	Cre Kontrol	POMC ^{Cre^(+/-)} , Xbp1 ^{f(-/-)}	2 / 8
HFD	Knock out	POMC ^{Cre^(+/-)} , Xbp1 ^{f(+/+)}	2 / 10
HFD	Flox Kontrol	POMC ^{Cre^(-/-)} , Xbp1 ^{f(+/+)}	2 / 9
HFD	Cre Kontrol	POMC ^{Cre^(+/-)} , Xbp1 ^{f(-/-)}	2 / 10

Çizelge 3. 1 Deneyde kullanılan kafes ve hayvanların sayıları ile aldıkları yem çeşidini gösterir çizelge. HFD (High Fat Diet), Research Diets, Inc. şirketince hazırlanan ve içeriğinin kcal cinsinden %45’i yağ olan yüksek şekerli bir yemdir. Kcal olarak %17’si, ağırlıkça ise %20’si sükrözür.

Yüksek kalorili ve lezzetli gıdalarla beslenen hayvanların “diyet ile tetiklenmiş obezite” (diet induced obesity / DIO) diye adlandırılan bir şekilde kilo aldıkları bilinmektedir. İnsanlardaki obezite sorununu temsil etmek için kullanılan genel geçer hayvan modeli de budur. Zira nadir görülen bazı tek gen mutasyonları haricinde, insanlarda gözlenen aşırı kilo sorununun temelinde alınan gıdanın çeşidi, genetik faktörler ve yaşam tarzı gibi birden çok etmenin rol aldığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan obez hayvan modeli “Diyet ile Tetiklenmiş Obezite” (Diet Induced Obesity / DIO) olarak seçilmiştir. İlgili gen değişiminin etkisi “Yüksek Yağlı Diyet” (High Fat Diet / High Fat High Sucrose Diet / HFD) ve bunun kontrolü olarak da normal diyet ile beslenen hayvanlarda incelenmiştir.

3.1.3 Vücut ağırlıklarının takibi

Deneyin başlamasını takiben hayvanların vücut ağırlıkları her haftada bir defa olmak üzere düzenli olarak tartılarak kaydedilmiştir. Bu amaçla hayvanın hareketliliğinden

etkilenmeyen özel bir tartı kullanılmıştır. Bu tartı 10 saniyelik bir zaman aralığında ölçümler alıp bunların ortalamasını vermektedir.

3.1.4 Gıda alımlarının takibi

Deneyin başlamasını takiben kafeslere araştırmacı haricinde yem eklenip çıkartılmaması gerektiğine dair etiketler konulmuş ve ağırlığı bilenen miktarda yem verilen hayvanların, en az 4 en çok 7 günlük gıda tüketimleri haftada bir defa olarak hesaplanmıştır. Bu değer kafesteki hayvan ve bir önceki ölçümden sonra geçen gün sayısına bölünerek “hayvan başına düşen gıda alım değeri” olarak kullanılmıştır.

3.1.5 Hayvanların metabolik düzeylerinin ölçülmesi

Hayvanların metabolik düzeylerine ilişkin veriler, Columbus Instruments firmasınınca üretilen özel bir metabolik kafes sisteminde ölçülmüştür. Bu deney sistemine CLAMS (Comprehensive Lab Animal Monitoring System) adı verilmektedir (<http://www.colinst.com/brief.php?id=61> 2013). Bu sistemde her bir hayvan şeffaf ve solunum gazları açısından tamamen izole bir kafes içerisine alınır. Her bir kafes otomatik sistemlerce su ve hava ile beslenir ve çıkan solunum gazları da ayrı bir kanaldan toplanarak incelenmektedir. Ayrıca şeffaf kafesin 4 tarafında bulunan ve kızılötesi dalga boyunda çalışan alıcı ve vericilerle, hayvanın hareketleri de kaydedilmektedir. Bu alıcı ve vericiler sayesinde hayvanların kafes yüzeyi dikkate alındığında iki boyuttaki hareketlilikleri ölçülebilmektedir. Tüm bu veriler birlikte ele alındığında her bir hayvanın metabolik düzeyini hesaplamak mümkün olmaktadır.

3.1.6 Vücut sıcaklıklarının rektal prob kullanılarak ölçülmesi

Hayvanların vücut sıcaklıkları, her defasında günün aynı saatinde olmak üzere, birer hafta arayla üç defa ölçülmüştür. Bu amaçla rektal problu hassas termometre kullanılmıştır. Prob ile her hayvanın rektumundan en az 5 saniye beklendikten sonra ölçüm alınmış, her ölçümde probun pozisyonu aynı tutulmuştur. Her ölçümden sonra prob başı %70 etanol çözeltisi ile ıslatılmış bez ile silinerek temizlenmiştir.

3.1.7 Glikoz tolerans testi (GTT)

Hayvanların obezite, leptin direnci, yeme davranışının bozulması ve metabolik sendrom yönünden incelendiği her durumda, tüm bu bozuklukların önemli bir göstergesi olan kan şeker düzeyleri ve bu düzeyin kontrolünü sağlayan mekanizmaların ne kadar sağlıklı

çalıştıklarının kontrolü yapılmıştır. Bu amaçla uygulanan iki temel testten biri glikoz tolerans testidir (GTT). Bu test ile hayvanların kan glikoz düzeylerindeki ani bir artışa verdikleri tepki ölçülür.

HFD ve Chow diet grupları GTT işlemine ayrı ayrı tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla hayvanlar testten bir gece önce (saat 19.00'da) tartıldı ve temiz kafeslere alınarak aç bırakıldı. Ertesi sabah 8.00'de önce açlık kan glikoz değerleri, kuyruklarında açılan kesi yoluyla alınan kandan, glikoz metre ile ölçüldü. Takiben her hayvana 1mg/kg (hayvanın kg vücut ağırlığı başın 1mg glikoz denk gelecek) konsantrasyonda ve aynı hacimde (200µl) olacak şekilde, intraperitoneal yoldan (IP) steril glikoz çözeltisi enjekte edildi. İlk enjeksiyonla birlikte sayaç çalıştırıldı ve 15., 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda kan şekerleri ölçüldü.

3.1.8 İnsülin tolerans testi (ITT)

GTT uygulaması ile aynı nedenlerle insülin tolerans testi (ITT) de uygulanmıştır. Bu test ile hem insüline verilen sistemik cevap, hem de karaciğerin ani olarak düşen kan glikoz düzeylerini düzeltecek şekilde glikoz salımı yapma yeteneği incelenmiştir.

HFD ve Chow diet grupları ITT işlemine ayrı ayrı tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla hayvanlar testin yapılacağı günün sabahı (saat 8.00'de) tartıldı ve temiz kafeslere alınarak aç bırakıldı. Öğleden sonra (saat 14.00'de) önce açlık kan glikoz değerleri, kuyruklarında açılan kesi yoluyla alınan kandan, glikoz metre ile ölçüldü. Takiben her hayvana 1,25IU/kg (hayvanın kg vücut ağırlığı başın 1,25 ünite insülin denk gelecek) konsantrasyonda ve aynı hacimde (200µl) olacak şekilde, intraperitoneal yoldan (IP) steril insülin çözeltisi enjekte edildi. İlk enjeksiyonla birlikte sayaç çalıştırıldı ve 15., 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda kan şekerleri ölçüldü.

3.1.9 Vücut yağ doku yüzdelerinin DEXA ile belirlenmesi

Hayvanların kilo almaları her zaman yağ depoladıkları anlamına gelmez. Eğer kas dokusu veya diğer bazı dokular hipertrofi ve veya hiperplazi geliştiriyorlarsa bu durum da hayvanın ağırlığında bir artışa neden olabilir. Böyle bir durumun söz konusu olup olmadığını analiz edebilmek için deneyde kullanılan tüm hayvanlara DEXA analizi yapılmıştır. DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry) cihazı, yağ doku ve diğer dokular için absorpsiyon katsayıları farklı olan iki ayrı dalga boyunda X ışını kullanarak, canlının vücudundaki yağ yüzdesini belirler. Bu amaçla hayvanlar isoflurane (2-chloro-2-

(difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoro-ethane) ile uyutulmuş ve DEXA cihazı ile vücutlarındaki yağ yüzdeleri belirlenmiştir.

3.2 Deneysel Grubundaki Hayvanların Dokuları ile Yapılan Çalışmalar

Canlı hayvanlarla yapılan çalışmaların tamamlanmasını takiben deney grubundaki hayvanlar önce CO₂ ile ötenazi edilmiş ve ardından göğüs kafesleri açılarak sağ ventrikül yoluyla kan toplanmıştır. Heparinize tüplere alınan kan +4°C’da santrifüj edilip serum fraksiyonu -80°C’da muhafaza edilmiştir. Diseksiyon hayvanlarından toplanan dokular; Beyaz yağ doku (epididimal), kahverengi yağ doku (intraskapular), karaciğer, hipotalamus, serebral korteks ve hipofizdir.

3.2.1 Kan leptin düzeylerinin ELISA ile ölçülmesi

Hayvanların bir leptin direnci geliştirip geliştirmediği, kan leptin düzeyleri ve vücut ağırlığı ilişkisine bakılarak incelenebilir. Zira tanımı gereği leptin direnci; “obez bir canlıdaki yüksek leptin düzeyinin, yemeyi azaltma veya obeziteyi engelleme yeteneğini yitirmiş olmasıdır” (Myers et al. 2008).

Bu amaçla Crystal Chem, Inc. firmasının ürettiği fare leptin ELISA kiti (katalog no: 90030) kullanılmıştır. Standardın tespit aralığının çok üstünde kalan HFD grubu hayvanların leptin düzeyleri, ilgili kitin örnek seyreltme çözeltilisi kullanılarak 1/5 oranında seyreltilen serumlardan ölçülmüştür. Normal diyetle beslenen hayvanların serumları ise doğrudan doğruya kullanılmıştır.

3.2.2 Kan total kolesterol, serbest gliserol ve trigliserit düzeylerinin ölçülmesi.

Enerjinin yağ olarak depolanması ve yağ dokuda depo edilmiş bulunan besinin kullanılması sempatik sinir sistemi ve adrenerjik reseptörler yoluyla merkezi sinir sistemi kontrolü altındadır. Merkezi sinir sisteminin bu kontrolünde meydana gelmiş olabilecek değişikliklerin incelenmesinde kolesterol ve trigliserit miktarlarının bilinmesi önem arz etmektedir. Bu amaçla enzim reaksiyonuna dayalı iki farklı yöntemle hem kan kolesterol hem de trigliserit miktarları ölçülmüştür.

Hayvanların total kan kolesterol düzeylerinin ölçümü için Thermo Scientific firmasının Infinity Cholesterol Liquid Stable Reagent’ı kullanılmıştır. Serum trigliserit düzeyi ise Sigma-Aldrich firmasının Serum Triglyceride Determination Kit’i (katalog no: TR0100) kullanılarak ölçülmüştür.

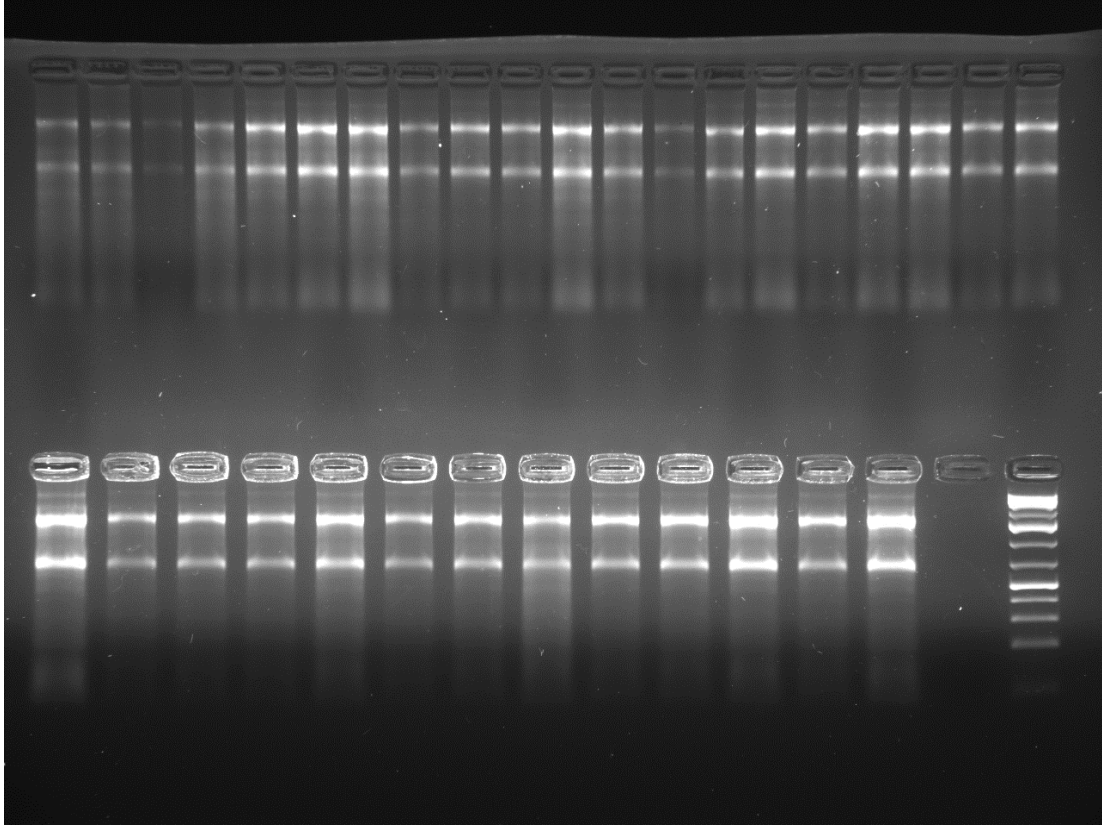
Total kolesterol ölçümlerinde HFD grubu hayvanların serumları PBS ile 1/5 oranında seyreltilerek, normal diyet grubundaki hayvanların serumları ise seyreltilmeden kullanılmıştır. Aynı seyreltme yaklaşımı serbest gliserol ve trigliserit ölçümleri için de uygulanarak tüm okumaların 1 – 0.1 absorbans aralığında olması sağlanmıştır.

3.2.3 Farklı dokulardan saflaştırılan mRNA'ların qPCR analizleri

Canlı hayvan çalışmalarından elde edilen verilerin istatistiksel incelemeleri özellikle HFD grubu hayvanlar arasında genotip ile ilişkili anlamlı farklılıklar ortaya koyduğundan bu farklılıkların sebebi olabilecek genlerin ifade düzeylerindeki olası değişimler incelenmiştir. Özellikle kahverengi yağ dokuda farklılaşma ve enerji üretimi, Xbp1 hedef genleri, POMC nöronlarının bulunduğu arcuate nükleus'ta üretildiği bilinen ve yeme davranışı üzerinde etki gösteren nöropeptitlerin genleri gibi hedefler, qPCR ile incelenmiştir.

Bu amaçla ilgili dokulardan trizol ile mRNA izole edilmiştir. Saflaştırılan mRNA'ların konsantrasyonları nanodrop ile ölçülmüştür. Ayrıca RNA'lar agaroz jel elektroforezi ile incelenmiş, ribozomal RNA bantlarının varlığı üzerinden kontrol edilmişlerdir (şekil 3.1). Daha sonra bu mRNA'lardan Bio-Rad firmasının ürettiği iScript cDNA Sentez Kiti (katalog no 170-8890) aracılığıyla cDNA sentezlenmiştir. Sentez sırasında konsantrasyonları bilinen örneklerin her birinden 1µg RNA kullanılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar çizelge 3.2'de verilen ve ilgili genin mRNA'sına özgül primer çiftleri kullanılarak qPCR ile incelenmiştir. qPCR çalışmasında Life Technologies (Invitrogen) firmasının ürettiği "SYBR GreenER qPCR SuperMix for iCycler Instrument" marka SYBR green mix (katalog no: 11761-02K) ve Applied Biosystems Inc. firmasının ürettiği Power SYBR Green PCR Master Mix marka SYBR green mix (katalog no: 4368702) kullanılmıştır. qPCR deneyleri Applied Biosystems viiA 7 markalı cihaz ile yapılmıştır.

qPCR primerlerinin tasarımında fare genomunda bilinen SNP'lere dikkat edilmiş ve 70 – 350 bp'lik ürün verecek, 60°C(±1°C) annealing sıcaklığına sahip ve mRNA'da karşılığı olmasına rağmen genom üzerinde hedef ile yarışabilecek ürün vermeyecek primer çiftleri seçilmiştir. Böylece olası bir DNA kontaminasyonu durumunda sonuçların olumsuz yönde etkilenmesi engellenmiştir. Ayrıca primerlerin 3' uçlarının kendine komplementer olmamasına ve primerler arasından 1°C'dan daha büyük bir sıcaklık farkı bulunmamasına da dikkat edilmiştir. Tüm primerler NCBI'nin Primer Blast algoritması kullanılarak tasarlanmıştır ve yine Primer Blast algoritması ile *Mus musculus* genomu ve transkriptomu üzerinde kontrol edilmiştir.



Şekil 3. 1 RNA ekstraktının kontrolü. qPCR incelemesine tabi tutulan tüm hayvanlardan elde edilen total RNA ekstraktı %2 agaroz jel üzerinde yürütülmüş ve ethidium bromür yardımıyla UV ışığı altında görüntülenmiştir (burada örnek olarak beyaz yağ dokudan elde edilen RNA'lar görülmektedir).

Primerin adı	5'-3' dizisi	Açıklama
SM-q-mAgRP-F	GGCTCTGTTCCAGAGTTCC	
SM-q-mAgRP-R	GATCTAGCACCTCCGCCAAA	
SM-q-mNPY-F	TGTGTTTGGGCATTCTGGCT	
SM-q-mNPY-R	TAGTGTCGCAGAGCGGAGTA	
SM-q-mPOMC-F	TGAAAACCCCGGAAGTACG	
SM-q-mPOMC-R	ACGTTGGGGTACACCTTCAC	
SM-q-mXBP1s-F	CTGAGTCCGCAGCAGGTG	Xbp1s özgül
SM-q-mXBP1s-R	TTCCAGCTTGGCTGATGAGG	Xbp1s özgül
SM-q-mXBP1u-F	AACACGCTTGGGAATGGACA	Xbp1u özgül
SM-q-mXBP1u-R	CACATAGTCTGAGTGCTGCGG	Xbp1u özgül
SM-q-mXBP1u+s-F	TACGGGAGAAAACCTCACGGC	Total Xbp1
SM-q-mXBP1u+s-R	GCCACCAGCCTTACTCCAC	Total Xbp1
SM-q-mFOXO1-F	CCGTAAGACGGGAGTCTGC	
SM-q-mFOXO1-R	TAACTTCGCTGGGTCACCG	
SM-q-mUCP1-F	CCTGCCTCTCTCGGAAACAA	
SM-q-mUCP1-R	TCTGGGCTTGCATTCTGACC	
SM-q-mUCP2-F	ACTTCACTTCTGCCTTCGGG	
SM-q-mUCP2-R	AGGAAGGCATGAACCCCTTG	

SM-q-mPPAR γ 1-F	GAGCCTGTGAGACCAACAGC	
SM-q-mPPAR γ 1-R	GGTCCACAGAGCTGATTCCG	
SM-q-mPPAR γ 2-F	GCACTGCCTATGAGCACTTCA	
SM-q-mPPAR γ 2-R	CGAGTGGTCTTCCATCACGG	
SM-q-mSOCS3-F	TTTCCAACACCGAAGGGAGG	
SM-q-mSOCS3-R	GAGGCTCTCGGACCTACTGA	
SM-q-mCOX7A1-F	AGTACACTTGAAAGGCGGGG	
SM-q-mCOX7A1-R	TGGTGTCACCTTCTTGTGGGG	
SM-q-mPGC1 α -F	TGGATGAAGACGGATTGCC	
SM-q-mPGC1 α -R	GGAGGGTCATCGTTTGTGGT	
SM-q-m-mtCox1-F	GAGCCTGAGCGGGAATAGTG	
SM-q-m-mtCox1-R	CTGTGTTATGGCTGGGGGTT	
SM-q-mAdrb3-F	CCCTCTCCAAAACCTCCATCCTC	
SM-q-mAdrb3-R	TGCTGAGGGCTTCTGGTTTC	
SM-q-mGrp78-F	ATTGGAGGTGGGCAAACCAA	
SM-q-mGrp78-R	TCGCTGGGCATCATTGAAGT	
SM-q-mF4/80-F	TCTGGGGAGCTTACGATGGA	
SM-q-mF4/80-R	GAATCCCGCAATGATGGCAC	
SM-q-mSerp1-F	GACCCTGGTTATTGGCCCTC	
SM-q-mSerp1-R	GAGGCAGGCCGATTTACTCA	

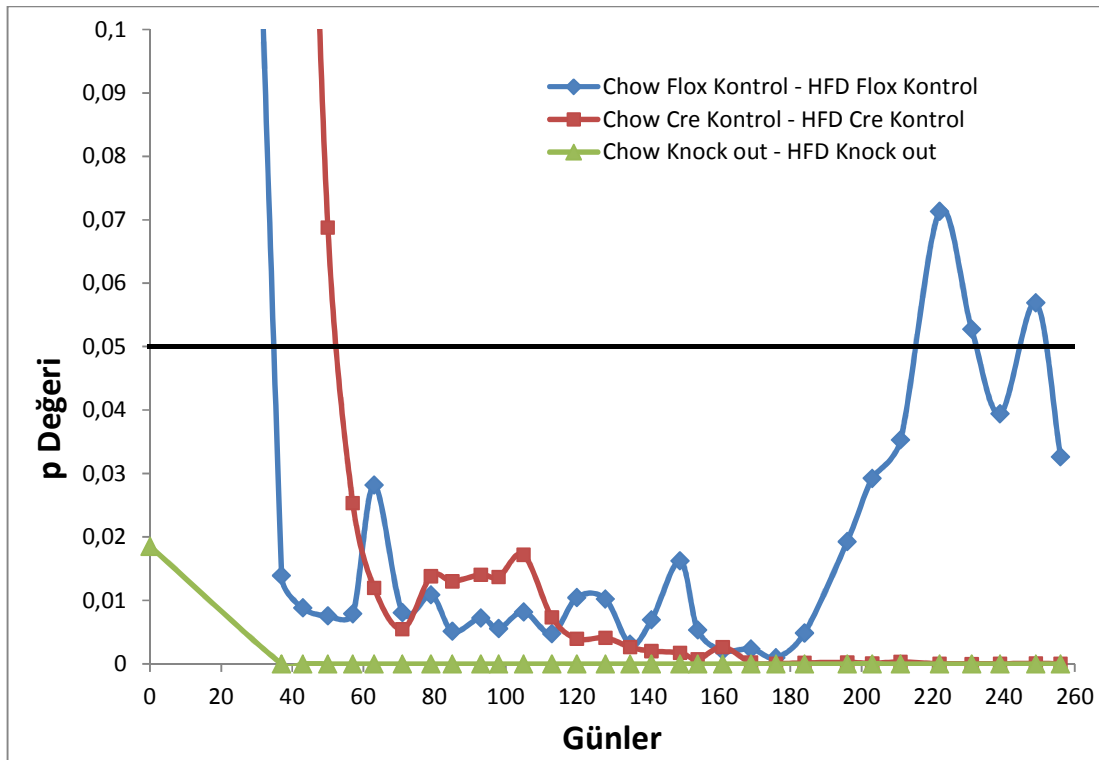
Çizelge 3. 2 Tez çalışması için tasarlanan primer çiftleri.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

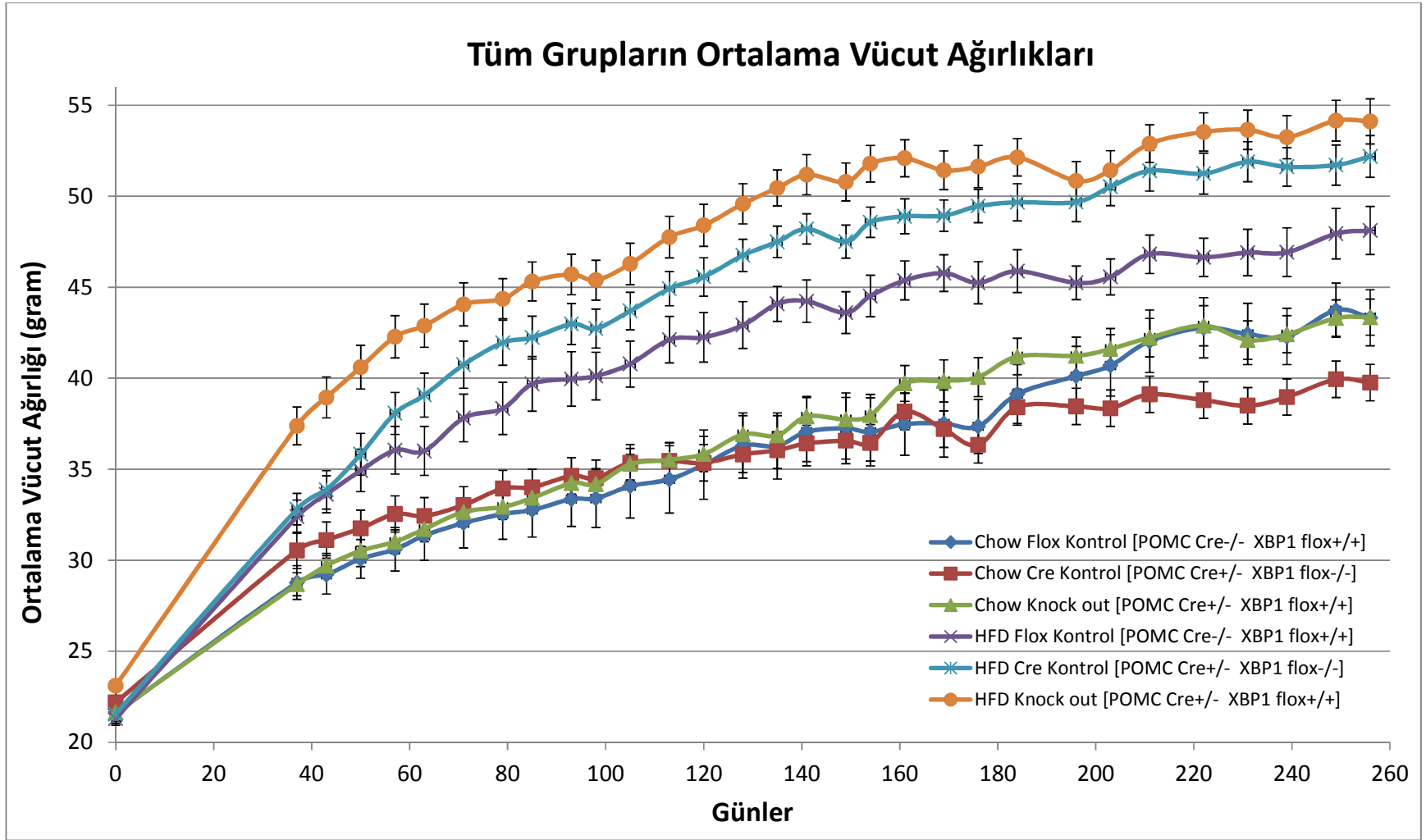
4.1 Vücut Ağırlığı Değişimleri

Obezite ile ilgili her türlü bilimsel incelemenin başlangıç noktasını vücut ağırlığının tespiti oluşturmaktadır. Bu çalışmada deney hayvanlarının vücut ağırlıkları, hem normal (chow diyet) hem de yüksek düzeyde yağ ve şeker içeren besin (High Fat Diet / HFD) ile beslendikleri durumda takip edilmiştir. Süreç içerisinde “chow diyet” diye anılan normal besini tüketen hayvanların HFD ile beslenenlerden çok daha az kilo aldıkları görülmüştür. Her diyet grubuna ilişkin her üç genotipten hayvanların ortalama vücut ağırlıkları değişimini gösterir grafik, şekil 4.2’de, ortalamanın standart hatası ile birlikte verilmiştir.

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi diyetin vücut ağırlığı üzerinde belirleyici bir etkisi vardır. Yüksek düzeyde yağ ve karbonhidrat içeren HFD ile beslenen hayvanlar, chow diyet ile beslenenlerden istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha ağırdır. Ancak aynı genotipten olup da farklı besinle beslenen deney grupları arasında gözlenen vücut ağırlığı farklılıkları her genotip için aynı düzeyde değildir. Bu farklılık knock out model organizmada en yüksek düzeye ulaşmaktadır.



Şekil 4. 1 Aynı genotipten olup da farklı besinlerle beslenen gruplar arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını sınavan t-testi "p" değerlerinin, her ağırlık ölçüm günü için aldığı değerlerin değişimini gösterir çizelge



Şekil 4. 2 Farklı genotip gruplarının, HFD ve Chow diyet ile beslendiklerinde gösterdikleri vücut ağırlığı değişimine ilişkin grafik

Şekil 4.2 ve şekil 4.1 birlikte incelendiğinde görülecektir ki diyetin vücut ağırlığı üzerindeki belirleyici etkisi son derece güçlüdür. Aynı genotipten olan gruplar diyetin değişmesi ile birlikte birbirlerinden hızla farklılaşmakta ve bütün HFD grupları ciddi biçimde kilo almaya başlamaktadır. Bu beklenen bir sonuçtur ve literatürde “diyet ile indüklenmiş obezite” (DIO) olarak anılmaktadır.

Ancak bu süreçte farklı genotipten hayvanların farklılaşma zamanlarının birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Knock out hayvanlar 6 haftalıkken alındıkları HFD’e son derece hızlı tepki verip daha ilk ağırlık ölçümlerinden itibaren aynı genotipteki chow diyet hayvanlarından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha ağır olmuşlardır. Bu durum hayvanlardaki genetik modifikasyonun diyet ile ilişkili bir etkisi olabileceğine dair ilk işarettir.

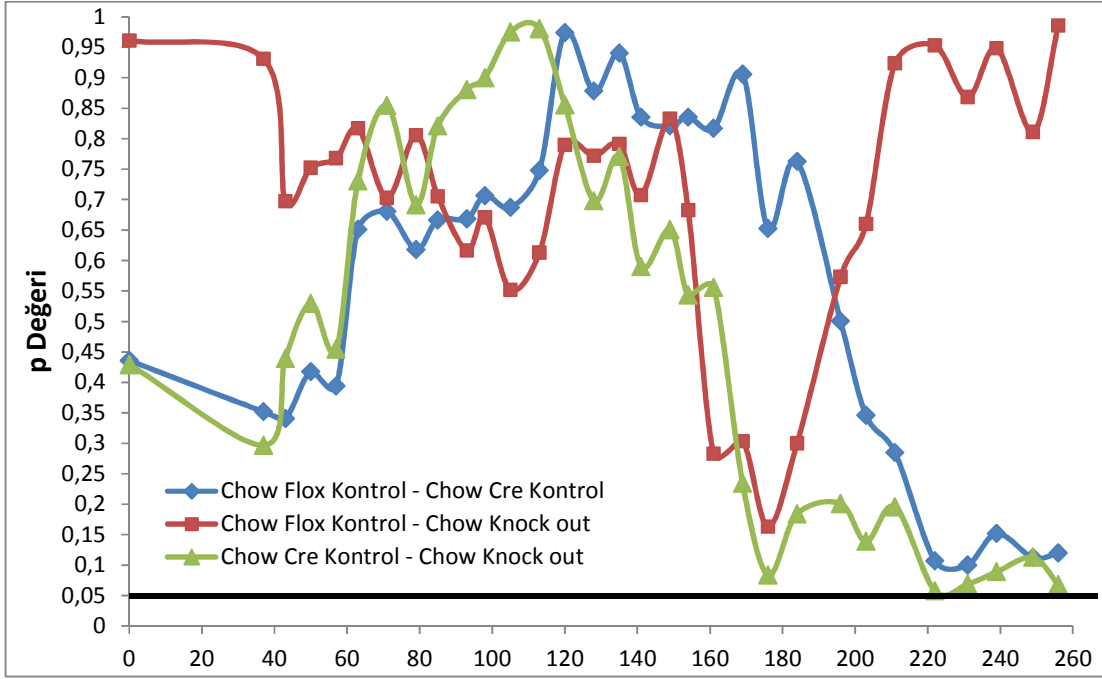
Yabanıl türe en yakın kontrol grubu olan flox kontrol hayvanlarının ilerleyen yaş ile birlikte chow diyet ile beslenirken bile kilo almaları ve HFD ile beslenen grupla olan farklılıklarının diğer genotiplere kıyasla azalması da yabanıl soya çok yakın bir reaksiyon gösterdiklerini düşündürmektedir.

Yine şekil 4.2’de incelendiğinde görülecektir ki HFD grupları kendi aralarında farklılaşarak aldıkları diyete farklı tepkiler vermektedir. Ancak bu durum chow diyet grubu için geçerli değildir. Bu ilk gözlemden çıkan en önemli sonuç üretilen genetik modelin diyet ile ilişkili tepkiler ürettiğidir. Bu durum söz konusu genetik modelin insan obezite çalışmalarında son derece önemli olabileceğini düşündürmektedir.

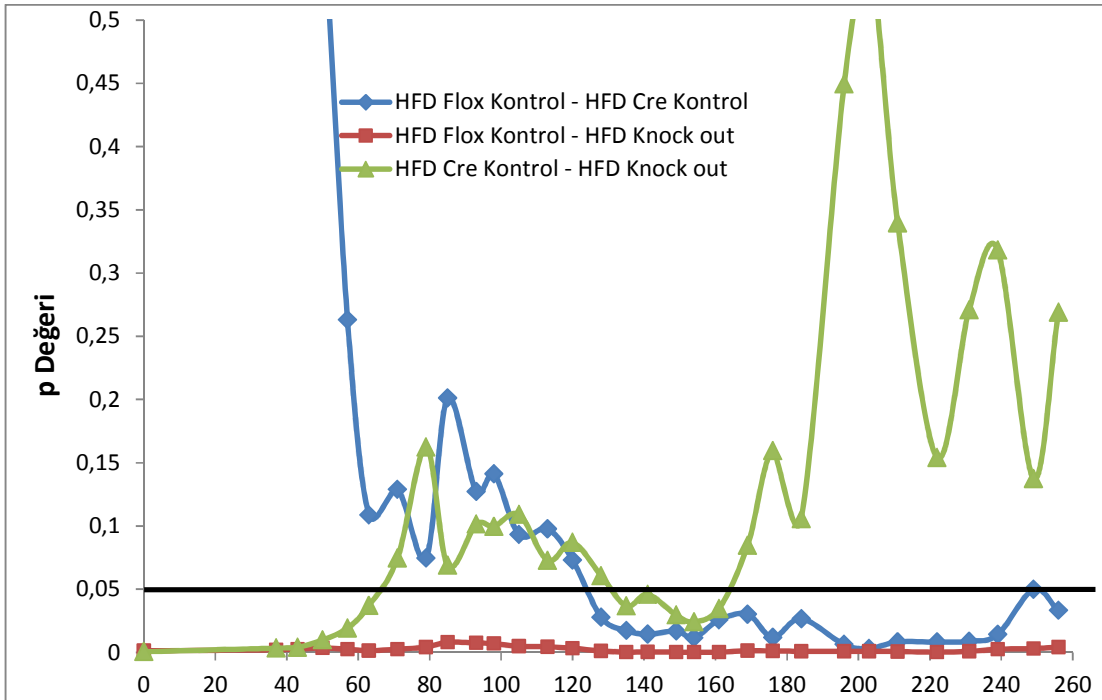
Şekil 4.3’te chow diyet ile beslenen hayvanların kendi aralarında gösterdikleri vücut ağırlığı farklılığının istatistiksel olarak anlamlılığı, her ağırlık ölçümü için hesaplanmış ve grafiğe dökülmüştür. Chow diyet Cre kontrol hayvanlarının yaşlandıkça kilo kaybetme eğiliminde olmalarına rağmen bu ağırlık farklılığı hiçbir zaman $p \leq 0,05$ değerini belirgin biçimde almamıştır. Genel olarak ele alındığında chow diyet grubu hipotezle uyumlu şekilde birbirinden farksızdır.

Şekil 4.4 ise HFD grubu hayvanların birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklılaştıklarını ortaya koymaktadır. Knock out hayvanlar flox kontrollerinden tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha ağırdırlar. Bu ilişki son derece kuvvetli olup p değeri her kıyaslamada 0,01’in altındadır. Knock out hayvanlarla Cre kontrol grupları arası farklılık ise daha değişik bir seyir izlemiş ve flox kontroller gibi çok yüksek

bir düzeyden başlamasına rağmen zamanla azalmış ve 165. günden sonra anlamsızlaşmıştır.



Şekil 4. 3 Chow diyet ile beslenen gruplar arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını sınavan t-testi "p" değerlerinin her ağırlık ölçümü için aldığı değerin zamana göre değişimini gösterir grafik

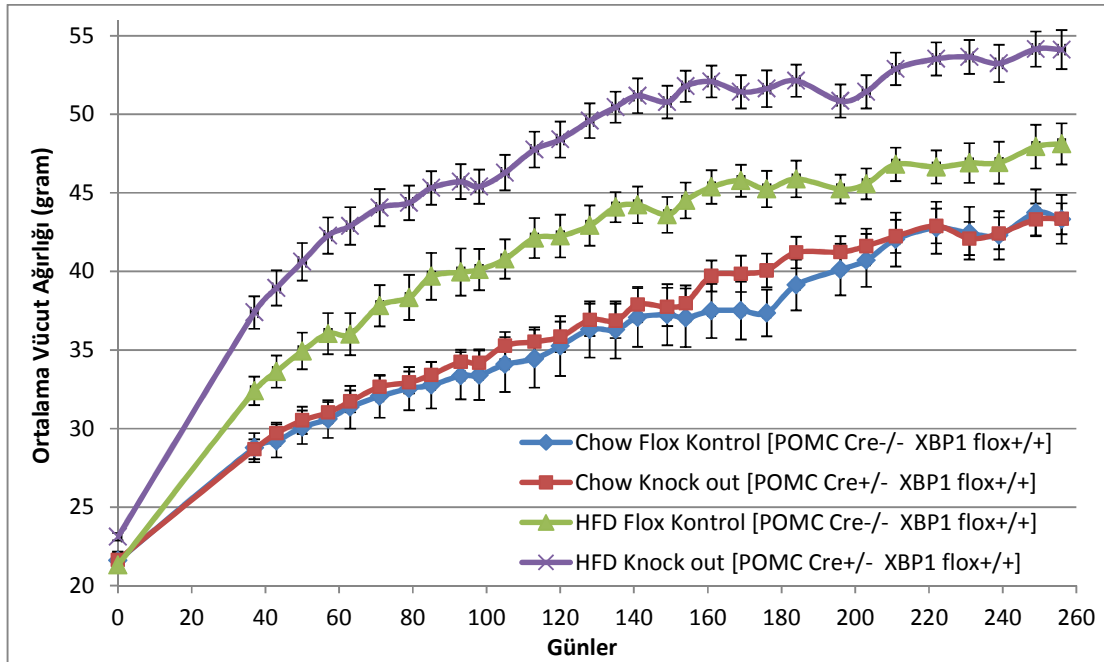


Şekil 4. 4 HFD ile beslenen gruplar arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını sınavan t-testi "p" değerlerinin her ağırlık ölçümü için aldığı değerin zamana göre değişimini gösterir grafik

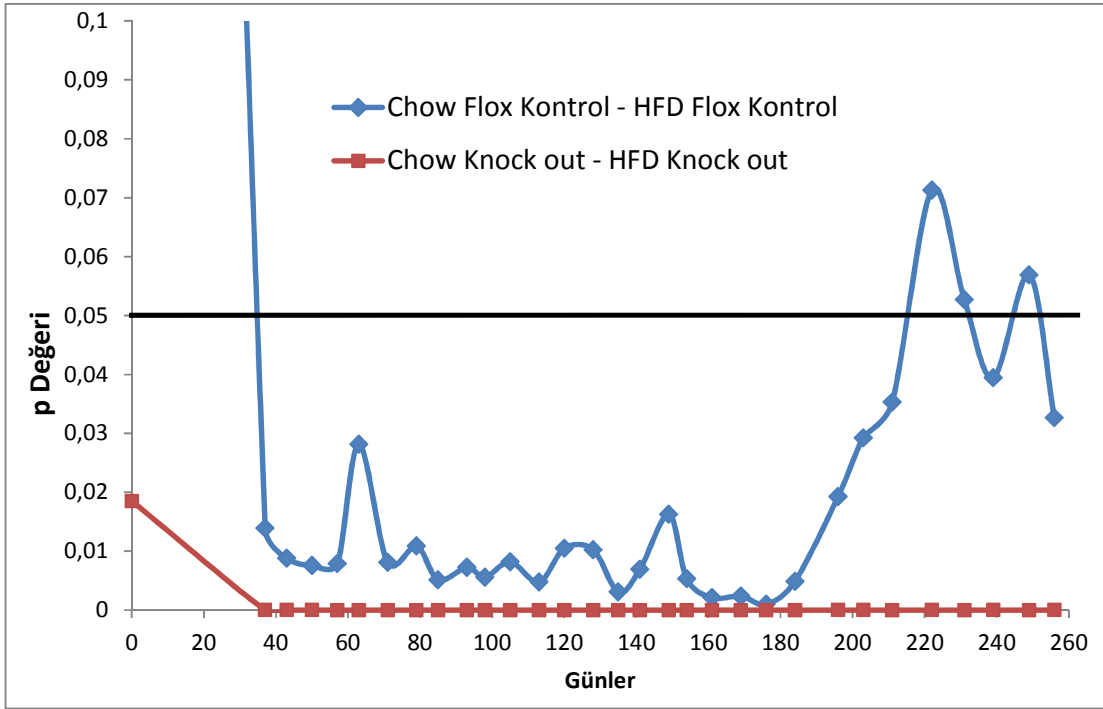
Cre kontrol grubu hayvanlar 124. gün civarında flox kontrollerden anlamlı biçimde farklılaşmış ve daha yüksek bir vücut ağırlığı sergilemeye başlamışlardır.

Tüm bu verilerden ilgili genetik değişikliğin hipotezle uyumlu şekilde diyetle bağlı bir değişiklik yarattığı ve hayvanı diyet ile tetiklenmiş obeziteye daha kolay yakalanır hale getirdiği sonucu çıkarılabilir. Böylece kilo alan hayvanlarda bir leptin direnci oluşması da beklenebilir. Ancak bu etki erken dönemli olmalıdır. Zira HFD ile beslenme nedeniyle hem knock out hem de bunun Cre ve flox kontrolleri zaten zaman içerisinde diyet nedeniyle kilo alarak leptin direnci geliştireceklerdir. Zira kilo almaya bağlı yağ doku artışı beraberinde yüksek leptin düzeyleri oluşmasına bu da leptin direncine neden olur (Knight et al. 2010). Fakat POMC nöronlarında XBP1 geninin silinmesiyle ortaya çıkartılması beklenen E.R. stresi ve ilişkili işlev bozukluğu bu leptin direncinin erken dönemde gelişmesine neden olmuş gibi görünmektedir.

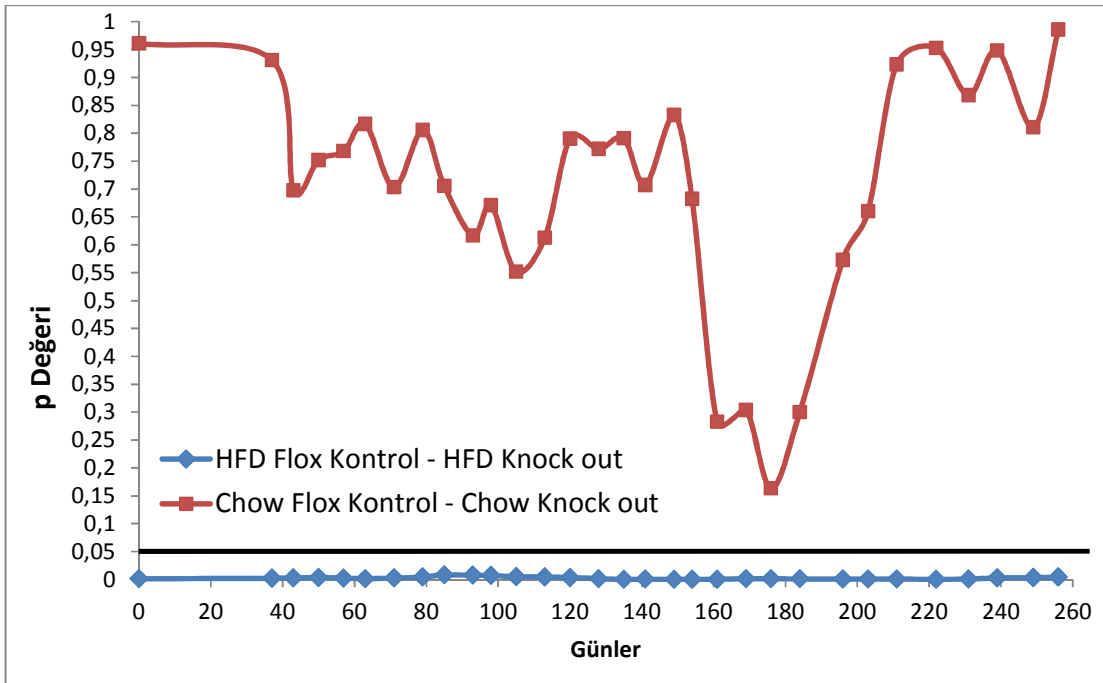
Ayrıca Cre kontrol genotipinin de belirgin bir fenotipi vardır. Bu çalışmanın temel hipotezinde belirtildiği gibi Cre rekombinaz geninin ifade edilmesi önemsiz sayılmayacak bir değişikliktir ve kontrol grubu gerektirir. Literatürdeki bu eksiklik daha ilk ölçümlerden itibaren belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır. Zira şekil 4.5, 4.6 ve 4.7’de gösterildiği gibi sadece flox kontrolle yapılan kıyaslamalar Cre rekombinazın ilgili knock out fenotipe yaptığı katkıyı gizlemektedir. Ancak her durumda knock out fenotip belirgin ve güçlüdür.



Şekil 4. 5 Sadece knock out ve flox kontrol gruplarının, HFD ve Chow diyet ile beslendiklerinde gösterdikleri vücut ağırlığı değişimine ilişkin grafik



Şekil 4. 6 Aynı genotipten olup da farklı besinlerle beslenen gruplar arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını sınavan t-testi "p" değerlerinin, her ağırlık ölçüm günü için aldığı değerlerin değişimini sadece knock out ve flox kontrol grupları için gösterir çizelge

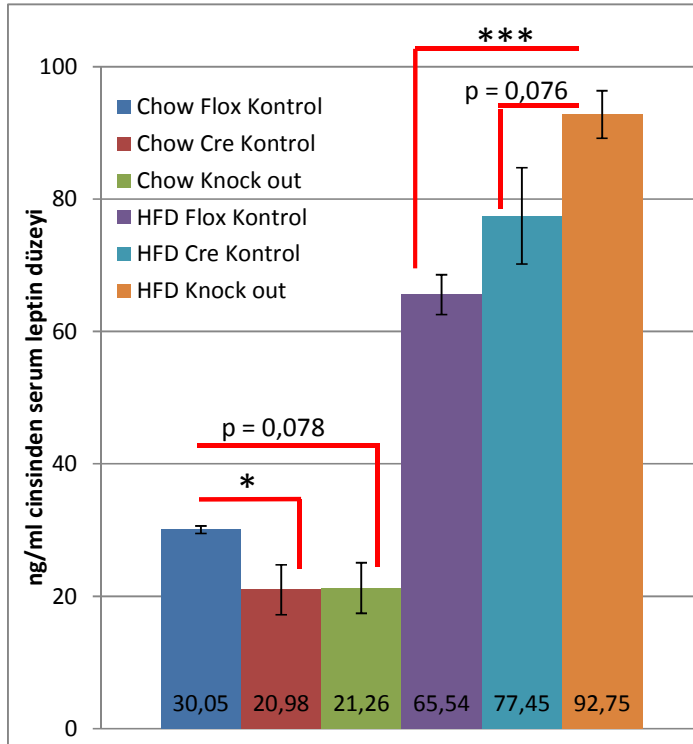


Şekil 4. 7 Flox kontrol ve knock out grupları arası vücut ağırlığı farklılığının anlamlı olup olmadığını, HFD ve chow diyet koşulları için ayrı ayrı sınavan t-testi "p" değerlerinin her ağırlık ölçümü için aldığı değerlerin zamana göre değişimini gösterir çizelge

İleride tekrar tartışılacağı üzere 70 ila 120. günler arası gözlenen dalgalanmalar büyük olasılıkla yapılan GTT ve ITT'ler nedeniyle ve yine 190 ila 210. günler arasındaki dalgalanmalar da büyük olasılıkla metabolik kafes deneyleri (CLAMS) nedeniyle. Yapılan bu tür incelemelerin tarihleri ile vücut ağırlığı ve gıda alımı grafiklerinde gözlenen dalgalanmalar bire bir örtüşmektedir. Bu tür testlerin gıda alımı üzerindeki etkisi beklentileri aşan boyutta olmuştur ve özellikle davranış çalışmalarında dikkat edilmesi gereken yeni bir olgu olarak ortaya çıkmaktadır.

4.2 Serum Leptin Düzeyi ve Leptin Direnci

Leptin direnci, obez bireylerdeki yüksek leptin düzeylerinin yeme davranışını baskılama veya azaltma kabiliyetini kaybetmesi olarak tanımlanır (Myers et al. 2008). Her ne kadar serum leptin düzeyleri doğrudan doğruya vücuttaki yağ miktarı ile orantılı olsa da (Baile et al. 2010) ve yine leptin direncinin de yüksek kan leptin düzeyinin bir sonucu olarak geliştiği bilinse de (Knight et al. 2010) kan leptin düzeylerinin ölçümü bu çalışma için temel niteliktedir. Zira ileride DEXA sonuçları çerçevesinde açıklanacağı gibi daha yüksek vücut ağırlığı her zaman için daha yüksek bir yağ yüzdesine işaret etmez. Dahası bu durum, bu çalışmadaki knock out hayvanlar için de aynen böyle bulunmuştur. Buna rağmen şekil 4.8'de görüleceği gibi knock out hayvanlar hipotezle uyumlu biçimde çok yüksek kan leptin düzeyleri sergilemektedirler.



Şekil 4. 8 Deneilerde kullanılan tüm grupların ortalama kan leptin düzeylerini ve bu ortalamaların standart hatalarını verir grafik. İlgili t testi p değerleri için “*” 0,01 < p ≤ 0,05, “***” 0,001 < p ≤ 0,01 ve “****” p ≤ 0,001 şeklinde verilmiştir.

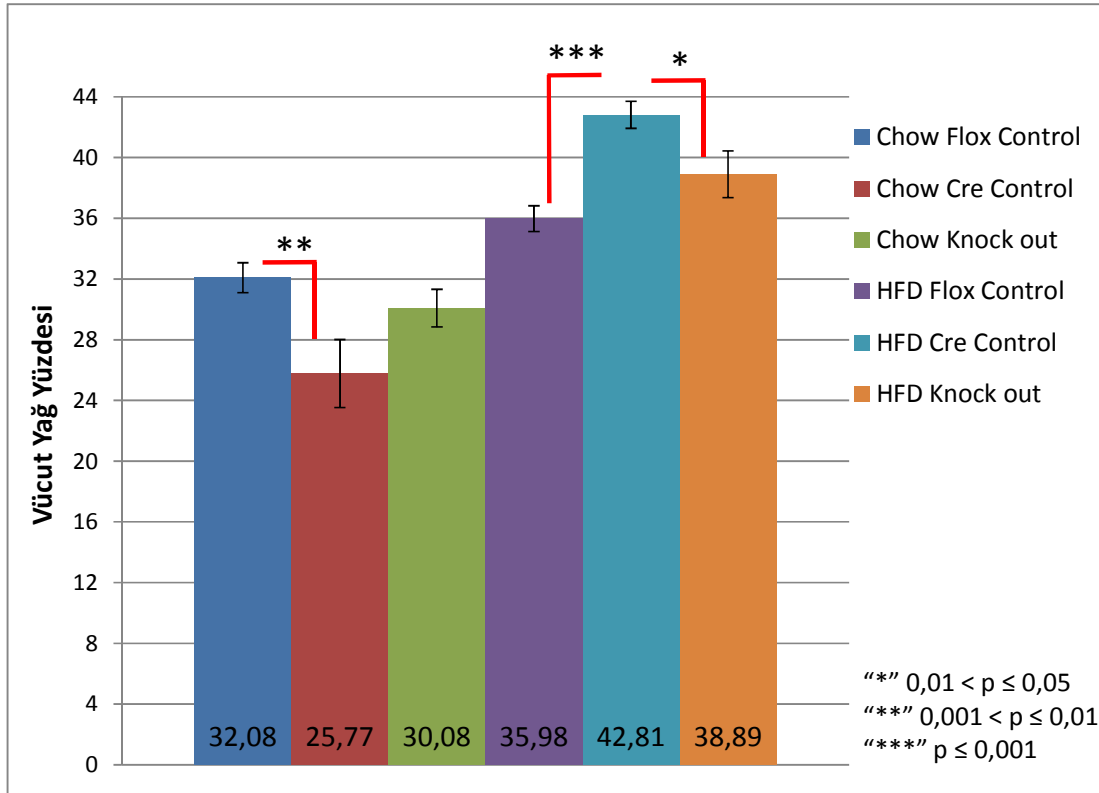
Hayvanların kan leptin düzeyleri, her genotip için, HFD ve chow diyet grupları arasında istatistiksel olarak son derece kuvvetli ve anlamlı bir farklılık taşımaktadır. Aynı genotipe sahip hayvanların farklı diyet alan grupları ile yapılan tüm kıyaslamalar için t testi p değeri 0,0001'den düşüktür. Bu beklenen bir durumdur. Zira DIO fare modelinde yüksek kan leptin düzeyleri olduğu ve bunun leptin direncine neden olduğu bilinmektedir. Ancak asıl önemli analiz chow diyet ve HFD gruplarının kendi iç farklılıklarıdır. Tıpkı vücut ağırlığı değişimlerinde olduğu gibi kan leptin düzeyi ölçümlerinde de genetik değişikliğin fenotipte etki göstermesi diyet ile bağlantılı olarak ortaya çıkmıştır.

Chow diyet grubunda sadece flox kontrol hayvanlar cre kontrol ve knock out hayvanlardan belirgin biçimde farklılaşmış ve bu farklılık sadece cre kontroller ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olacak bir düzeye erişmiştir. Ancak knock out hayvanlarla olan kıyasta da farklılaşmaya yönelik belirgin bir eğilim vardır. Chow diyetindeki flox kontrol grubunun ilerleyen yaş ile birlikte kilo aldığı şekil 4.2'de görülmektedir. Bu nedenle daha yüksek bir kan leptin düzeyi göstermeleri şaşırtıcı değildir. Aynı şekilde cre kontrol hayvanlarının aynı yaş grubunda flox kontrollerden daha düşük kilolu olması da cre rekombinaz ifadesinin yarattığı metabolik yüke bağlanabilir. Ancak şaşırtıcı olan durum knock out hayvanların flox kontrollerden istatistiksel olarak büyük ölçüde farksız ancak cre kontrollerden farklılaşma eğiliminde olmasıdır (p değerleri; Chow KO ↔ Chow Flox kıyası için 0,24 ve Chow KO ↔ Chow Cre kıyası içinse 0,09). Bu durum gen silinmesi sonucu gözlenen fenotipin büyük ölçüde diyet bağımlı olduğunu bir kere daha düşündürmektedir. POMC nöronlarının davranışında sadece genetik yapılarının değil median eminence vasıtasıyla hipotalamus arcuate çekirdeğine giren kan kökenli besin maddelerinin etkisinin de olabileceği ilk akla gelen mekanizmadır.

HFD grupları dikkate alındığında ise hipotezle üst düzeyde uyumlu olacak şekilde, knock out hayvanların flox kontrollerinden istatistiksel olarak çok kuvvetli şekilde anlamlı olacak ölçüde daha yüksek bir leptin düzeyi sergiledikleri görülmektedir. Ayrıca knock out hayvanlar cre kontrollerinden de, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen sınırın altında olmakla birlikte, önemli ölçüde farklılaşma eğilimindedirler (şekil 4.8). Bu iki grup arasında herhangi bir farklılaşma olmasaydı, gözlenen etkinin hemen tamamen cre rekombinaz etkinliğinden kaynaklandığını söylemek mümkün olabilirdi. Ancak knock out hayvanlarla cre kontrolleri arasında belirli düzeyde bir fark ve cre kontroller ile flox kontroller arasında da aynı yönde bir fark vardır. Ayrıca cre kontroller ile flox kontroller arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı sayılacak düzeye erişmemektedir (p = 0,16).

Bu durumda cre kontrol grubunun ara değeri temsil ettiği ve gözlenen fenotipin cre rekombinaz ve XBP1 silinmesinin eklemeli etkileri neticesinde geliştiği sonucu çıkarılabilir. Ayrıca cre kontrol grubunun büyük standart hatası dikkate alınır, $p \leq 0,05$ düzeyine ulaşamayan t testi değerlerinin muhtelif nedenlerle gelişmiş grup içi varyasyondan kaynaklandığı ve daha çok sayıda örneklem kullanılması durumunda her iki kıyas için de $p \leq 0,05$ değerinin gözlenebileceği sonucu çıkarılabilir.

4.3 DEXA Ölçümleri ve Vücut Yağ Yüzdesi



Şekil 4. 9 DEXA ile vücut yağ yüzdesi ölçüm sonuçları.

DEXA ölçümleri neticesinde (şekil 4.9) aynı genotipe sahip hayvanların vücut yağ yüzdelerinin yedikleri besinle ilişkili olarak farklılaştıkları istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı olarak ortaya çıkmıştır. Her HFD alan genotip kendi chow diyet eşinden t testi p değeri 0,01'den düşük olmak üzere daha yüksek bir vücut yağ içeriğine sahip çıkmıştır. Bu durum DIO modelinin başarıyla çalıştığına bir diğer kanıttır.

Vücut yağ içeriği, chow diyet ve HFD grupları kendi aralarında değerlendirildiklerinde diyete bağlı bir zıtlık göstermektedir. Chow diyet için knock out modelin cre ve flox kontrolleriyle gösterdiği ilişki örüntüsünün tam zıttı HFD grupları arasındaki ilişki

örüntüsü için geçerlidir. Bu durum oluşturulan genetik modelden gözlenen fenotipin diyet bağımlı olduğunun bir diğer güçlü kanıtını oluşturmaktadır.

DEXA ölçümlerinden çıkan çok şaşırtıcı bir sonuç, en yüksek vücut ağırlığına sahip grup olan HFD knock out hayvanların vücut yüzde yağ içeriklerinin HFD grubunun en düşük vücut ağırlığına sahip olan flox kontrol hayvanlarınkinden anlamlı ölçüde farklı olmadığına ortaya çıkmış olmasıdır. Bu durumda HFD knock out hayvanlarda gözlenen obez ve leptin dirençli fenotip, vücutta biriken yağ nedeniyle değil, aksine yağ dışı dokuların artması ve leptin üretim ve devridaim (turnover) hızının değişmesi nedeniyledir. Bu durum yağ yakan dokular üzerinde olası bir merkezi sinir sistemi uyarımını akla getirmektedir.

4.4 Gıda Alımı

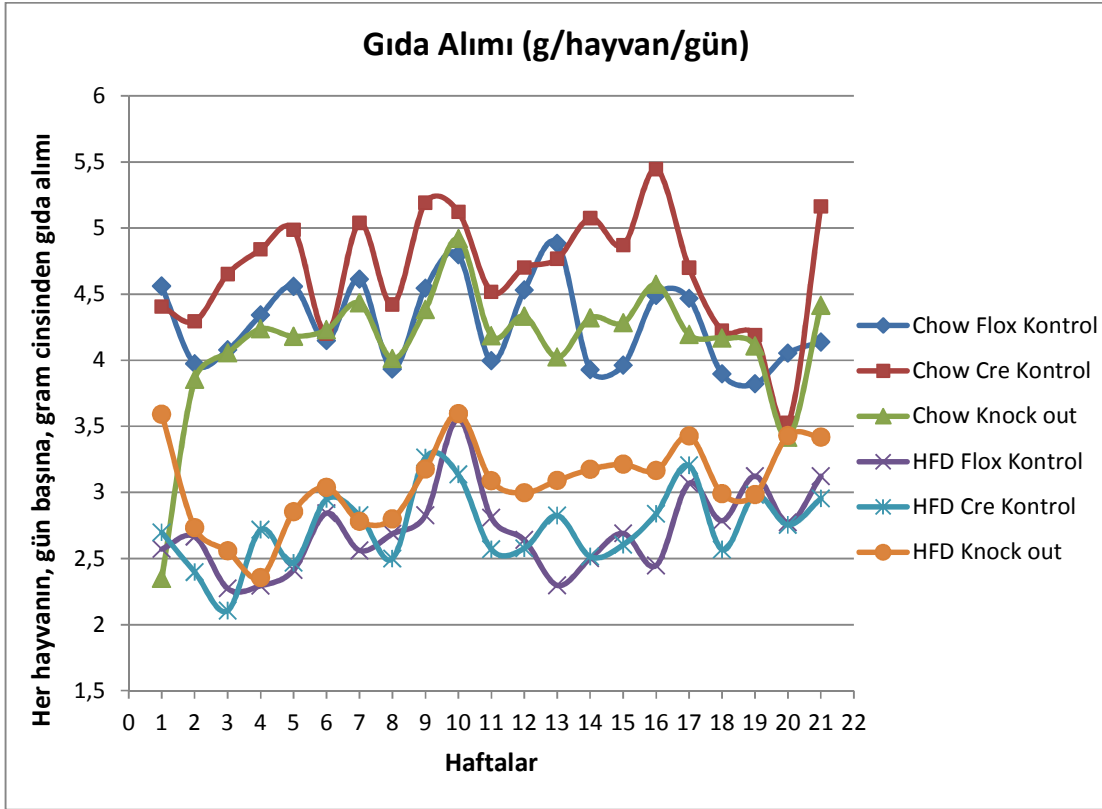
Hayvanların vücut ağırlıklarında gözlenen değişimlerin gıda alımları ile doğru orantılı olup olmadığı bir diğer önemli inceleme konusudur. Çünkü daha çok kilo alan hayvan her zaman için daha çok yiyen hayvan olmayabilir. Hayvanların hareketliliklerinde ve veya metabolik düzeylerinde büyük ölçüde değişiklik yaratan genetik bir modifikasyon, gıda alım değeri ve vücut ağırlığı arasındaki ilişkiye bakıldığında kendini ele verebilir.

Her ne kadar gıda alımı verisi, ölçümü ve incelenmesi kolay gibi görünen bir çalışma alanı olsa da aslında birkaç nedenden ötürü uygulamada ciddi zorlukları olan bir yaklaşımdır. Her şeyden önce ölçümler hemen her zaman büyük bir varyasyon gösterir. Kafesteki kavgalar, dışarıdan gelen sesler ve kan şekeri ölçümü gibi basit görünen her deneysel uygulama neticesinde hayvanların yeme davranışında büyük değişiklikler olmaktadır. Ayrıca gıda alımı her ölçüm dönemi için diğerlerinden bağımsız bir olay olarak tanımlanamaz. Yakın zamanda her hangi bir nedenden dolayı az yiyen bir grup hayvan, bir sonraki zaman diliminde olağandan daha çok yemek tüketir. Bu durum az ve çok yemek yeme döngülerinin oluşmasına neden olabilir. Asıl olan, uzun dönemli besin alım düzeylerinin nasıl değiştiğini hesaplamaktır. Dahası bu ölçüm uygulama olarak da bazı zorluklara sahiptir. Kafeste kalan yemeğin hayvanları önemli ölçüde tedirgin etmeden ve kafese düşmüş olabilecek parçaları da dikkate alarak tartılması son derece önemlidir.

Son olarak literatürde sıkça yapılan bir yanlışlık gıda alım değerini vücut ağırlığına normalize etmektir. Bu tür bir hesaplama stratejisi kulağa mantıklı gelse de obez hayvanların zayıf kontrollerinden daha az yediği sonucunu vermektedir. Çünkü obez bir canlının vücudunda metabolik olarak etkinliği örneğin bir kas dokusuyla

kıyaslanamayacak kadar düşük olan büyük miktarda yağ dokusu artışı vardır. Bu doku artışını, zayıf bir hayvanın gıda ihtiyacı ile aynı çerçevede değerlendirip hesaplara katmak hatalı sonuçlar alınmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada gıda alım değerleri aksi belirtilmedikçe “gr besin/gün/hayvan” şeklinde yani hayvan başına günlük gıda tüketimi olarak verilmiştir.

Şekil 4.10 gıda alımında dalgalanmaların en az olduğu ilk 21 haftanın verilerinden oluşturulmuştur. Verilerin sonunda gözlenen büyük dalgalanmalar yapılan ilk GTT deneyleri için kuyruktan kan toplanmasıyla aynı zaman denk gelmektedir. Şekil 4.10 incelendiğinde görülecektir ki gerçekten de gıda alım değerleri, yakın ölçümler arasında büyük varyasyonlar ve dalgalanmalar sergilemektedir.



Şekil 4. 10 Her hafta alınan gıda tüketim ölçümlerinin kafesteki hayvan sayısına bölünmesiyle elde edilmiş gıda alımı grafiği.

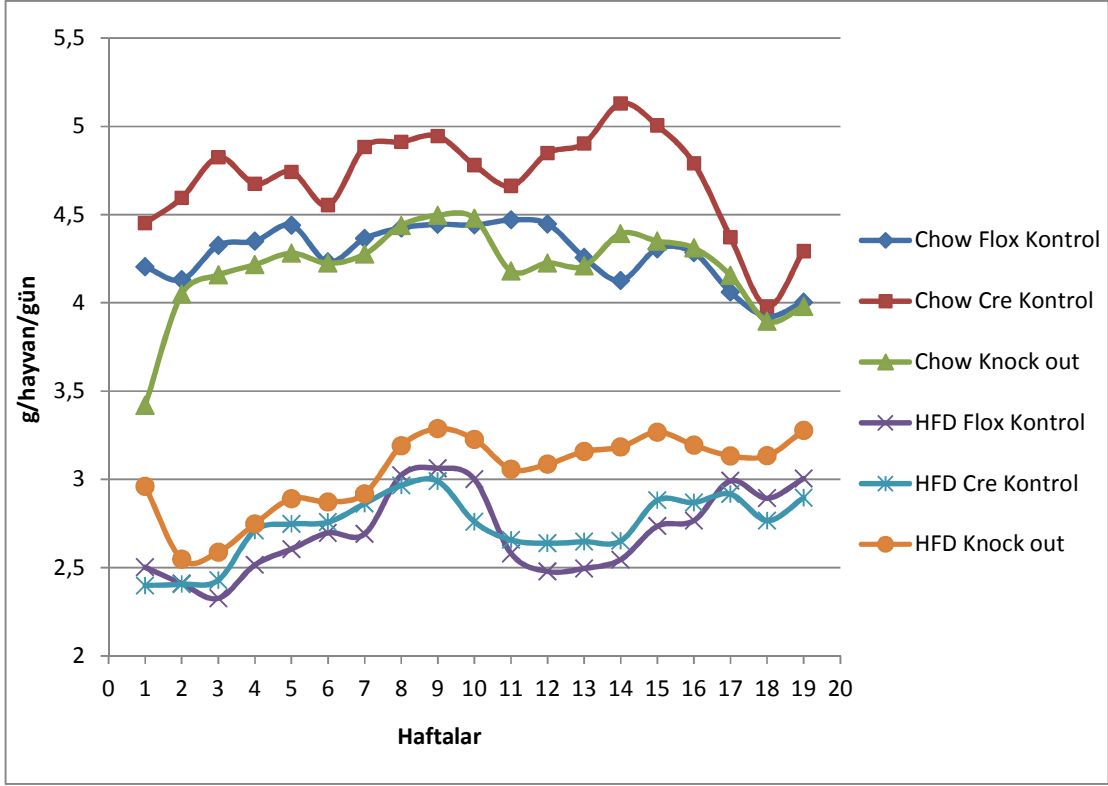
Şekil 4.10, tahıl içerikli ve daha düşük kalorili chow diyet ile beslenen grupların, daha yüksek kalorili HFD ile beslenen gruplardan, ağırlık cinsinden daha fazla gıda tükettiklerini ve chow diyet grubunda cre kontrol hayvanlarının, HFD grubunda ise knock out hayvanlarının grup içinde daha çok besin tüketen genotip olarak öne çıktıkları izlenimini vermektedir.

Bu veriyi anlamlı ve daha kolay okunur hale getirebilmek için literatürde “running average” denilen bir yaklaşım uygulanmıştır. Gıda alımları birbirlerinden bağımsız olaylar olmadıklarından ardışık gıda alım değerlerinin ortalamalarının alınması grafiklerde gözlenen büyük dalgalanmaları azaltarak genel eğilimi ortaya çıkartabilir. Bu amaçla uygulanan “running average” yaklaşımında her haftanın gıda alım değeri sonraki 2 haftanın değerleri ile birlikte ortalaması alınmış ve bu işlem teker teker her hafta için tekrarlanmıştır. “Ardışık 3’er haftalık ortalamalar” olarak adlandırdığımız bu yöntemle hem tüm ölçüm değerleri korunmuş, hem değerlerde gerçekten sapmaya yol açabilecek modifikasyonlar yapılmamış, hem de bireysel ölçümlerdeki rastgelelilikten kaynaklanan dalgalanmalar büyük ölçüde azaltılmıştır. Ardışık 3’er haftalık ortalama yaklaşımının işleyişi çizelge 4.1’de sonuçta elde edilen grafik ise şekil 4.11’de görülmektedir.

Gıda Alımı (g/hayvan/gün)	Hafta 1	Hafta 2	Hafta 3	Hafta 4	Hafta 5	Hafta 6
Chow Flox Kontrol	4,56	3,9725	4,07875	4,34125	4,5575	4,14875
Chow Cre Kontrol	4,40625	4,295	4,65125	4,8375	4,98625	4,20125
Chow Knock out	2,348	3,856	4,055	4,237	4,181	4,23
HFD Flox Kontrol	2,5705	2,66375	2,27275	2,2935	2,4115	2,843
HFD Cre Kontrol	2,696	2,396	2,105	2,718	2,466	2,948
HFD Knock out	3,592	2,734	2,557	2,354	2,853	3,038
3 Haftalık Ardışık Ortalama	1	2	3	4	5	6
Chow Flox Kontrol	hafta 1,2,3	hafta 2,3,4	hafta 3,4,5	hafta 4,5,6	hafta 5,6,7	hafta 6,7,8
Chow Cre Kontrol	hafta 1,2,3	hafta 2,3,4	hafta 3,4,5	hafta 4,5,6	hafta 5,6,7	hafta 6,7,8
Chow Knock out	hafta 1,2,3	hafta 2,3,4	hafta 3,4,5	hafta 4,5,6	hafta 5,6,7	hafta 6,7,8
HFD Flox Kontrol	hafta 1,2,3	hafta 2,3,4	hafta 3,4,5	hafta 4,5,6	hafta 5,6,7	hafta 6,7,8
HFD Cre Kontrol	hafta 1,2,3	hafta 2,3,4	hafta 3,4,5	hafta 4,5,6	hafta 5,6,7	hafta 6,7,8
HFD Knock out	hafta 1,2,3	hafta 2,3,4	hafta 3,4,5	hafta 4,5,6	hafta 5,6,7	hafta 6,7,8

Çizelge 4. 1 Ardışık ortalama yaklaşımını özetleyen çizelge

Şekil 4.11 incelendiğinde chow diyet grubunda knock out hayvanlar ve flox kontrollerinin birbirlerinden farksız oldukları görülmektedir. Ancak cre kontrolleri ilginç ve belirgin bir şekilde daha çok besin tüketmektedirler. Bu durum hem oluşturulan genetik modelin gerçekten de diyet bağımlı olarak çalıştığını ve dolayısıyla chow diyet koşullarında anlamlı bir farklılık yaratmadığını hem de cre kontrollerinin, cre rekombinaz ifadesine bağlı olarak metabolik bir yük altında olabileceklerini düşündürmektedir. Gerçekten de toplam gıda kütlesi cinsinden ele alındığında en çok gıda tüketen grup olan chow diyet cre kontrol hayvanları, aynı zamanda tüm gruplar arasında, deneyin sonu itibarıyla en düşük ortalama vücut ağırlığına sahip gruptur. Bu durum cre kontrol hayvanlarının da belirli bir fenotipe sahip olduğunu açıkça ortaya koyar. Bu grup, büyük ölçüde yabancı soy özellikleri göstermesi beklenen flox kontrollerden, belirgin biçimde farklılaşmaktadır.

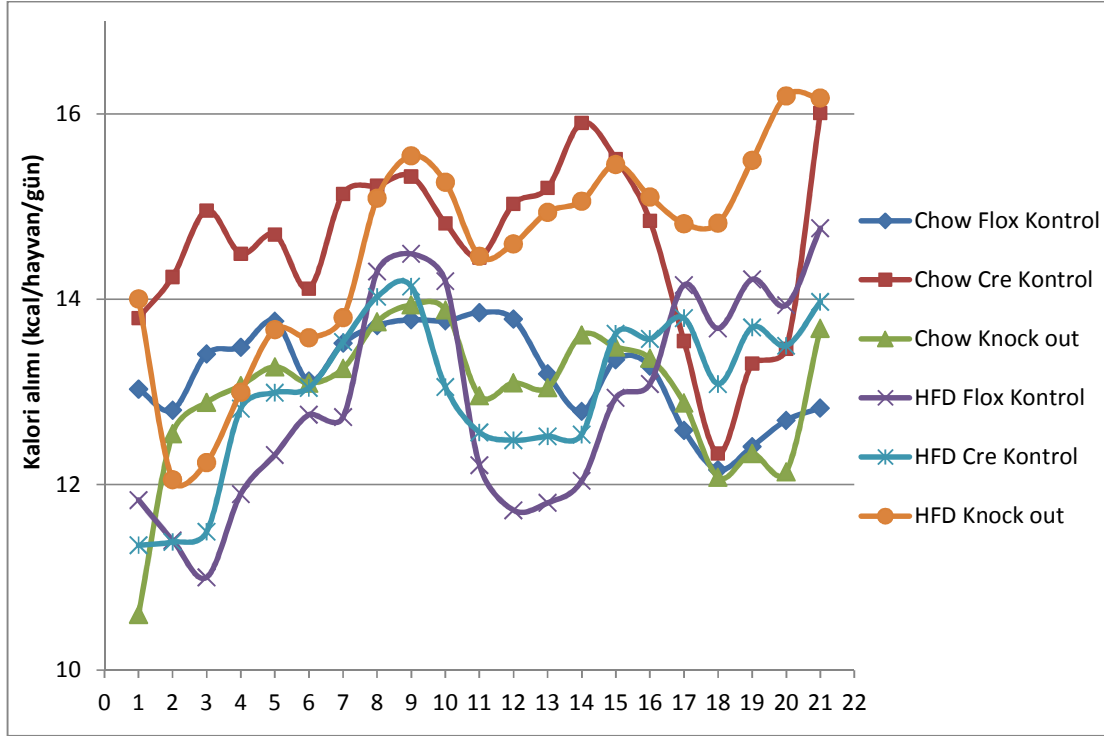


Şekil 4. 11 Ardişık 3'er haftalık ortalamalar cinsinden gıda alım değerleri

Yine Şekil 4.11 incelendiğinde HFD grubunun gıda alım değerlerinin tam olarak hipotezle uyumlu bir Şekilde ortaya çıktığı görülmektedir. Cre ve flox kontrol hayvanlarının gıda alım değerleri arasında belirgin bir farklılık göze arpmazken, knock out hayvanlar, POMC nöronlarında oluşturulan E.R. stresi ve leptin direnci nedeniyle yeme davranışını baskılama konusunda kontrol gruplarından daha baŐarısızdırlar. Bu hayvanların tüm gruplar içinde en yüksek vücut ağırlığına sahip olmalarıyla birlikte değerlendirildiğinde POMC nöronları ve projeksiyonları altındaki beyin bölgelerinde aktifleŐen MC4R reseptörlerinin yeme davranışı ve alınan gıdanın miktarındaki önemi bir kere daha ortaya çıkmaktadır. Őimdi bu çalıŐmayla söz konusu mekanizmaya, POMC nöronlardaki XBPI etkinliğinin önemi de eklenmektedir.

Ancak DEXA sonuçları da dikkate alındığında bu durumun sadece daha fazla yağ depolanması ile sonuçlanmadığı açıktır. Aksine POMC nöron spesifik XBPI knock out hayvanların vücut yağ yüzdeleri cre kontrollerinden istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük ve HFD grubunun en düşük kilolu grubu olan flox kontroller ile aynı düzeylerdedir. Bu durum yağı kullanan dokularda metabolik farklılıklar oluŐtuęu düşüncesini akıllara getirmektedir. İleride tartışılacağı gibi qPCR verileri ile bu grŐnmli ölçüde doęrulanmıŐtır.

Mevcut gıda alımı değerlerinden hayvan başına alınan ortalama kalori miktarını ortaya çıkartmak da mümkündür. Bu amaçla hayvan başına ortalama gıda alım değerleri, ilgili yemin gram başına kalori değeri ile çarpılarak kalori alım değerleri elde edilmiştir. Bu değerlerin ardışık 3'er haftalık ortalamalar cinsinden gösterimi ile şekil 4.12 elde edilmiştir.



Şekil 4. 12 Ardışık 3'er haftalık ortalamalar cinsinden kalori alım değerleri

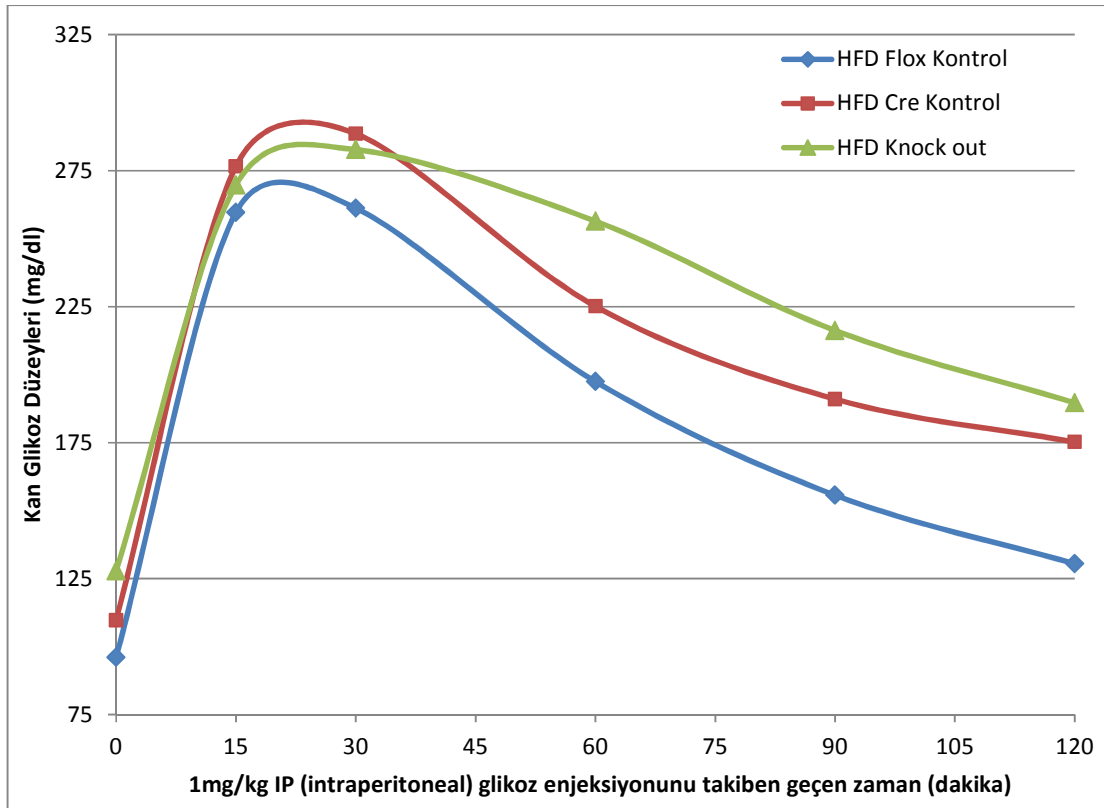
Şekil 4.12 şu ana kadar yapılan tartışmaları en iyi özetleyen veri setidir. HFD koşullarında knock out genotipin chow diyet koşullarında ise cre kontrol genotipinin belirgin birer fenotipinin olduğu açıkça görülmektedir. Diğer diyet ve genotip çiftlerinin kalori alım değerleri büyük ölçüde benzer düzeydedir.

Yine şekil 4.12 incelendiğinde görülecektir ki bu hayvanlarda gözlenen diyet ile tetiklenmiş obezitede, sadece alınan gıdanın toplam kalori içeriği değil, türü de önemlidir. Zira yabanıl soya en yakın genotip olan flox kontrol hayvanlarının, HFD ve chow diyet koşulları arasında gösterdikleri vücut ağırlığı farklılığı, kalori alım değerlerinde gözlenmemektedir. Bu nedenle flox kontrol hayvanlarının kilo almalarının nedeni daha çok kalori almaları değil, aldıkları besinin türü ve bu besin türünün değiştirdiği metabolik düzey olmalıdır.

4.5 Glikoz ve İnsülin Tolerans Testleri (GTT ve İTT)

Obezitenin diyabet ile bilinen ilişkisi nedeniyle tüm obezite ve metabolizma çalışmalarında ilgili canlıların glikoz toleransı ve insülin direncinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu ölçümler neticesinde alınan veriler hem obezitenin genel durumu hakkında bilgi vericidir hem de temel enerji molekülü olan glikozun kullanımındaki olası farklılıklara işaret ederek gözlenen fenotipin açıklanmasına katkıda bulunabilir.

Yapılan GTT ve İTT'ler neticesinde gruplar arasında gözlenen fenotipleri açıklayacak önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır. Sadece HFD gruplarının GTT'lerinde ve chow diyet gruplarının İTT'lerinde zayıf bazı farklılıklar vardır. Bu deneylere ilişkin grafikler şekil 4.13 ve şekil 4.14'te verilmiştir. GTT ve İTT'lerde gözlenen farklılıkların anlamlılık analizleri için her bir ölçüm noktasının karşılaştırılması, kan şeker düzeylerinde gözlenebilecek ve kısa dönemli olmayan farklılıkları temsil etmekte yetersiz kalabileceği için, deney sürecinde ortaya çıkan tüm değişikliği hesaba katacak şekilde, her bir hayvanın kan şekeri değişim grafiğinin "eğri altında kalan alanı" hesaplanmış ve istatistiksel değerlendirmeler bu sonuçlar üzerinde yapılmıştır. Şekil 4.13 ve 4.14'ün gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerinin sırasıyla gösteren çizelge

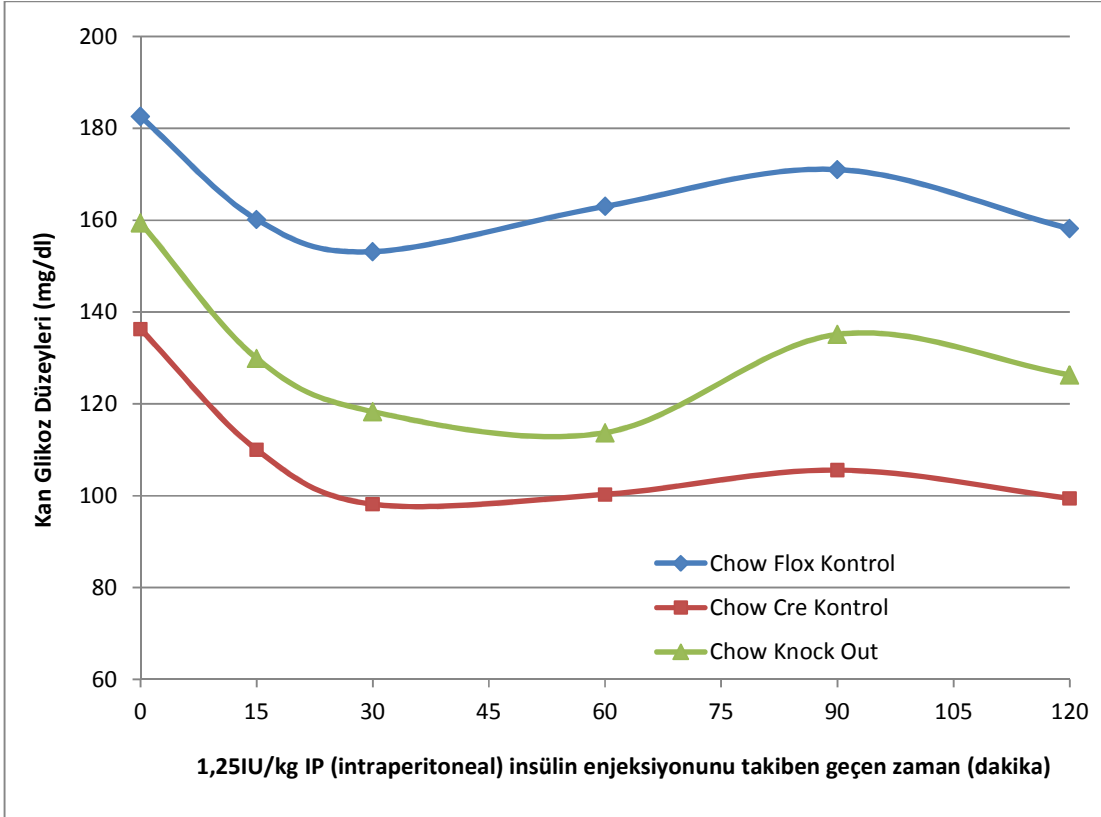


Şekil 4. 13 HFD grubuna ilişkin GTT sonuçları

Şekil 4.13'te eğrinin altında kalan alan için t-testi kıyaslamaları	
HFD Knock out ↔ HFD Flox Kontrol	0,037
HFD Knock out ↔ HFD Cre Kontrol	0,379
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox Kontrol	0,078*

Çizelge 4. 2 şekil 4.13'teki verilere ilişkin T testi p değerlerini gösterir çizelge. $p \leq 0,05$ şeklindeki değerler yeşil zemin ile işaretlenmiştir.

Sadece HFD grubunda gözlemlenen bu farklılık dahi son derece zayıftır ve eğrinin altında kalan alanların farklılığı istatistiksel olarak sadece knock out hayvanlar ve flox kontrolleri arasında anlamlı bir düzeye erişmektedir ($p=0,037$). Bu durum “*daha yüksek bir vücut ağırlığına sahip olan knock out hayvanlar, leptin direnci ile birlikte insülin direnci de geliştirmişlerdir*” şeklinde yorumlanabilir ancak bu grubun İTT'lerinde her hangi bir farklılık gözlenmediği gibi DEXA sonuçlarına göre de vücutlarının daha düşük bir yüzdesi yağdır. Bu gözlemler ilgili deney gruplarında gözlenen fenotipin karbonhidrat metabolizması ve bunun düzenleyicisi olan karaciğer gibi organlardaki farklılıklardan ziyade yağ metabolizmasıyla ilgili olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4. 14 Chow diyet grubuna ilişkin İTT sonuçları

Şekil 4.14'te eğrinin altında kalan alan için t-testi kıyaslamaları	
Chow Knock out ↔ Chow Flox Kontrol	0,010
Chow Knock out ↔ Chow Cre Kontrol	0,099
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,002

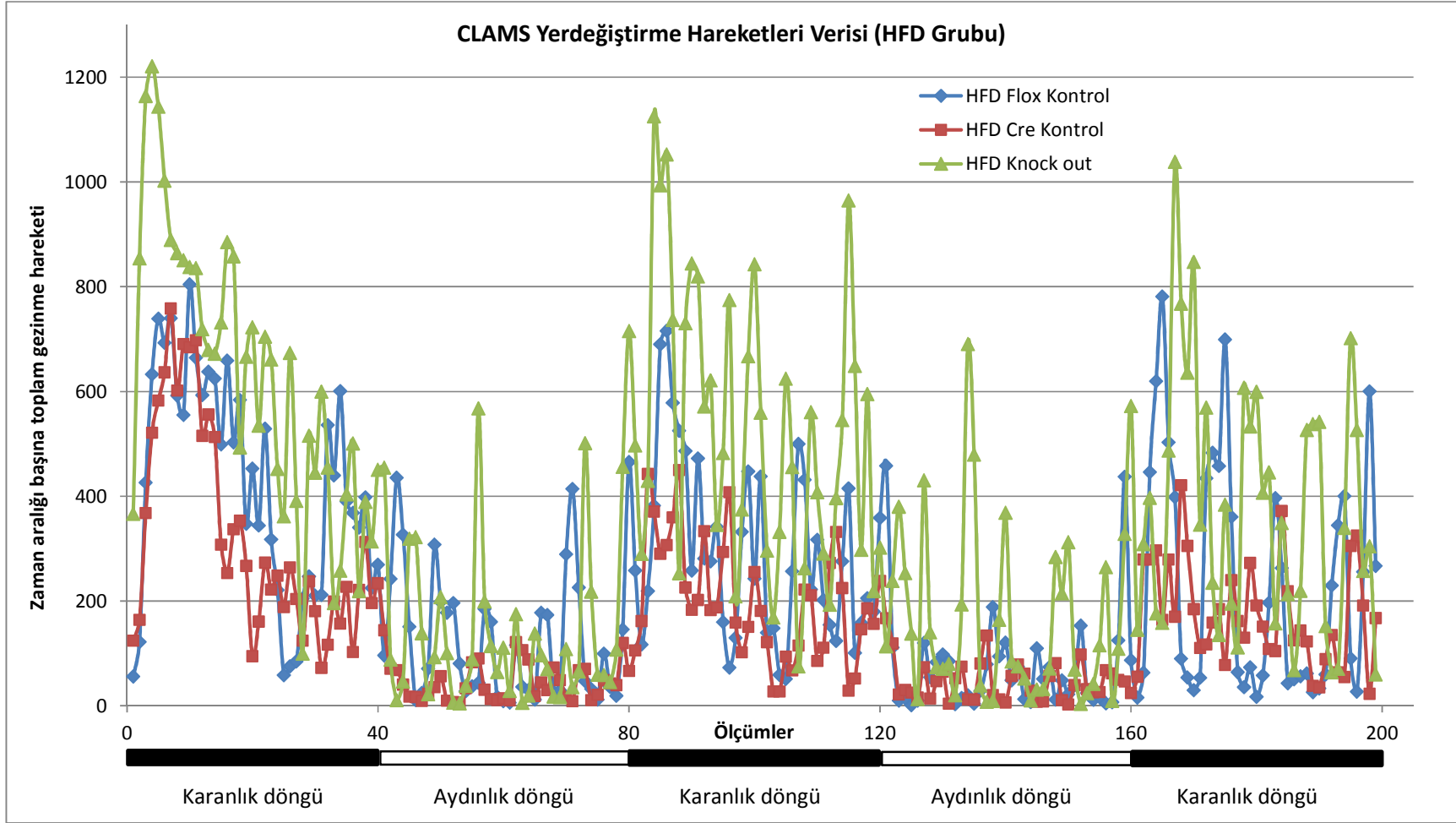
Çizelge 4. 3 şekil 4.14'teki verilere ilişkin T testi p değerlerini gösterir çizelge. $p \leq 0,05$ şeklindeki değerler yeşil zemin ile işaretlenmiştir.

Knock out fenotipin en belirgin olduğu HFD grubunun aksine, İTT'inde gruplar arası farklılık sadece chow diyet grubunda ortaya çıkmıştır. Ancak bu farklılığın anlamlılık ilişkileri incelendiğinde (çizelge 4.3) mevcut etkinin XBP1 silinmesiyle değil de cre rekombinaz varlığı ile alakalı olduğu görülebilir. Zira farklılaşan grup flox kontrollerdir ve cre kontroller ile knock out'lar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bir değere varmamaktadır. Böylece gözlenen fenotipin büyük ölçüde cre rekombinaz etkisinden kaynaklandığı kanaati oluşmaktadır.

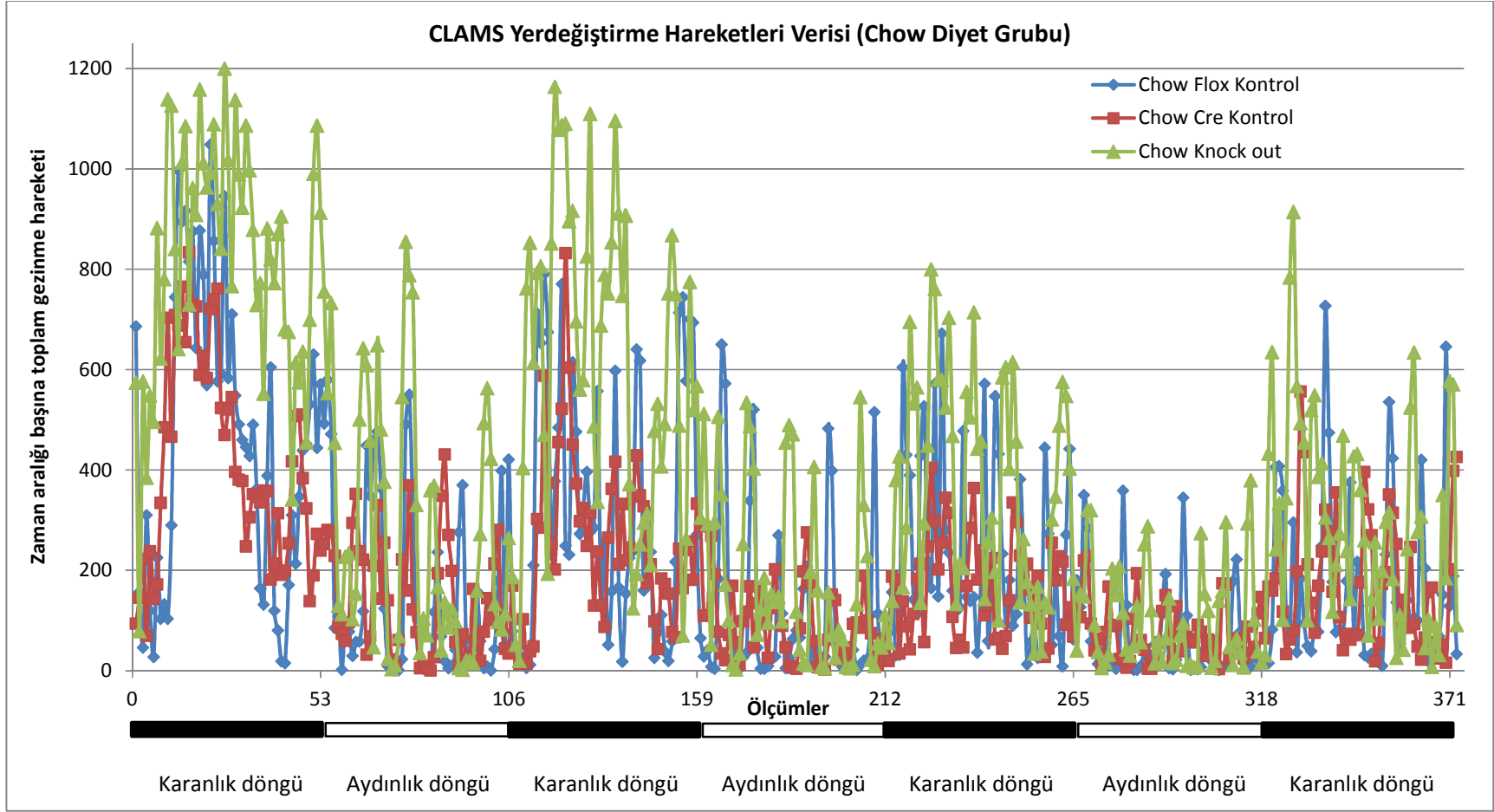
4.6 Metabolik Kafes Verileri (CLAMS)

HFD grubunda gözlenen obez, çok yiyen, leptin dirençli ve fakat düşük vücut yağ yüzdeli fenotipi açıklamak için en uygun yaklaşımlardan biri metabolik kafes sistemi kullanarak hayvanların hareketlilikleri ve metabolik düzeylerinin belirlenmesidir. Ayrıca metabolik kafes sisteminden elde edilecek veriler leptin dirençli bir fenotipin var olup olmadığının ve özelliklerinin anlaşılmasında da önemli bilgiler sağlar.

Metabolik kafes verileri 3 farklı analiz setinden oluşmaktadır. Bunlardan ilki yer değiştirme hareketlerinin ölçümüdür. Şekil 4.15 ve 4.16'da verilen grafiklerde sırasıyla HFD ve chow diyet grubu hayvanlarının kafes içerisindeki yer değiştirme hareketlerinin bir dökümü görülmektedir. CLAMS kafeslerinde hayvanların detektörlerin önünden her geçişi algılanarak kaydedilmektedir. Daha sonra bu hareketlerin detektörler üzerinde belirli bir sıra ile sinyal yaratanları yazılımsal olarak seçilerek x ve y eksenleri için ayrı ayrı yer değiştirme hareketleri verisine dönüştürülmektedir. Böylece bulunduğu yerde kımıldama, çeşitli nöbet ve titremeler veya kuyruk hareketleri gibi nedenlerden kaynaklanan ölçümler dikkate alınmamış olur. Bu sayede bulunduğu yerde kımıldayan bir hayvanla gerçek anlamda hareket eden bir hayvan birbirinden ayırt edilebilir ve enerji harcamasına ilişkin hesapların daha doğru olması sağlanır.



şekil 4. 15 HFD grubu hayvanların CLAMS sistemi gözlemlerinden elde edilen, x ve y eksenlerindeki toplam yerdeğiştirme hareketlerini gösterir grafik.



Şekil 4. 16 Chow diyet grubu hayvanların CLAMS sistemi gözlemlerinden elde edilen, x ve y eksenlerindeki toplam yerdeğiştirme hareketlerini gösterir grafik.

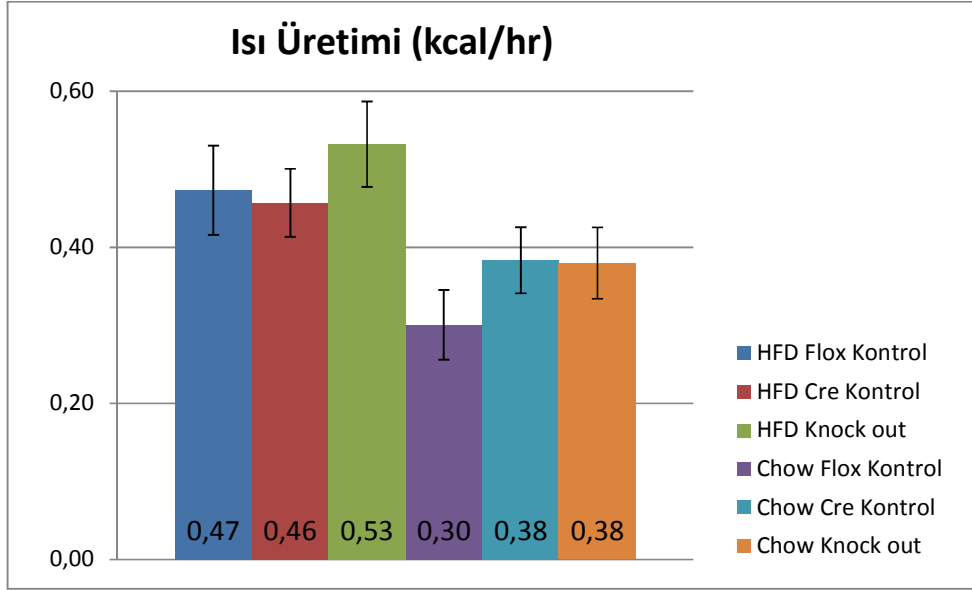
Yer değiştirme hareketleri verisi incelendiğinde görülecektir ki üç genotip, özellikle HFD ile beslendikleri koşulda birbirinden farklı birer fenotip vermektedir. HFD grubundaki knock out hayvanlar kan leptin düzeyleri dikkate alındığında en yüksek leptin direncine sahip grup olmalıdır. Ancak Şekil 4.15'e bakıldığında, leptin dirençli fenotipten kaynaklanan beklentinin tam aksine, en hareketli grup oldukları görülmektedir. Bu durumun olası bir açıklaması, leptin algılayan sistemlerden birisi olan POMC nöronlarında XBP1 silinmesiyle oluşan E.R. stresi ve takip eden işlev bozukluğunun leptin direncine yol açıp hayvanı daha çok yiyen ve daha kilolu bir hale getirmiş olması ve fakat önemli bir transkripsiyon faktörü olan XBP1'in yokluğunda değişen gen ifadesi profilinin ve XBP1 eksikliğini dengeleme mekanizmalarının, daha hareketli ve daha lipolitik bir fenotip üretmiş olması olabilir.

Şekil 4.16'da chow diyet alan hayvanlar için de benzeri bir durum, daha zayıf da olsa, gözlenmektedir. Ancak burada asıl Şaşırtıcı olan Şey bu grubun en çok yemek tüketen ve zayıf hayvanları olan Cre kontrol grubunun aynı zamanda belirgin bir Şekilde en düşük hareketliliğe sahip grup olduğunun görülüyor olmasıdır. Bu durumun olası nedenleri yukarıda değindiğimiz gibi cre rekombinazın metabolik bir yük veya yüksek ifade düzeyi gibi bir nedenle bizzat kendisinin E.R. stresi yaratarak bir fenotip ortaya koyması olabilir. Her durumda Cre-Lox rekombinasyonuna dayalı sistemler kullanılırken alışılageldiği gibi sadece flox kontrol kullanılmasının doğru bir yaklaşım olmadığı açıktır. Cre'nin kendi fenotipi vardır ve mutlaka hesaba katılması gerekmektedir.

Metabolik kafes verilerinden ikincisi hayvanların ürettiği ısıdır. Şekil 4.17, izelge 4.4'teki p değerleri dikkate alınarak incelendiğinde üç sonuç ortaya çıkar. Hem POMC nöronlarından XBP1 silinmesinin, hem de cre'nin kendilerine özgü birer fenotipi vardır. Bu fenotipler diyet bağımlıdır ve farklı diyetle beslenen gruplarda farklı fenotipler gözlenmiştir. Ayrıca tek başına diyet değişikliğinin de önemli etkileri vardır. Bu durum, aynı genotipe sahip olup da iki farklı diyet ile beslenen hayvanlar arasında görülen istatistiksel olarak üst düzeyde anlamlı farklılık verisi incelenerek görülebilir.

Daha yüksek kilolu hayvanların daha büyük vücut kütlesi nedeniyle toplamda daha fazla metabolik ısı üretmeleri anlaşılabilir bir durumdur. Ancak tek başına HFD grubu ele alındığında görülecektir ki knock out hayvanlar cre ve flox kontrollerinden belirgin ölçüde daha fazla ısı üretmektedirler. Bu fark cre kontrollerle kıyaslanarak değerlendirildiğinde

istatistiksel olarak da anlamlıdır. Ayrıca flox kontrollerle olan farklılığın anlamlılığına ilişkin p değeri de $p \leq 0,05$ düzeyine oldukça yakındır.



Şekil 4. 17 CLAMS ısı üretimi verisi. Hayvanların ürettiği ısı tüketilen O₂ ve üretilen CO₂ miktarlarından cihazın yazılımınca otomatik olarak üretilmektedir.

Isı Üretimi için T Testi Kıyaslamaları	p Değeri
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,035
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,081*
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,433
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,918
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,048
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,052*
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,003
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,003
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,002

Çizelge 4. 4 Şekil 4.17 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler $0,01 < p \leq 0,05$ ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise $p \leq 0,01$ anlamındadır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırına ulaşamamış eğilimlere ilişkin değerler, yanlarına “*” işareti konularak işaretlenmiştir.

Chow diyet grubunda ise yukarıda aktarılan diğer deney ve gözlemlere paralel şekilde cre rekombinazın fenotipi belirgindir. Zira istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar flox kontrol ile cre kontrol grupları ve yine flox kontrol ile knock out grupları arasında, üstelik de aynı düzeylerde gözlenmişlerdir. Bu iki farklı kıyaslamaya ilişkin ve aynı düzeylerde gözlemlenen anlamlı farklılığın tek ortak noktası cre rekombinaz ifadesidir. Daha önce de vurgulandığı gibi cre'nin bir fenotipinin olduğu ve dikkate alınması gerektiği yine ortaya çıkmış, ayrıca POMC nöronlarında XBP1 silinmesinin yarattığı fenotipin diyet bağımlı

olarak ortaya çıktığı da bir kere daha gösterilmiştir. Farklı analizlerin benzer ilişkiler ortaya koyması ile yapılan yorumların gücü ve geçerliliği artmaktadır.

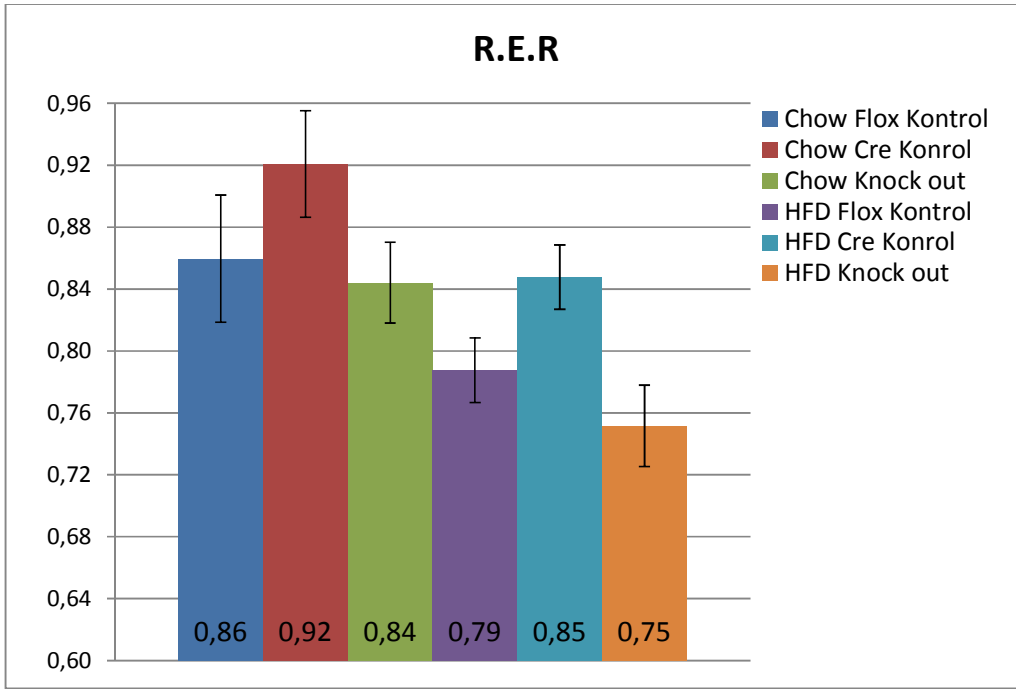
Üçüncü metabolik kafes verisi RER'dır. RER solunum katsayısı anlamdaki “**R**espiratory **E**xchange **R**atio” ifadesinin kısaltmasıdır. Bu değer bir orandır ve birimsizdir. Formülü; $RER = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}}$ şeklindedir. Tüm bu basitliğine rağmen metabolizma çalışmalarında çok önemli ve bilgi vericidir. Çünkü bu oran canlının enerji üretim süreçlerinde karbonhidrat mı yoksa yağ mı kullandığı hakkında bilgi verir. Çizelge 4.5'te farklı başlangıç moleküllerinin tüketilmesi ile enerji üretildiğinde oluşacak RER değerleri listelenmiştir. Saf yağ asitleri kullanılarak bile elde edilebilecek en düşük RER 0,7'dir. Saf karbonhidrat yakarak ise maksimum 1 değeri elde edilebilir. Ancak yüksek düzeyde oksitlenmiş ve enerji kaynağı olarak değil de metabolik reaksiyonlarda ara molekül olarak kullanılan çeşitli organik asitlerin oksidasyonu 1'den büyük bir değer verir. Şu halde doğal koşullarda bir canlıdan ölçülecek RER değeri için en mantıklı beklenti 1 ile 0,7 arasındadır. Şekil 4.18'de verilen RER değerleri incelendiğinde görülecektir ki deneyden elde edilen değerler bu beklenti ile örtüşmektedir.

Kullanılan Molekül	RER
Karbonhidratlar	1
Proteinler	0,8 - 0,9
Ketonlar	0,73 - 0,66
Triolein	0,7
Oleik Asit (zeytinyağı bileşeni)	0,71
Tripalmitin	0,7
Malik Asit	1,33
Tartarik Asit	1,6
Oksalik Asit	4

Çizelge 4. 5 Enerji üretiminde kullanılan farklı moleküllerin oksidasyonları sonucunda oluşan RER değerlerini gösterir çizelge

RER verilerinin en ilginç yanı POMC promotörü ile ifade edilen Cre rekombinaz ve POMC özgül XBP1 knock out genotiplerin birbirinin zıttı iki farklı fenotip ürettiğini göstermesidir. Her ne kadar chow diyet grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmamışsa da HFD grubundaki ile neredeyse aynı profili göstermesi bakımından bu veri de söz konusu görüşü güçlendirmektedir. Özetle Cre kontrol hayvanları büyük ölçüde karbonhidrat tüketmekte ve yağı, varsa depolayarak kilo almakta iken (HFD Cre kontrol grubunda olduğu gibi), olmadığı durumda aldığı karbonhidratı harcayarak daha zayıf kalmaktadır (tahıl içeriği yüksek chow diyet ile beslenen Cre kontrol grubunda olduğu

gibi). Ancak knock out hayvanlar geliştirdikleri POMC özgül ER stresi ve ilişkili leptin direnci nedeniyle kilo almakta ancak muhtemelen XBP1 delesyonunu dengeleyici ve veya bu delesyon nedeniyle değişen gen ifade profili değişiklikleri nedeniyle lipolitik olmakta ve temel besin maddesi olarak yağı kullanmaktadırlar. Yabani tür en yakın soy olan flox kontrol hayvanları ise bu tür bir etkinin yokluğunda bu iki genotipin arasında bir RER değeri almaktadırlar. Bu durum daha önceki verilerden geliştirilen leptin dirençli fakat lipolitik bir fenotip değerlendirmesini güçlendiren yeni bir veri oluşturmaktadır.

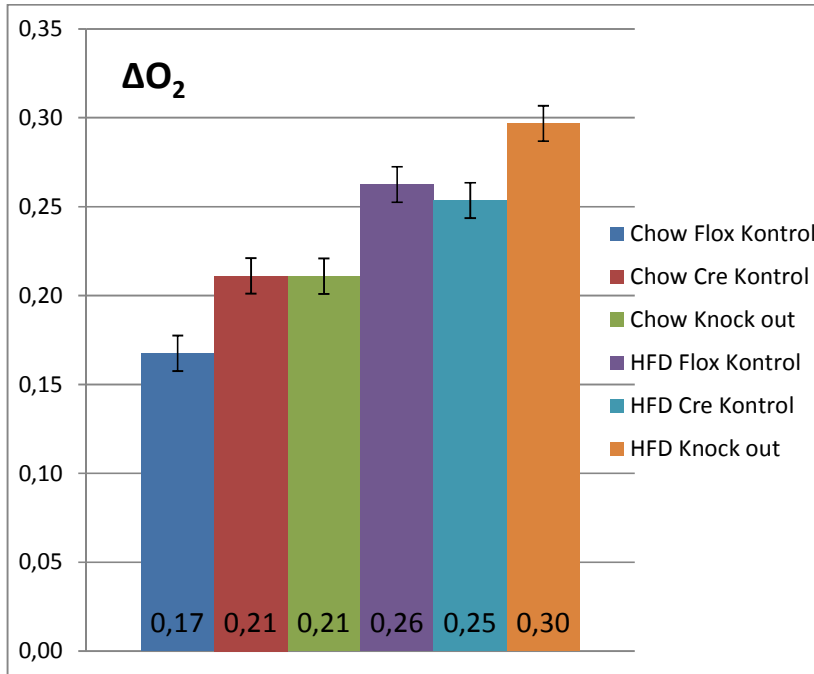


şekil 4. 18 Grupların ortalama RER değerleri

R.E.R. için T Testi Kıyaslamaları	p Değeri
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,011
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,194
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,004
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,106
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,792
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,164
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,001
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,006
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	1,18x10 ⁻⁶

Çizelge 4. 6 RER için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler $0,01 < p \leq 0,05$ ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise $p \leq 0,01$ anlamındadır.

CLAMS sisteminde elde edilen veriler pek çok metabolik parametrenin ayrı ayrı ölçülüp daha sonra bu ölçüm sonuçlarının belirli formülasyonlar ile değerlendirilmesiyle elde edilmektedir. Bu nedenle her ölçüme ilişkin ham veriye de ulaşmak mümkündür. Metabolik ısı üretim hesabında $Isı(kcal/L O_2) = (3,815 + 1,232 \times RER) \times VO_2(L)$ formülü uyarınca RER verisi ile birlikte kullanılması nedeniyle incelenmesi bilgi verici olan O_2 tüketim değerleri şekil 4.19’da ve gruplar arası farkın anlamlılığına ilişkin t testi p değerleri de çizelge 4.7’de verilmiştir. Bu ham verideki sayısal değer kafese giren havadaki $\%O_2$ miktarından kafesten çıkan havadaki $\%O_2$ miktarının çıkartılması neticesinde kalan sayıyı temsil etmektedir. Grafik oluşturulurken, her hayvan için her ölçümde hesaplanan bu ΔO_2 değerinin gruplar için ortalamaları alınarak bu değer kullanılmıştır.



Şekil 4. 19 Grupların ortalama ΔO_2 değerlerini gösterir çizelge.

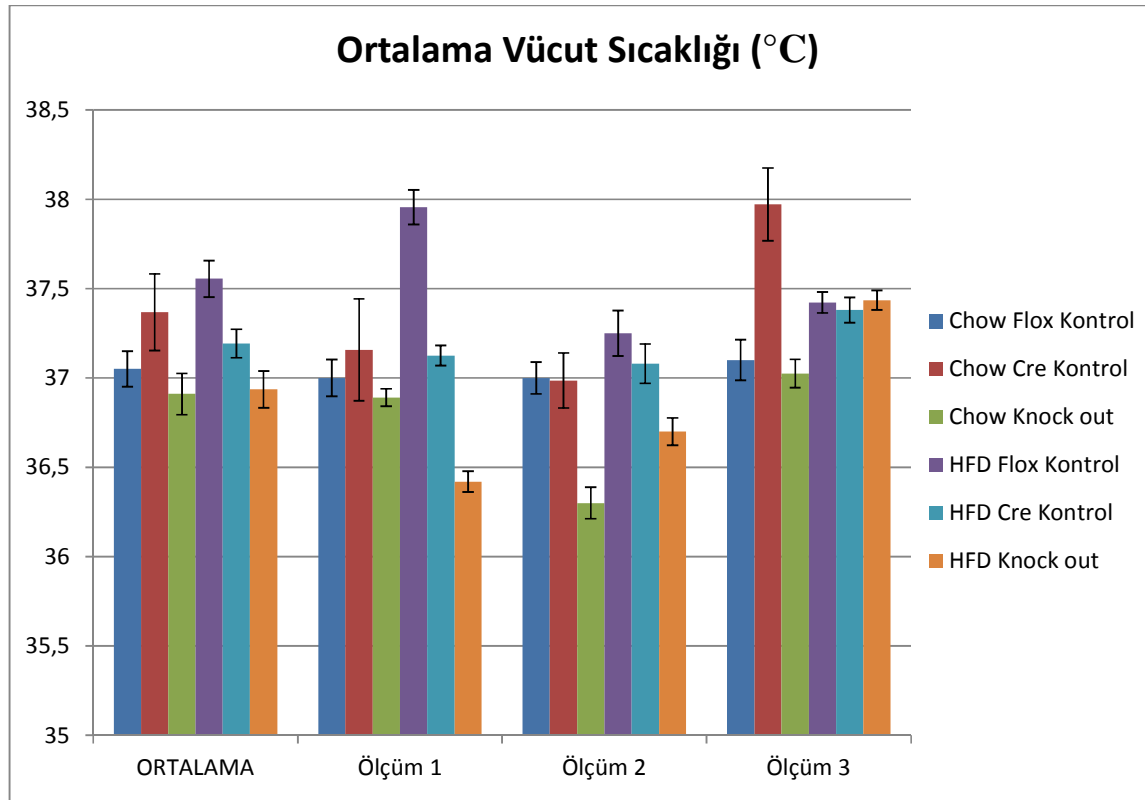
Delta O2 için T Test Kıyaslamaları	p Değeri
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,029
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,069*
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,447
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,988
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,038
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,039
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,003
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,001
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,002

Çizelge 4. 7 Şekil 4.19 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler $0,01 < p \leq 0,05$ ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise $p \leq 0,01$ anlamındadır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırına ulaşamamış eğilimlere ilişkin değerler, yanlarına “*” işareti konularak işaretlenmiştir.

4.7 Vücut Sıcaklığı Verileri

Metabolik kafes (CLAMS) deneylerinden elde edilen verilerden POMC nöron spesifik XBP1 knock out hayvanların HFD ile beslenirken anlamlı ölçüde daha yüksek bir metabolik ısı ürettikleri görülmüştür. Her ne kadar deneyde kullanılan model organizma bir memeli hayvan olarak vücut sıcaklığını aktif biçimde koruyabiliyor olsa da, gözlenen gruplar arası farklı ısı üretim değerleri ve farklı besin maddelerini enerji kaynağı olarak kullanma durumunun, vücut sıcaklığı üzerinde etkisi olabilir. Bu durum gözlenen fenotipi daha iyi tanımlayacak ve gen silinmesine bağlı ER stres üzerinden gelişebileceği hipotetize edilen leptin direnci koşullarını daha iyi tanımlayabilecek bir veri sunabileceğinden tüm hayvanların vücut sıcaklıkları 3 defa ölçülmüştür. Her grubun her ölçümünün ve grupların tüm ölçümlerinin ortalamalarını yansıtan grafik şekil 4.20’de verilmiştir.

Veriler dikkatlice incelendiğinde görülecektir ki farklı grupların vücut sıcaklıklarında anlamlılığı tutarlı bir şekilde birden çok defa elde edilebilmiş bir farklılık yoktur. Bu nedenle bazı ölçümlerde gözlemlenen istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların da bir anlamı yoktur.



Şekil 4. 20 Her grubun ortalama vücut sıcaklıklarını, birer hafta arayla yapılan birbirinden farklı ölçümler için grup ortalamaları ve tüm bu ölçümlerin grup ortalamaları cinsinden gösterir grafik.

T Testi p Değerleri	Ortalama	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ölçüm 3
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,051*	0,132	0,348	0,136
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,001	0,002	0,439	0,182
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,394	0,945	0,789	0,117
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,000	0,000	0,060*	0,934
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,052*	0,000	0,148	0,747
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,006	0,001	0,597	0,813
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,380	0,577	0,012	0,771
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,047	0,568	0,044	0,020
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,179	0,775	0,967	0,072*

Çizelge 4. 8 Şekil 4.20 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler $0,01 < p \leq 0,05$ ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise $p \leq 0,01$ anlamındadır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırına ulaşamamış eğilimlere ilişkin değerler, yanlarına “*” işareti konularak işaretlenmiştir.

Gerçekten de vücut sıcaklıkları arasında anlamlı ve tutarlı bir farklılık olmayabilir. Fakat var olan farklılıkların çok düşük olması ve ölçümlerdeki rastgelelilikten kaynaklanan sapmaların genliğinin bu farklardan büyük olması gibi bir durumda, az sayıda yapılan örnekleme ile, her grubun etrafında dalgalandığı ve bir diğer gruptan farklı olan sıcaklık derecesini tespit etmek mümkün değildir. Çok sayıda örnekleme yani çok sayıda sıcaklık ölçümü ile bu sorun aşılabilir (tıpkı gıda alımı değerlerinde olduğu gibi) ancak hayvanları rahatsız eden her türlü uygulamanın gıda alımı üzerinde net bir etkisi olduğundan deney grubu hayvanları için burada gösterilenden daha fazla sayıda vücut sıcaklığı ölçümü yapılamamıştır.

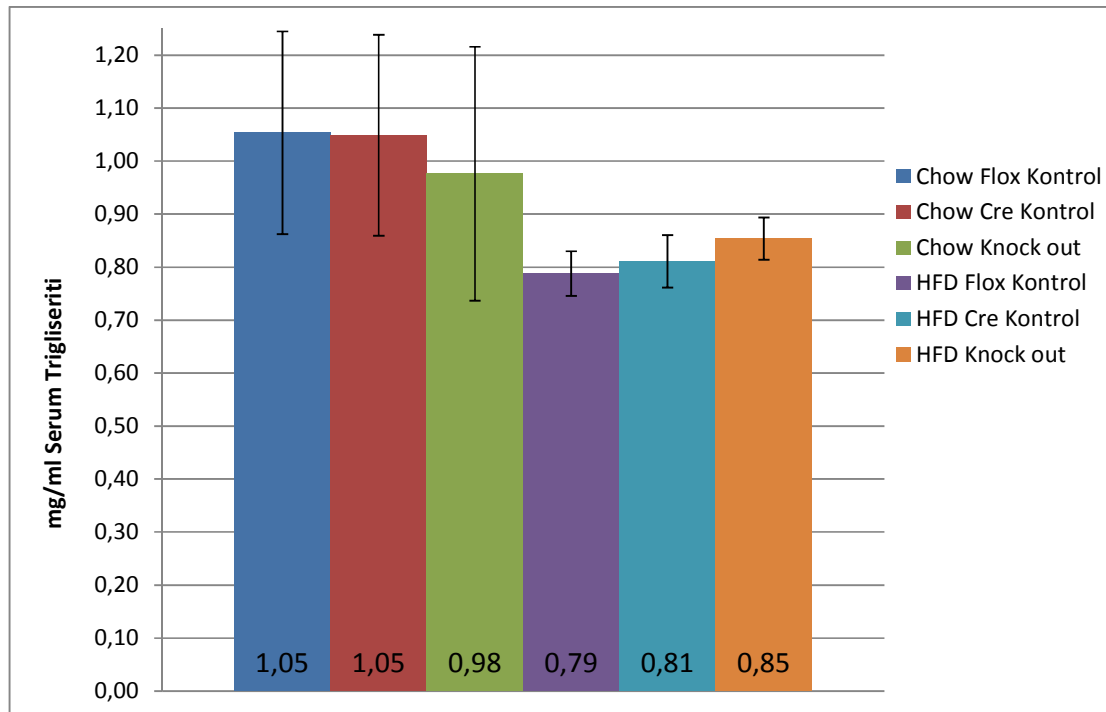
4.8 Trigliserit ve Serbest Gliserol Ölçümleri

Yukarıda aktarıldığı gibi sadece bir leptin direnci durumu değil aynı zamanda yağ metabolizmasını ilgilendiren bir alt yapıdan şüphe edilmesi nedeniyle ilgili fenotipi, kan trigliserit ve lipoliz ürünü olan serbest gliserol miktarları açısından da inceledik. Bu incelemelerden ilgili fenotipin karakterizasyonu açısından son derece ilginç bazı sonuçlar elde edilmiştir. Her şeyden önce chow diyet ile beslenen zayıf hayvanlarda serum trigliserit düzeyleri yalnızca ortalama değerler dikkate alındığında daha yüksektir. Ancak bu değer istatistiksel olarak anlamlı bir düzeye erişmemiştir. Tüm bunlar şekil 4.21’de verilen serum trigliserit düzeyleri ve çizelge 4.9’da verilen bu düzeylere ilişkin farkların anlamlılıklarına ilişkin t testi p değerleri incelenerek görülebilir. Enzimatik yolla trigliserit ölçümü yapan kitler kullanıldığı için bu trigliseritlerin nasıl paklendiğini bilme ihtimali yoktur. Ancak zayıf hayvanlarda gözlenen daha yüksek trigliserit miktarları yüksek HDL düzeylerinden

kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca bu grupların standart hataları da HFD gruplarına kıyasla çok daha yüksektir. Bu durum bireysel farklılıkların çok daha fazla olduğu anlamına gelir. Tüm bunların haricinde genotipe ya da diyetle ilgili ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Belki de bu ölçümlerde elde edilen en ilginç sonuç, her hangi bir ciddi farklılığın gözlemlenememiş olmasıdır.

Ancak serum serbest gliserol değerleri için farklı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardır. Ayrıca chow diyet grubunda trigliserit ölçümlerinin aksine HFD grubuna yakın düzeyde bir standart hata değeri elde edilmiştir. Ölçümler için kullanılan kit iki basamaklı bir enzim reaksiyonuyla önce serbest gliserol miktarını daha sonra da trigliserit miktarını ölçmektedir. Bu nedenle serum trigliserit miktarlarında gözlenen büyük standart hatanın muhtelif uygulama hatalarından değil gerçek ölçüm değerlerinin yüksek standart sapmasından kaynaklandığı açıktır.

Şekil 4.22 ve şekil 4.22'deki verilere ilişkin t testlerinin p değerlerinin bulunduğu çizelge 4.10 incelendiğinde görülecektir ki, daha önce sunulan verilere benzer bir durum aynen serum serbest gliserol değerleri için de söz konusudur. Öncelikle diyetle ilgili büyük bir farklılık söz konusudur. Knock out fenotip diyetle ilgili olarak sadece HFD grubunda gözlemlenirken, chow diyet grubunda cre rekombinazın belirgin bir fenotipi vardır.

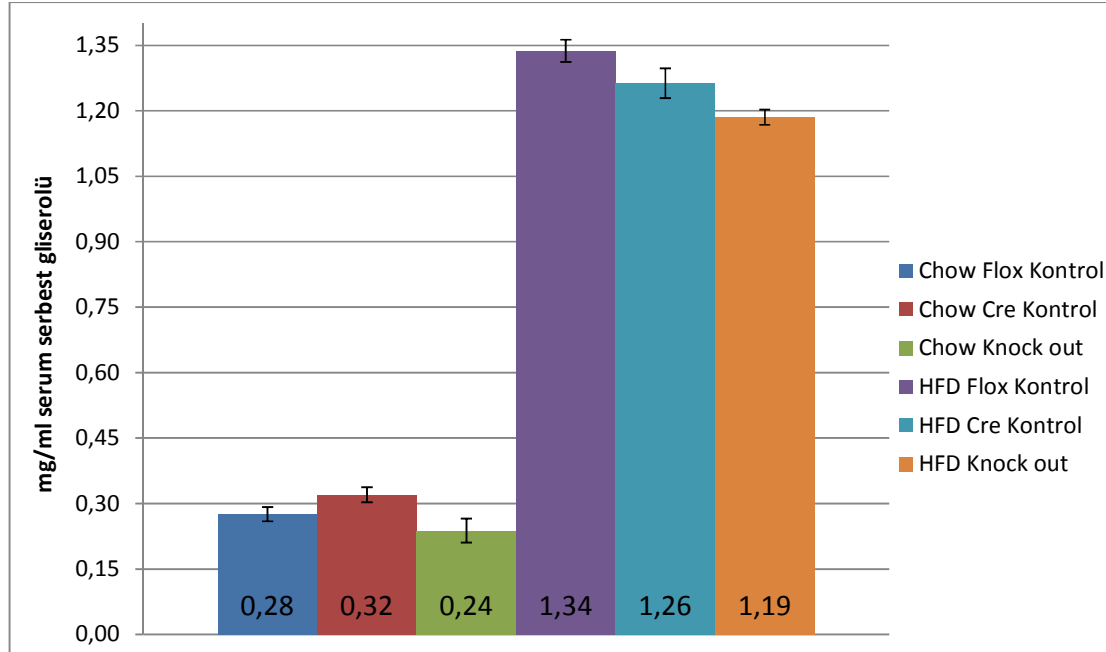


Şekil 4. 21 Her grubun mg/ml cinsinden ortalama serum trigliserit düzeylerini gösterir grafik

Serum Trigliseritleri için T Testi Kıyaslamaları	p Değeri
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,509
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,272
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,729
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,815
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,804
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,987
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,264
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,219
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,625

Çizelge 4. 9 Şekil 4.21 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi.

Her ne kadar gliserol bir lipoliz ürünü olsa da düşük gliserol düzeyleri her zaman için düşük lipoliz düzeyi anlamına gelmez. Gliserolün yüksek kullanım düzeyi de daha düşük bir serbest gliserol düzeyi oluşmasına neden olabilir. Gliserolün temel olarak karaciğer ve böbreklerde kullanıldığı ve glikoneogenez ve/veya glikolize, gliseraldehit-3-fosfat basamağından katıldığı dikkate alınır, glikoneogenez ve/veya glikolizin düzey ve hızına bağlı olarak artan veya azalan kullanımından bahsedilebilir. Fakat bunun için öncelikle glikoneogenez ve glikoliz düzeyleri incelenmelidir. Her durumda serbest gliserol ve trigliserit verilerinden çıkan sonuç, diğer verilerdekine paralel bir fenotipe ve yağın taşınımındaki miktarından ziyade metabolizmasındaki bir değişikliğe işaret etmektedir.



Şekil 4. 22 Her grubun mg/ml cinsinden ortalama serum serbest gliserol düzeylerini gösterir grafik

Serum Trigliseritleri için T Testi Kıyaslamaları	p Değeri
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,064*
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,000
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,101
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,024
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,256
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,086*
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,000
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,000
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,000

Çizelge 4. 10 Şekil 4.22 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler $0,01 < p \leq 0,05$ ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise $p \leq 0,01$ anlamındadır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırına ulaşamamış eğilimlere ilişkin değerler, yanlarına “*” işareti konularak işaretlenmiştir.

4.9 Total Kolesterol Ölçümleri

Kolesterol ölçümlerinde de serbest gliserol düzeylerinde gözlenenle tamamen aynı fenotip ortaya çıkmıştır. Ancak bu sefer var olan ilişkide serbest gliserolün yüksek olduğu grupta, bunun aksine düşük bir kolesterol düzeyi gözlenmektedir. Yani tüm ilişki örüntüsü aynen, fakat düzeyler itibarıyla ters dönmüş bir halde elde edilmiştir. Bu veriler Şekil 4.23’te ve bu şekildeki verilerin t testlerine ilişkin p değerlerinin olduğu çizelge 4.12’de incelenebilir.

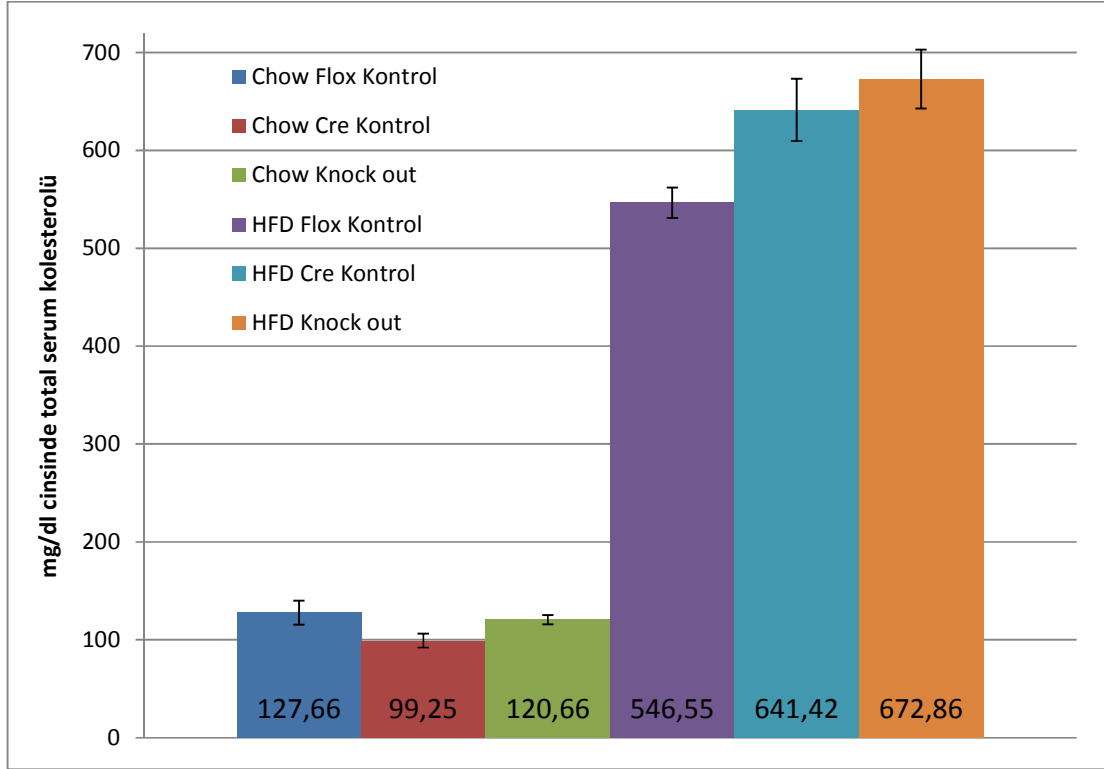
Kolesterolün temel olarak hücre zarında kullanıldığı ve kan düzeylerinin kanın içerdiği çeşitli lipoproteinlerin düzeyi ile ilişkili olduğu düşünülürse (bakınız çizelge 4.11) gruplar arasında gözlenen anlamlı farklılıkların taşınan yağın türü ile ilgili olabileceği sonucu çıkarılabilir.

Yoğunluk (g/mL)	Sınıf	% Protein	% Kolesterol	% Fosfolipit	% Trigliserit ve Kolesterol esteri
>1,063	HDL	33	30	29	4
1,019–1,063	LDL	25	50	21	8
1,006–1,019	IDL	18	29	22	31
0,95–1,006	VLDL	10	22	18	50
<0,95	Şilomikron	<2	8	7	84

Çizelge 4. 11 Kan lipoproteinleri. Lipitler kanda başta lipoproteinler olmak üzere çeşitli protein molekülleriyle ilişkili halde taşınırlar. Bu paketlere lipoprotein partikülleri adı verilir. Lipoproteinler içerdikleri yağ ve proteinin türü ve miktarına bağlı olarak farklı fiziksel özellikler gösterirler. Garrett and Grisham 1995’ten.

Yine şekil 4.23, şekil 4.2 ile birlikte incelendiğinde görülecektir ki, tüm grupların total kan kolesterol düzeyleri vücut ağırlıkları ilişkisiyle aynı ilişki biçimini (görel oranları farklı

olsa da) yansıtmaktadır. Bu durum kolesterol metabolizmasında değişiklik yaratan özel bir genetik etkiden çok, vücut ağırlığı ve alınan gıdanın çeşidine bağlı bir etkiyi akla getirmektedir.



Şekil 4. 23 Tüm grupların mg/ml cinsinden ortalama total kolesterol düzeylerini ve bu düzeylere ilişkin standart hataları gösterir grafik.

Kolesterol ölçümleri için T Testleri	p Değeri
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	1,2x10 ⁻⁸
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	5,46x10 ⁻¹²
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	1,44x10 ⁻⁸
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,002
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,482
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,019
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,608
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,029
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,073*

Çizelge 4. 12 Şekil 4.23 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler 0,01 < p ≤ 0,05 ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise p ≤ 0,01 anlamındadır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırına ulaşamamış eğilimlere ilişkin değerler, yanlarına “*” işareti konularak işaretlenmiştir.

4.10 qPCR Temelli Gen İfade Analizleri

Her ne kadar fenotipin karakterizasyonunu sağlasa da şu ana kadar ki çalışmalar leptin direncinin düzeyi, genetik kontrolü ve farklı dokularda yarattığı etkiler konusunda detaylı bir inceleme içermemektedir. Bu tür verilere de ulaşılabilmesi amacıyla seçilen belirli dokularda yine seçilen belirli genlerin ifade düzeylerindeki değişimler qPCR tekniği ile incelenmiştir. Sonuçlar dokulara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir.

Öncelikle POMC nöronların bulunduğu beyin bölgesi olan hipotalamus, seçilen bir dizi genin ifade düzeyi açısından incelenmiştir. Hipotalamus dokusu için seçilen ve qPCR ile ifade analizi yapılan genlere ilişkin veriler şekil 4.24'te verilmiştir. Çizelge 4.13'te de bu genlerin farklı genotip ve diyet grupları arasındaki ifade farklılıklarının anlamlılıklarına ilişkin t testi p değerleri verilmiştir.

Öncelikle POMC ifade düzeyi, yapılan knock out model organizmada bu genin promotörü kullanıldığı için ilk olarak incelenmiştir. Yine CART ve AgRP genleri gıda alımını düzenleyen diğer nöro-peptitlerden olmaları ve hipotalamus arcuate çekirdeğin yeme davranışı ile ilgili temel mekanizmasının yapı taşları oldukları için incelenmişlerdir.

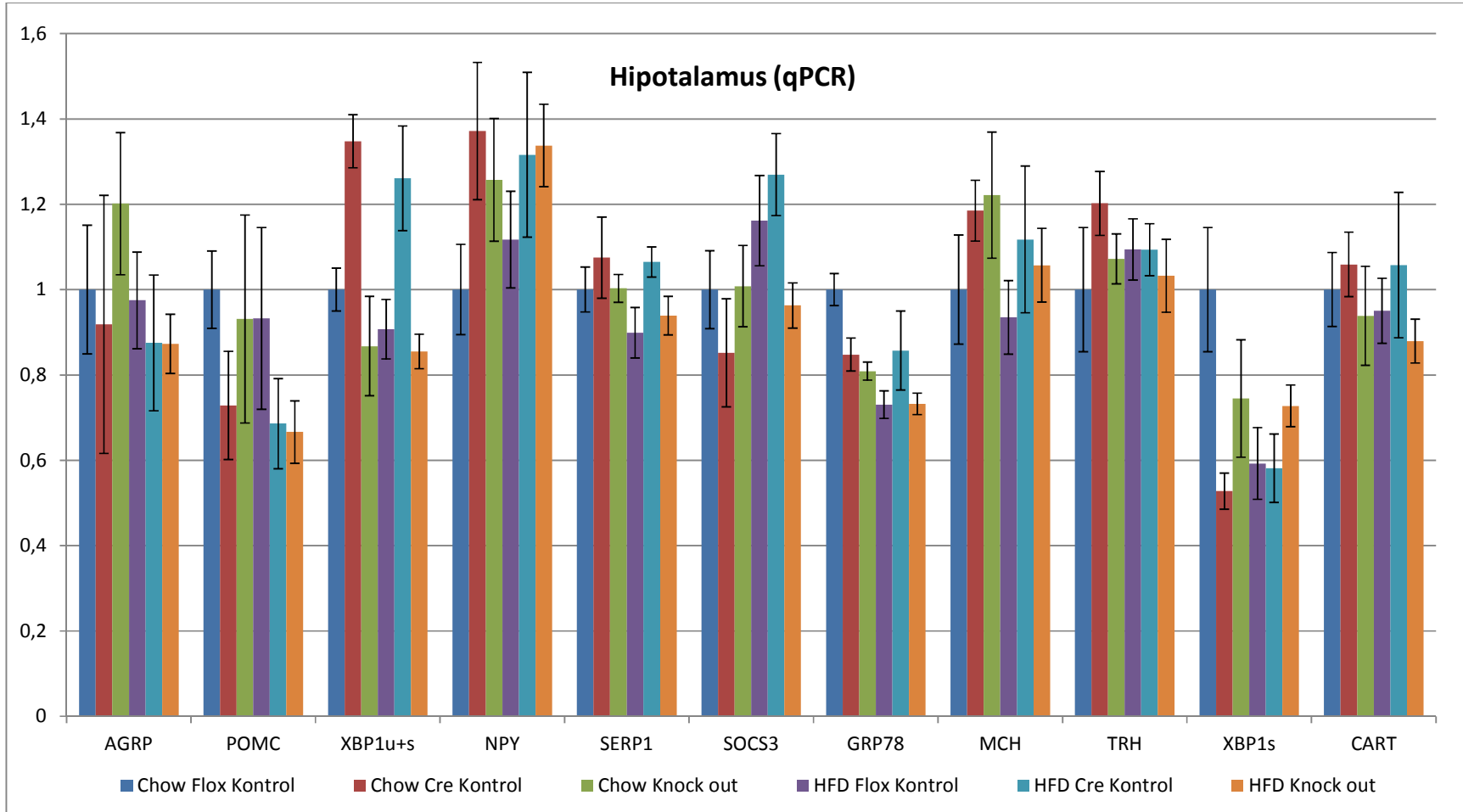
Pro-opiomelanokortin ifadesi arcuate çekirdekteki bir grup nöronun ayırt edici özelliği olduğundan, buradan yapılacak mRNA örneklemede tespit edilmesi beklenen genlerdendir. Bu genin ürünü olan α MSH merkezi sinir sisteminde, davranış ve metabolik hız ile ilgili pek çok bölgede bulunan MC4R reseptörlerine bağlanarak yeme davranışını baskılayan bir nörotransmitterdir. POMC Cre hayvanların POMC nöronlarında cre rekombinaz ifade ettikleri ve bu nöronların ölmesine neden olmadıkları literatürden bilinmektedir. Ancak bu tez çalışmasında kullanılmak üzere üretilen POMC nöron spesifik XBP1 knock out model organizmada gözlenen obez ve çok yiyen fenotipin gerçekten de POMC nöronlarında XBP1 silinmesine bağlı leptin direnci oluşmasından mı, yoksa bu nöronların XBP1 eksikliği ve veya başa bir nedenle ölmesinden mi kaynaklandığını anlamının bir yolu da POMC ifadesini kontrol etmektedir. Bu genin ifadesindeki ciddi bir düşüş POMC nöronlarının ölmesinden kaynaklanıp gözlenen fenotipin nedeni olabilir.

Tüm genler için olduğu gibi POMC qPCR'ı için de "melting curve" analizi yapılmış ve tek bir pik verdiği görülmüştür. Aynı örneğin iki farklı ölçümü çok yakın sonuçlar vermiş ve C_T 'leri belirgin bir ifade düzeyini yansıtacak şekilde 22,5 dolaylarında çıkmıştır. Bu düzey aynı dokudaki β -actin C_T 'sine (20) çok yakındır ve hem yüksek gen ifade düzeyini hem de POMC nöronlarının sağlıklı olduklarını kanıtlar.

Şekil 4.24 ve çizelge 4.13'teki POMC verileri birlikte incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Aynı durum AgRP ve NPY nöropeptitleri için de geçerlidir. Bu durum gerçekten de gözlenen fenotipin XBP1 silinmesinin ve veya cre rekombinaz ifadesinin POMC nöronlarının işlevinde meydana getirdiği bir değişiklikten kaynaklandığını düşündürmektedir. POMC geninin ifade düzeyleri arasında anlamlılığa en çok yaklaşan farklılık HFD ve Chow diyet grupları karşılaştırıldığında knock out hayvanlardadır. Bu durum gözlenen fenotiple uyumlu bir şekilde yaratılan genetik değişikliğin HFD koşullarında, hayvanların yeme davranışını baskılama yeteneklerini daha çok düşürdüğünü akla getirmektedir. Ancak aynı profil AgRP geninin ifade düzeyleri incelendiğinde de görülmüştür. AgRP'nin MC4R reseptörleri için ters agonist olduğu düşünülürse bu durum ilginçtir. Çünkü AgRP (ve NPY), POMC'nin aksine iştahı artırır ve metabolik hız ile enerji harcanmasını düşürür. Üstelik de AgRP ve NPY başka bir nöron grubunca üretilen nöropeptitlerdir ve POMC nöronlarındaki XBP1 silinmesine bağlı olarak oluşan ER stres vb koşullardan etkilenmemeleri gerekir. Bu nedenle, eğer bir anlamı varsa, AgRP nöropeptitinin knock out hayvanların HFD ile beslendikleri koşullarda azalması, deneysel olarak oluşturulan POMC nöron spesifik ER stres nedeniyle azalan POMC ifadesinin yarattığı bir düzenlenme olabilir. α MSH ile tam tersi bir işlev gören AgRP'nin düzeyi, azalan α MSH düzeylerini takip ederek denge koşulunun sağlanması için düzenlenmiş olabilir. Yine de tüm bu farklılıklar sadece birer eğilimdir ve istatistiksel olarak anlamlılık sınırını aşmamıştır.

Gıda alımını kontrol eden bir diğer nöropeptit olan CART için ise farklı gruplar arasında eğilim cinsinden bile olsa bir ifade farklılığı görülmemiştir. Yine POMC nöronlarından salınan yeme isteğini azaltıcı bir nöropeptit olan CART'ın ifade düzeyinde bir azalma olmaması gözlenen fenotipin iştahı düzenleyen nöropeptitlerle ilgili olmadığını düşündürmektedir. Tüm bunlar knock out hayvanlarda gözlenen yüksek leptin düzeyleri ile birlikte değerlendirildiğinde hipotezle uyumlu bir leptin direnci görüntüsü oluşturmaktadır.

Doğrudan çalışmanın hedefi olması nedeniyle XBP1 düzeylerinin incelenmesi de önemli ve gereklidir. Bu amaçla hem XBP1'in bazal ifade düzeyi hem de ER stres ile ilgili modifikasyonunun düzeyini gösterecek şekilde bir qPCR stratejisi benimsenmiştir.



Şekil 4. 24 Hipotalamus dokusunda qPCR incelemesi yapılan genlerin farklı genotip ve diyet gruplarına ilişkin ifade profilleri. Tüm değerler grup ortalamasını göstermektedir ve standart hata barları ile birlikte verilmiştir. Her gen için ilk grubun değeri 1'e eşitlenerek inceleme kolaylığı sağlanmıştır. "y" ekseninde verilen sayılar kesin miktarları değil görece oranları yansıtmak için kullanılmış rastgele değerlerdir. Her gene ilişkin " C_T " değerleri yalnızca kendi içinde orantılı olarak ve β -aktin C_T 'leri ile normalize edilerek verilmiştir.

Her gen için hipotalamus qPCR t testi p değerleri	AGRP	POMC	XBP1u+s	NPY	SERP1	SOCS3	GRP78	MCH	TRH	XBP1s	CART
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,989	0,88	0,016	0,922	0,05	0,02	0,235	0,761	0,574	0,151	0,349
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,462	0,28	0,534	0,169	0,603	0,134	0,966	0,338	0,593	0,201	0,459
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,62	0,332	0,033	0,398	0,042	0,468	0,235	0,368	0,996	0,927	0,58
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,452	0,489	0,011	0,614	0,516	0,363	0,42	0,833	0,22	0,196	0,396
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,399	0,802	0,341	0,194	0,964	0,953	0,007	0,295	0,67	0,245	0,771
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,821	0,138	0,005	0,109	0,523	0,383	0,031	0,266	0,277	0,043	0,626
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,904	0,804	0,546	0,829	0,924	0,037	0,928	0,727	0,3	0,569	0,995
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,898	0,779	0,312	0,472	0,238	0,28	0,001	0,689	0,59	0,060*	0,68
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,094*	0,077*	0,387	0,18	0,263	0,619	0,004	0,63	0,948	0,279	0,343

Çizelge 4. 13 Şekil 4.24 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler $0,01 < p \leq 0,05$ ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise $p \leq 0,01$ anlamındadır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırına ulaşamamış eğilimlere ilişkin değerler, yanlarına “*” işareti konularak işaretlenmiştir.

Buna göre XBP1'in total düzeyini (XBP1u+s) ve sadece IRE1 α tarafından splayed edilmiş formunun (XBP1s) inceleneceği iki farklı qPCR analizi yapılmıştır. Elbette ki beyin dokusunda nöronlardan çok daha fazla sayıda nöroglia hücresi vardır. Ayrıca POMC nöronları da toplanan hipotalamus dokusundaki nöronların ancak küçük bir kesimini temsil eder. Bu nedenle knock out hayvanlarda da total XBP1 ve XBP1s mRNA'ları kontrollerdeki düzeylere yakın biçimde tespit edilebilir. Bu nedenle gözlenebilecek farklılıklar genetik modifikasyondan ziyade fizyolojik düzenlemelerden kaynaklanacaktır.

Şekil 4.24 ve çizelge 4.13 incelendiğinde görülecektir ki XBP1'in total ifade düzeyi HFD ve chow diyet koşulları arasında herhangi bir farklılık göstermemektedir. Ancak XBP1s düzeyleri incelendiğinde özellikle yabancıl türe en yakın soy olan flox kontrollerde istatistiksel anlamlılık sınırına çok yakın olan belirgin bir fark görülmektedir. Bunun nedeni sadece diyetin değişmesinin bile özellikle besin maddelerini algılayan nörolojik dokularda bir çeşit ER stresi yaratması olabilir.

XBP1'in total düzeyi aynı diyeti alan gruplar içinde Cre rekombinaz ifadesine bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir. Bu anlamlılık chow diyet grubunda çok daha güçlüdür. Chow diyet grubunda gözlenen cre bağımlı fenotipin altında yatan nedenlerden birisi bu olabilir. Buna rağmen özellikle chow diyet grubunda bu total XBP1 mRNA'sının cre kontrol grubunda splayed olan kısmı flox kontrol genotipi ile kıyaslandığında yine istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha düşüktür.

XBP1s bağımlı ER stresin düzeyini belirleyebilmek için doğrudan doğruya XBP1'in hedefi olan SERP1 ve Grp78 (BiP) ifade düzeyleri de incelenmiştir. Grp78 aynı zamanda IRE1 α 'nın etkinliğini düzenleyerek XBP1 splayedinin düzeyini belirler. Bu gen protein ürünleri aynı zamanda birer ER şaperonudurlar ve ER stresi ile mücadele etmekte kullanılırlar. Bu genlerin ifade düzeylerindeki değişikliğin, model organizmanın üretilme stratejisi ve toplanan hipotalamus dokusundaki POMC nöronlarının görece olarak düşük bolluğu nedeniyle, POMC nöronlarındaki değil fakat bunlara komşu tüm hücrelerdeki ifade değişikliği yansıtması beklenir.

Grp78 verisi incelendiğinde görülecektir ki sadece diyet değişikliği bile bu genin ifade profilini anlamlı şekilde değiştirmektedir. Flox kontroller ve knock out'lar dikkate alındığında HFD koşullarında Grp78 ifadesi chow diyet koşullarına göre daha düşüktür. Bu durum HFD koşullarında gözlenen ER stresi açıklar niteliktedir. Zira Grp78 ve benzeri şaperonların yeterli düzeyde ifade edilmediği hücrelere bir de yüksek düzeyde besin

maddesi girişi olursa ER stres gelişmesi kaçınılmazdır. Ancak cre kontroller ilginç biçimde bu profili göstermemektedir. Belki de cre rekombinaz ifadesi başlı başına bir ER stresi kaynağı olarak Grp78 düzeylerinin artmasına neden oluyor olabilir. Elbette ki cre rekombinaz knock out hayvanlarda da ifade edilmektedir ancak belki de XBP1 silinmesi nedeniyle bu model organizma, gelişen ER stresine yeterli ve gerekli tepkiyi verememektedir.

SERP1 için de özellikle HFD koşullarında Grp78 ile benzeri bir ilişki vardır. Aynen Grp78'de olduğu gibi HFD koşullarında sadece cre kontrollerde anlamlı bir SERP1 ifade artışı görülmektedir. Bu durum aynen cre kontroller gibi cre rekombinaz ifade eden knock out hayvanlarda görülmemektedir ve yine muhtemelen XBP1 silinmesi nedeniyledir. Zira SERP1 promotörü XBP1 kontrolündedir.

Hipotalamus dokusunda incelenen bir diğer önemli gen de SOCS3'tür. Bu gen pek çok sitokin reseptörü için sinyal baskılayıcıdır. JAK-STAT yolağı ile çalışan sitokin reseptörleri üzerinde etkindir. Leptin de sitokin ailesinin bir üyesidir ve leptin reseptörü de STAT3 fosforilasyonu ile sinyal iletir. Ayrıca SOCS3'ün leptin reseptör sinyali için de baskılama yaptığı daha önceki çalışmalardan bilinmektedir. Obezitenin inflamatuvar bir durum yarattığı bilinmektedir. HFD koşullarında sadece cre kontrollerdeki SOCS3 ifadesinin anlamlı şekilde artması ise belki de yine knock out hayvanların stres koşullarına uygun yanıtı veremiyor olmalarından kaynaklanıyor olabilir.

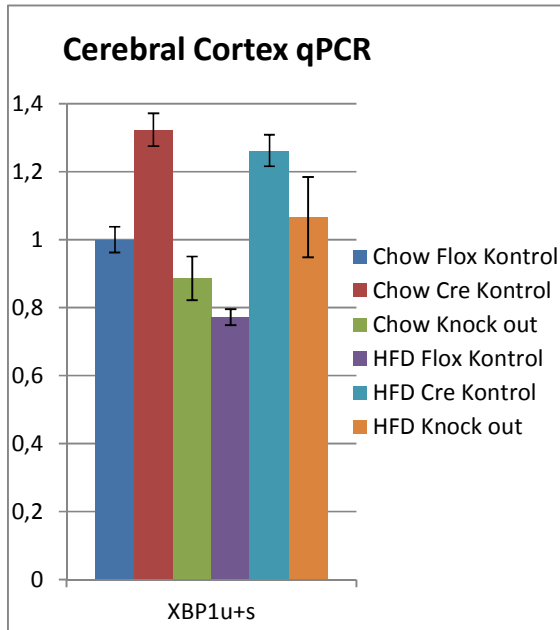
Son olarak hipotalamustan salgılanan hormonlardan birisi olmasına rağmen gıda alımı üzerinde etkisi olduğu bilinen MCH ve hipofiz ön lobundan TSH salgılanmasını tetikleyerek tiroit bezinin tiroksin salgılamasını sağlayan TRH genlerinin ifade düzeyleri de incelenmiştir. Özellikle TRH metabolik hızın kontrol edicilerinden birisi olan tiroksin salgılanmasını düzenlediğinden gözlenen fenotipi açıklayabilir. Ancak şekil 4.24 ve çizelge 4.13 incelendiğinde görülecektir ki bu genlerin ifade düzeylerinde hiçbir genotip veya diyete bağlı bir değişim yoktur.

Hipotalamus dokusundaki çalışmaların bir negatif kontrolü olarak serebral korteks dokusu da sınırlı sayıda gen için incelenmiştir. Bunlar AgRP, POMC ve total XBP1'dir. Bu dokuda AgRP ve POMC'nin C_T'leri β -actin C_T'sinden 10 ila 14 basamak aşağıda (27-32 arası değerlerde) ortaya çıkarak hipotalamus dokusunun doğru şekilde toplandığını kanıtlamışlardır. Aşağıdaki çizelge 4.14'te hem hipotalamustan hem de serebral korteksten yapılan kontrol qPCR'ları için elde edilen ortalama C_T'ler ve bu ortalamalara ilişkin

standart hatalar verilmiştir. Bu çizelge incelendiğinde görülecektir ki serebral korteks dokusunda β -actin ile kıyaslandığında sadece total XBP1 ifade düzeyleri anlamlı bir inceleme yapılacak kadar yüksektir. Serebral korteks dokusundaki AgRP ve POMC ifade düzeyleri ise neredeyse yok denecek kadar düşüktür. Bu durum literatürle uyumludur.

Karşılaştırmalı C _T Değerleri	Actin	AGRP	POMC	XBP1u+s
Serebral Korteks ortalama C _T 'leri	18,458	30,920	29,586	25,014
Serebral Korteks için standart hatalar	0,067	0,099	0,251	0,092
Hipotalamus ortalama C _T 'leri	19,743	24,557	23,145	23,155
Hipotalamus için standart hatalar	0,191	0,335	0,278	0,170

Çizelge 4. 14 Hipotalamus ve serebral korteks dokularından yapılan qPCR'lar sonucu AgRP ve POMC için elde edilen C_T değerlerinin aynı dokudaki β -actin C_T değeri ile kıyaslanmasını gösterir grafik.



Şekil 4. 25 Serebral Korteks XBP1 ifade profili.

Serebral korteks qPCR t testi p değerleri	XBP1u+s
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,161
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,047
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,000
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,001
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,174
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,002
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,384
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,003
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,213

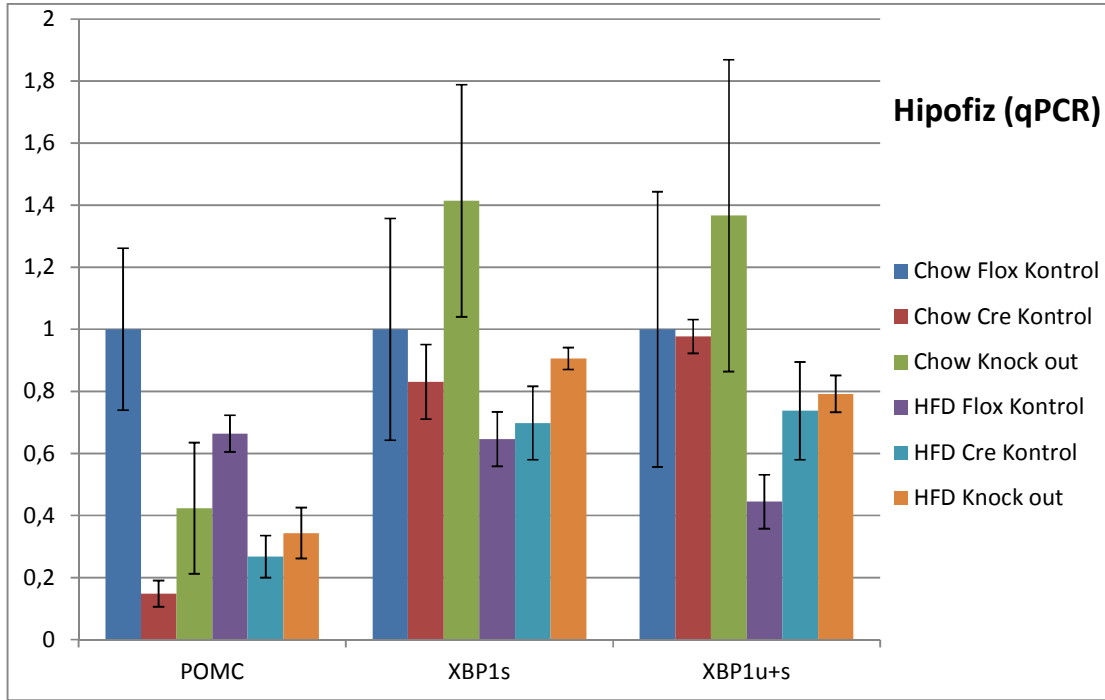
Çizelge 4. 15 Şekil 4.25 için p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler $0,01 < p \leq 0,05$ ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise $p \leq 0,01$ anlamındadır.

Şekil 4.25 ve çizelge 4.15 birlikte incelendiğinde görülecektir ki POMC nöron spesifik olmasına rağmen cre ifadesi serebral korteks dokusunda XBP1'in bazal seviyesini kuvvetli ve üst düzeyde anlamlı bir şekilde artırmaktadır. Ayrıca flox kontrol hayvanlarının kıyaslanması ile görülebileceği gibi diyet değişikliği de bu etkinin tersini yapmaktadır. Hipotalamustan çok uzaktaki bir dokunun bile bu şekilde etkilenmiş olması ilginçtir. Ancak bu değişikliğin söz konusu fenotipe katkısını ortaya koyabilmek için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

POMC'nin ifade edildiği ve bu nedenle XBP1'in silinmesinin kaçınılmaz olduğu bir diğer doku da hipofizdir. Hipofiz ön lobunda preproopiomelanokortin proteolitik olarak ACTH'a dönüştürülür. ACTH ise adrenal korteksten kortikosteroidlerin salınmasını düzenler. Bunların arasında kortizol ve kortizon gibi karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasını düzenleyen çok önemli glikokortikoid hormonlar bulunur.

Hipofiz bezi farelerde son derece küçük olduğundan toplanması ve RNA saflaştırılması zor bir dokudur. Her ne kadar çalışma da toplanan hipofiz dokuları için gereken özen gösterilmişse de bazı örneklerden yeterli miktarda RNA elde edilemediği qPCR analizleri sonucu anlaşılmış ve bu örnekler değerlendirme dışı bırakılmıştır. Bu amaçla β -aktin qPCR'ından elde edilen C_T 'ler incelenmiş ve örneklerin genelinin 17 ila 19 arasında değişen değerler aldığı görülmüştür. Daha sonra 20, 25, 33, 36 ve 40 şeklinde C_T 'ler alan 5 örnek hesaplamalardan çıkartılmıştır. Buna rağmen gruplara ilişkin ortalamaların standart hataları büyüktür. Fakat bu durumun chow diyet alan hayvanlarda daha belirgin olması qPCR sürecindeki bir hatadan çok gerçek bir yüksek varyasyonu yansıttığı düşüncesini akla getirmektedir.

Şekil 4.26 ve çizelge 4.16 birlikte incelendiğinde görülecektir ki alınan besine bağlı değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Fakat genotipe bağlı anlamlı değişimler vardır ve bu değişimlerin gücü diyet ile alakalıdır. Genel görüntü HFD koşulunun genotipler arasında gözlenen farklılıkları artırıcı etki yaptığı şeklindedir.



Şekil 4. 26 Hipofiz dokusunda qPCR incelemesi yapılan genlerin farklı genotip ve diyet gruplarına ilişkin ifade profilleri. Tüm değerler grup ortalamasını göstermektedir ve standart hata barları ile birlikte verilmiştir. Her gen için ilk grubun değeri 1'e eşitlenerek inceleme kolaylığı sağlanmıştır. "y" ekseninde verilen sayılar kesin miktarları değil göreceli oranları yansıtmak için kullanılmış rastgele değerlerdir. Her gene ilişkin "C_T" değerleri yalnızca kendi içinde orantılı olarak ve β-aktin C_T'leri ile normalize edilerek verilmiştir.

Her gen için hipofiz qPCR t testi p değerleri	POMC	XBP1s	XBP1u+s
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,498	0,156	0,759
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,014	0,031	0,010
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,002	0,734	0,152
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,285	0,219	0,497
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,139	0,454	0,605
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,045	0,679	0,963
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,181	0,458	0,210
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,290	0,400	0,301
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,743	0,268	0,337

Çizelge 4. 16 Şekil 4.26 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler 0,01 < p ≤ 0,05 ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise p ≤ 0,01 anlamındadır.

POMC ifadesi cre kontrollere flox kontrollere kıyasla anlamlı biçimde düşüktür. Bu etki HFD koşullarında daha da belirgindir. Bunun daha düşük ACTH salgısına yol açması ve daha düşük bir metabolizma ile daha yüksek bir vücut ağırlığı ortaya koyması beklenebilir fakat cre kontrollere her iki diyet grubu için de en yüksek vücut ağırlığı olan genotip değillerdir. Fakat ACTH etkinliği ile salgılanan kortisol ve kortizon'un glikoneogenezi

artırıcı özellikleri³ dikkate alındığında ilginç bir çizelge ortaya çıkar. Cre kontrol gruplarındaki daha yüksek RER değeri, düşük glikoneogenez nedeniyle bu hayvanların gıda kökenli glikozu ana besin maddesi olarak yıkılmalarından kaynaklanabilir. Bu düşünce DEXA verileri dikkate alındığında da geçerlidir. Zira cre kontrol hayvanlar chow diyet alırken tüm genotip ve diyet grupları içinde en az vücut yağına sahip grup olmakta, buna karşın HFD koşullarında da en tüm deney grupları arasında en yüksek düzeyde vücut yağı bulunan grup haline gelmektedirler. Bu gözlemler gerçekten de bu hayvanların aldıkları şekeri enerji için kullanıp, yağı şeker üretmek için kullanamadıkları sonucunu ortaya çıkartır. Zira nişasta içeriği doğal olarak yüksek olan tahıl temelli chow diyet alan cre kontroller bunu yağa dönüştürmekte en yetersiz grupken, yine HFD ile aldığı büyük miktarda yağı metabolize ederek enerji veya şekerle dönüştürme konusunda da en başarısız grup olarak tüm gruplar arasında en yüksek vücut yağ yüzdesini ortaya koymuşlardır.

Knock out'larda ise cre kontrollerle kıyasla POMC ifadesinde bir artış vardır. Ancak bu artış hala flox kontrollerle kıyaslandığında anlamlı ölçüde düşük olan bir düzeye kadardır. Bu ilginç çizelgenin nedeni şu olabilir. Cre kontrollerdeki POMC ifade düşüşünün nedeni aşırı ifade edilen cre rekombinazın ER stres yaratması nedeniyle gelişen genel bir translasyonel baskı ve veya cre rekombinazın önündeki POMC promotörünün aşırı çalışarak genomik POMC promotörü ile rekabete girip onun ifade düzeyini azaltması olabilir. Ancak knock out'lar XBPI silinmesi nedeniyle etkin biçimde ER stres algılaması yapamadığından POMC promotörünün ifadesi devam ediyor olabilir. Gerçekten de DEXA verilerinde açıkça görüldüğü gibi knock out hayvanlar flox kontrollerle daha yakın değerler almaktadırlar ve her iki diyet grubu için de cre kontrollerdeki değişimin tersi istikamette ve fakat flox kontrollerin düzeyine erişemeyen bir değişiklik söz konusudur. Tüm bunlar dikkate alındığında gözlenen fenotipin en azından bir kısmının hipofize bağlı değişikliklerden kaynaklandığı görülebilir.

Her ne kadar hipofizdeki değişikliklerin fenotipi açıklayıcı bir gücü varsa da örneğin HFD grubundaki knock out hayvanların neden daha çok yedikleri hala bir soru işaretidir. Bu durumu en iyi yeme davranışı üzerinde etkili olan hipotalamus ve yeme isteğini baskılayan POMC nöronlarındaki ER stres nedeniyle gelişen leptin direncinin bu nöronların işlevini bozması açıklar. Zira yeme davranışı ve leptin direncini düzeyi DEXA sonuçlarıyla paralel değildir. Beklentinin aksine cre kontrollerinden daha düşük bir vücut yağ yüzdesi olan

³ Farelerde insanın aksine daha etkin olan glikokortikoid hormon kortisol değil kortikosteron'dur. Ancak bu durum mevcut tartışmayı etkilemez, zira kortikosteron da ACTH kontrolünde salgılanmaktadır.

HFD knock out hayvanların daha yüksek leptin düzeylerine sahip olmaları da leptinin hem üretilmesinde hem de algılanmasında bir değişiklik olduğunu ve bunun POMC nöronlarındaki genetik değişikliği takip ettiğini göstermektedir.

Bu konuda literatürde net bir hesaplama bulunamamış olmasına rağmen, hipofiz dokusunda yapılan POMC IHC çalışmalarından anlaşıldığı kadarıyla, hipofizin ancak %40 kadarı POMC ifade etmektedir. Bu nedenle knock out hayvanlarda dokunun tamamından XBP1 silinmesi söz konusu değildir. Ayrıca çalışma için hazırlanan qPCR primerleri ekson 3 ve bundan daha 3' bölge dizilerini çoğaltacak şekilde tasarlandığı ve LoxP dizilerinin de ekson 2 etrafında bulunduğu dikkate alınır XBP1'in en azından temel ifade düzeylerinin hala knock out hayvanlarda da çalışılabileceği görülür. Bu delesyonun XBP1u mRNA'sının IRE1 α tarafından XBP1s mRNA'sına spays edilmesini nasıl etkilediğine dair bir bilgi yoktur. Ancak ortaya her durumda işlevsiz bir gen ürünü çıkmaktadır. Şu durumda hipofiz dokusundaki total XBP1 düzeyleri ve knock out'lar için olan veri kesin olmasa da, XBP1s ifade düzeyleri, dokunun yüksek POMC ifade düzeyine rağmen incelenebilir.

Her ne kadar chow diyet grubu için istatistiksel olarak anlamlı bir düzeye erişemediyse de özellikle HFD grubu verileri XBP1'in hem total düzeyinin hem de XBP1s düzeylerinin knock out hayvanlarda flox kontrollerle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığını göstermektedir. Knock out'ların cre kontrollerden anlamlı biçimde farklı olmaması nedeniyle bu etkinin cre rekombinaz ifadesinden kaynaklandığı düşünülebilir ancak daha önce sunulan pek çok verideki profilin aynısını yansıtacak şekilde cre kontroller yine flox kontroller ve knock out'lar arasında bir değer almaktadırlar. Bu durum knock out genotipin POMC ifade eden veya buna komşu hipofiz hücrelerinde bir ER stres tetiklediğinin en açık göstergesidir.

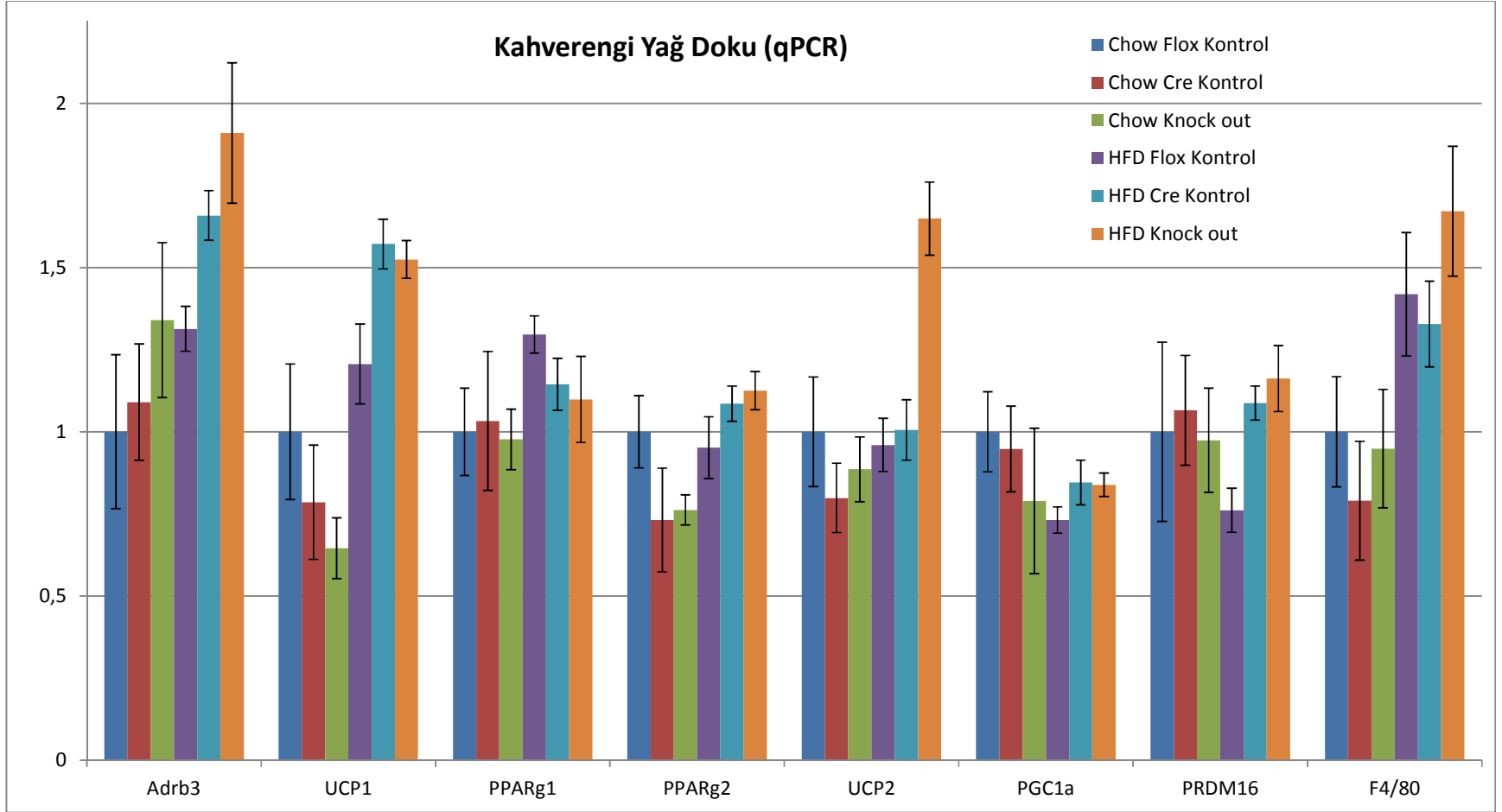
qPCR çalışması yapılan bir diğer doku da kahverengi yağ dokusudur. Bir memeli hayvan olan *Mus musculus* için vücut sıcaklığını korumak çok önemlidir. Küçük vücut büyüklüğü nedeniyle kolayca ısı kaybedebilen bu hayvanın yalnızca bu amaç için etkin biçimde ısı üreten en temel sistemi kahverengi yağ dokusudur. Kahverengi yağ doku sempatik sinir sistemi kontrolü altındadır ve temel olarak yağ yakar. Lipolitik ve leptin dirençli fenotipin gerçekten de merkezi sinir sisteminden gelen bir uyarı ile mi tetiklendiğini anlamak için incelenebilecek en ideal doku da budur. Bu nedenle deney hayvanlarından toplanan intraskapular kahverengi yağ doku bir grup genin ifade profili açısından incelenmiştir. Bunlar dokuya gelen sempatik sinir sistemi ve lipoliz sinyalini algılayan (β 3-Adrenerjik reseptör [Adrb3]), ısı üretimi ile ilgili olup kahverengi yağ dokuya özgül olan (UCP1 ve

UCP2), kahverengi yağ doku biyogenezinde rol oynayan (PPAR γ 1, PPAR γ 2, PGC1 α ve PRDM16) ve yağ dokudaki inflamasyon düzeyini ortaya koyan (F4/80) bir grup genidir. Sonuçlar aşağıdaki şekil 4.27 ve çizelge 4.17’de verilmiştir.

β 3-Adrenerjik reseptör ifadesinin farklı diyet grupları arasında gösterdiği farklılık sadece cre kontrollerde anlamlı bir düzeye eriştiği için diyete bağlı etki çok da kuvvetli bir eğilim değildir. Fakat HFD grubundaki β 3-Adrenerjik reseptör ifadesinde kısmen cre bağımlı olarak olsa da istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir artış bulunması ilginçtir. β 3-Adrenerjik reseptör, lipoliz sinyalinin ilk alındığı basamaktır. Bir GPCR olan bu reseptörün aktive olması adenilat siklaz \rightarrow cAMP \rightarrow protein kinaz A (PKA) \rightarrow lipolitik enzim ve proteinlerin fosforilasyon yoluyla aktivasyonu şeklinde bir sinyal yolağı ile lipolize neden olur. Bu genin ifade düzeyinin artması ilgili dokunun sempatik yolla uyarıldığına dair net bir işarettir.

UCP1 (termogenin) için elde edilen veriler daha da ilginçtir. Flox kontroller diyete bağlı bir farklılaşma ortaya koymazken, cre kontrol ve knock out hayvanlar chow diyet alırken azalan, HFD alırken ise artan bir ifade profili sergilemektedirler. Aynı diyeti alan cre kontroller ile knock out’lar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmaması bu durumun tamamen cre rekombinaz etkisi ile geliştiğini düşündürmektedir. Neredeyse karbon kopya bir profil PPAR γ 2 ifade düzeyleri için de geçerlidir. Adipogenez, yağ asidi alımı ve depolanması gibi işlevleri bulunan bir nükleer reseptör olan PPAR γ 2’nin, yağ asitleri ile aktive olan ve yine bu yağ asitlerinin yıkımından elde edilen enerjiyi kullanan UCP1 ile aynı profili sergilemesi şaşırtıcı değildir.

Yağ veya kahverengi yağ dokuya özgül olmayıp daha geniş birer dokusal ifade profili sergileyen PPAR γ 1 ve PGC1 α söz konusu olduğunda ise gruplar arası anlamlı farklılıklar ortaya çıkmamıştır.



Şekil 4. 27 Kahverengi yağ dokusunda qPCR incelemesi yapılan genlerin farklı genotip ve diyet gruplarına ilişkin ifade profilleri. Tüm değerler grup ortalamasını göstermektedir ve standart hata barları ile birlikte verilmiştir. Her gen için ilk grubun değeri 1'e eşitlenerek inceleme kolaylığı sağlanmıştır. “y” ekseninde verilen sayılar kesin miktarları değil göreceli oranları yansıtmak için kullanılmış rastgele değerlerdir. Her gene ilişkin “C_T” değerleri yalnızca kendi içinde orantılı olarak ve β-aktin C_T'leri ile normalize edilerek verilmiştir

Her gen için BAT qPCR t testi p değerleri	Adrb3	UCP1	PPARg1	PPARg2	UCP2	PGC1a	PRDM16	F4/80
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,302	0,632	0,769	0,627	0,001	0,929	0,523	0,177
HFD Flox Kontrol ↔ HFD Knock Out	0,032	0,050	0,204	0,153	0,000	0,071*	0,008	0,374
HFD Cre Kontrol ↔ HFD Flox kontrol	0,006	0,033	0,150	0,251	0,715	0,180	0,003	0,700
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,425	0,511	0,821	0,863	0,565	0,560	0,704	0,556
Chow Flox Kontrol ↔ Chow Knock Out	0,771	0,459	0,901	0,217	0,354	0,780	0,847	0,428
Chow Cre Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,341	0,189	0,891	0,116	0,581	0,437	0,938	0,840
HFD Cre Kontrol ↔ Chow Cre Kontrol	0,041	0,013	0,647	0,106	0,180	0,520	0,907	0,052*
HFD Flox Kontrol ↔ Chow Flox Kontrol	0,278	0,428	0,108	0,748	0,838	0,111	0,452	0,135
HFD Knock Out ↔ Chow Knock Out	0,106	0,000	0,466	0,001	0,000	0,838	0,348	0,022

Çizelge 4. 17 Şekil 4.25 için gruplar arası farklılıkların anlamlılık testlerine dair p değerleri çizelgesi. Açık yeşil zeminle işaretlenen değerler $0,01 < p \leq 0,05$ ve açık kırmızı zemin ile işaretlenen değerler ise $p \leq 0,01$ anlamındadır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırına ulaşamamış eğilimlere ilişkin değerler, yanlarına “*” işareti konularak işaretlenmiştir.

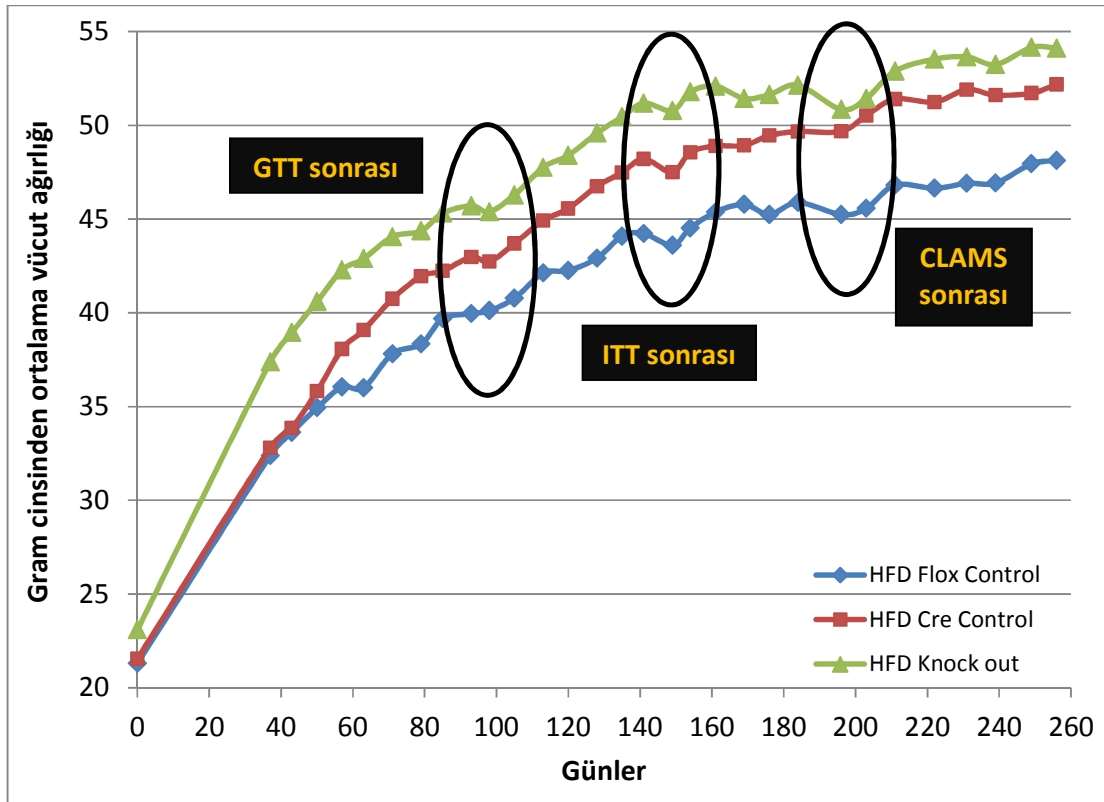
Adipositlerin kahverengi yağ doku hücrelerine dönüşmesindeki en kritik moleküllerden biri olan PRDM16, flox kontrolleri ile kıyaslandığında, yine sadece HFD koşullarında ve yine cre bağımlı olacak şekilde artan bir ifade profili göstermektedir.

Obez hayvanların yağ dokularında yaygın bir inflamasyon olduğu daha önceki çalışmalardan bilinmektedir. F4/80 verileri bunu doğrular niteliktedir. Bir makrofaj proteini olan F/80 önemli bir inflamasyon marker'ıdır. Burada asıl ilginç olan inflamasyonun HFD knock out grubuna özgü biçimde artmasıdır. UCP2 ifadesi ise tamamen knock out genotiple ilgili bir değişim göstermektedir. Literatürde UCP2'nin sadece bir "uncoupling protein" değil fakat aynı zamanda hücreleri zararlı reaktif oksijen türevlerinden de koruyan bir protein olduğuna dair çalışma ve görüşler mevcuttur. Bu açıdan bakılınca HFD knock out'lardaki yüksek inflamasyon düzeyi ile yüksek UCP2 düzeyleri aynı işlevselliğin birer bileşeni olarak görünmektedirler.

5. SONUÇ

Tez çalışmasında üç önemli sonuç elde edilmiştir. Bunlar test edilen hipotez ile uyumlu bir gözlem, bu tez çalışmasında da kullanılan transgenik model organizmanın geliştirilme stratejisi ile negatif kontrollerinin seçimi hakkında bazı yeni gerçekler ve deneylerin hayvan davranışı çalışmaları üzerindeki etkileri olarak sıralanabilir. Ayrıca gelecekteki çalışmalar için bazı yeni sorular da oluşmuştur.

Öncelikle hayvan davranışı çalışmalarında yapılan her deneysel müdahalenin veriler üzerinde ciddi ve gözle görülür etkileri olduğu ortaya çıkmıştır. Şekil 5.1 incelendiğinde görülecektir ki vücut ağırlığı değişimlerinde yapılan deneysel çalışmaların etkileri kolayca izlenebilmektedir. Bu çelişkili bir durum yaratmaktadır. Zira deney grubundaki hayvanları, kuyruktan kan alma gibi en basit uygulamalar bile etkilemektedir. Ancak bu incelemeleri, çalışmanın kontrollü doğası gereği, bir diğer grup hayvan üzerinde yapma olanağı da yoktur. Sonuçta olabilen en az invazif yöntemlerin seçildiği bir çalışma planı hazırlanması kaçınılmazdır.



Şekil 5. 1 Yapılan deneysel çalışmaların vücut ağırlığı üzerine etkisi. Verilerdeki ani değişim dönemleri deney gruplarındaki hayvanlar üzerinde yapılan fiziksel çalışmalarla zamansal olarak çakışmaktadır.

Bir diğerk önemli sonuç literatürde sıklıkla yapılan bir yanlışı açıkça ortaya koymaktadır. Günümüzde yapılan ve Cre-Lox rekombinasyonu esasına dayanan, knock out model organizma çalışmalarında negatif kontrol olarak floxed hayvanlar kullanılmaktadır. İncelenen şeyin ilgili gen olduğu düşünöldüğünde bu yaklaşım doğru bulunabilir. Zira genin varlığı ile yokluğunu kıyaslarken değişimin eklenen LoxP dizisinden gelip gelmediğini anlamak ve veya bu dizilerin etkilerini de hesaba katabilmek için floxed hayvanların negatif kontrol grubu olarak kullanılması akla yatkındır. Ancak dikkatlice bir inceleme durumun bu kadar basit olmadığını gözler önüne serer. Her durumda intron veya benzeri kodlanmayan ve düzenleyici bir görevi de bulunmayan bölgelere eklenen LoxP dizilerinin belirli bir etki yaratmaları zaten beklenmez. Bu durum yöntemin temel mantıklarından birisidir. Ancak bu dizilerden DNA'yı keserek arada kalan parçayı çıkartan Cre rekombinaz, hedef hücrelerde üretilen bir enzimdir ve doku özgül promotoru ile ifade edildiği dokuda yeni bir protein ortaya çıkmasına neden olur. Sonuç olarak Cre rekombinaz ifadesini LoxP dizilerinin varlığı gibi ihmal edilebilecek bir etki olarak değerlendirmek çok da mümkün ve mantıklı değildir. Bu durumda knock out hayvanların taşıdığı genetik değişimlerin (Cre rekombinaz ifadesi + silinmiş hedef gen + LoxP dizisi) gerçek negatif kontrolünün içerdiği genetik modifikasyonlar gereği (Cre rekombinaz ifadesi + hedef gen) Cre kontrol grubu olması daha akla yatkındır. Bu tez çalışmasında hem floxed kontrol grubunun hem de Cre kontrol grubun kullanılması neticesinde görölmüştür ki gerçekten de bu üç farklı genotipin üç farklı fenotipi vardır ve flox kontrol grubundaki hayvanlar mevcut literatür bilgisi ışığında değerlendirildiklerinde büyük ölçüde yabancı soy gibi davranmaktadırlar. Çalışma sonucunda knock out soyda gözlenen etkilerin en azından bir kısmının Cre rekombinazdan geldiği açıkça ortaya çıkmıştır. Bunun hesaba katılmadığı çalışmalarda gözlenen fenotipler kimi zaman abartılı kimi zaman da hatalıdır. Sonuç olarak Cre kontrol gruplarının Cre-Lox rekombinasyonu esasına dayalı her model organizma çalışmasında deney grupları arasında bulunması ve asıl negatif kontrol olarak değerlendirmeye alınmaları gerekmektedir.

Tez alışması sonucunda ER stresinin POMC nöronlarını etkilediğine dair bulgulara ulaşılmıştır. Knock out grubu pek çok testte hem flox kontrollerden hem de Cre kontrollerden farklı bir fenotip göstermiştir. Özellikle kaslarda gözlenen titremeye bağlı ısı üretme mekanizması haricindeki en temel ısı üretim mekanizması olan termogenin ile mitokondriyal membran potansiyelinden ısı üreten bir organ olan kahverengi yağ dokudaki değişiklikler ilginçtir ve hem diyet bağımlı hem de knock out genotipe özğüdürler. Bu

durum hipotezle uyumlu bir yorumu ortaya çıkartmaktadır. Zira kahverengi yağ doku, Bartness et al. 2010’da detaylı bir derlemesi verildiği üzere, merkezi sinir sistemi kontrolü altındadır. Daha da önemlisi Song et al. 2008’de gösterildiği gibi kahverengi yağ dokuya projeksiyon yapan sempatik sistemi nöronlarında MC4R reseptörleri vardır. Tüm bunlar gözlenen ilginç fenotipin POMC nöron sinyalindeki değişikliklerden kaynaklandığı izlenimini uyandırmaktadır. Zira kahverengi yağ doku ile POMC nöronları arasında net bir şekilde gösterilmiş bir bağlantı vardır ve POMC nöron spesifik XBP1 knock out hayvanlar Cre kontrollerinin aksine lipolitik ve daha az yağlı buna rağmen daha yüksek kan leptin düzeyleri ve leptin direncine sahiptirler.

Knock out genotipteki en belirgin değişikliklerden birinin UCP2 ifade düzeyinde gözlenmesi de ilginçtir. Kan serbest gliserol ve vücut yağ yüzdesi verilerinden anlaşıldığı gibi lipolitik yapıda olan bir fenotipten beklenen şey UCP1 düzeylerinin artmasıdır. Ancak ifade düzeyinde artış gözlenen gen UCP2 olmuştur. Andrews et al. 2008 ve Diano and Horvath 2012’de belirtildiği gibi UCP2 sadece adaptif termogeneze değil, aynı zamanda ve belki de öncelikli olarak oksidatif serbest radikallerin etkisizleştirilmesinde görevlidir. Zira UCP2 okside olmuş membran lipitleri gibi moleküllerle aktive olur ve membran potansiyelini düşürerek serbest radikal oluşumunu azaltır. Bu literatür bilgisi mevcut gözlemi daha da ilginç bir hale getirmektedir zira “ER stresi – obezite – inflamasyon” ilişkisi uzun zamandır bilinmekte ve sıklıkla çeşitli araştırmalara konu olmaktadır (Hotamisligil 2006, 2008 ve 2010). Dahası F4/80 qPCR verilerine bakıldığında özellikle HFD grubunda, chow diyet grubuna kıyasla kahverengi yağ doku inflamasyon düzeyinde belirli oranda bir artış olduğu görülmektedir. Fakat doğrudan doğruya merkezi sinir sistemi ile ilişkili bu dokuda UCP2 ifade artışı sadece POMC nöron spesifik XBP1 knock out model organizmada gözlenmektedir. Bu durum haliyle, artan yağ yakışı ve ilişkili oksidatif serbest radikal oluşumunun UCP2 ifade artışında temel neden olduğu ve POMC nöron spesifik XBP1 knock out model organizmanın merkezi sinir sistemi kontrolü altında lipolitik bir profil sergilediği düşüncesini akla getirmektedir. Sonuç olarak Cre kontrol hayvanların yağ depolayan fenotipini, bugün için bilemediğimiz mekanizmalarla Cre rekombinaz varlığı; knock out model organizmanın lipolitik, leptin dirençli fenotipini ise yüksek inflamasyon düzeyli yağ dokusunda UCP2 ile enerji harcayan ER stres düzeyi yüksek POMC nöronları açıklar. Muhtemel bu nöronların hem Cre hem de flox kontrol grupların farklı davranışının altında iki nedenden biri veya her ikisi vardır. Gelişen ER

stresi nedeniyle bozulan leptin sinyali ve veya gelişen ER stresi nedeniyle ortaya çıkan, hedef dokulara yönelik hatalı sinyal iletimi.

Tez çalışması sonucunda, bu konulardaki çalışmaların gelecekte alacağı yön açısından akıllara gelen bazı sorular da şöyle sıralanabilir. Cre rekombinazın yüksek hücresel düzeyleri de bir çeşit ER stresi kaynağı olabilir mi? Eğer öyleyse XBP1 silinmesi neden fenotipi tam tersi olacak şekilde değiştirmektedir? UCP2'nin anti-oksidatif özellikleri tam olarak ispatlanırsa, obezitede gözlenen yüksek inflamasyon düzeyleri ve UCP2 ilişkisi hakkında daha genel geçerli bir ilişkinin varlığından söz edilebilir mi?

KAYNAKLAR

Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, la Fleur SE, Kas MJ, de Krom M 2006 “The MC4 receptor and control of appetite” *Br J Pharmacol.* Dec;149(7):815-27.

Ahima RS, Flier JS, 2000 “Leptin” *Annu Rev Physiol.* 62:413-37.

Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschöp MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S 2008 “UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals” *Nature.* Aug 14;454(7206):846-51.

Anonim 2013 CLAMS <http://www.colinst.com/brief.php?id=61>

Anonim 2013 Introduction to Cre-lox technology <http://cre.jax.org/introduction.html>

Anonim 2013 IRE1 <http://omim.org/entry/604033>

Anonim 2013 Lepr_ leptin receptor <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16847>

Anonim 2013 Leptin receptor; LEPR <http://omim.org/entry/601007>

Anonim 2013 Leptin Receptor_ *Mus musculus* <http://www.uniprot.org/uniprot/P48356>

Anonim 2013 Leptin_ *Homo sapiens* <http://www.uniprot.org/uniprot/P41159>

Anonim 2013 Leptin_ *Mus musculus* <http://www.uniprot.org/uniprot/P41160>

Anonim 2013 *Mus musculus* B6-000664 <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>

Anonim 2013 *Mus musculus* B6-010714 <http://jaxmice.jax.org/strain/010714.html>

Anonim 2013 XBP1 floxed strain of *Mus musculus* C57BL/6 MGI:3774017 Xbp1^{tm2Glm}
<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&id=MGI:3774017>

Anonim 2013 XBP1 <http://omim.org/entry/194355>

Bacart J, Leloire A, Levoye A, Froguel P, Jockers R, Couturier C 2010 “Evidence for leptin receptor isoforms heteromerization at the cell surface” *FEBS Lett.* Jun 3;584(11):2213-7.

Baile CA, Della-Fera MA, Martin RJ 2000 “Regulation of metabolism and body fat mass by leptin” *Annu Rev Nutr.* 20:105-27.

Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC Jr, Elmquist JK, Lowell BB 2004 “Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis” *Neuron.* Jun 24;42(6):983-91.

Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr. 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 275:14563–72

Barsh GS, Schwartz MW 2002 “Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration” *Nat Rev Genet.* Aug;3(8):589-600.

Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK 2010 “Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue” *Int J Obes (Lond).* Oct;34 Suppl 1:S36-42.

Bates SH, Dundon TA, Seifert M, Carlson M, Maratos-Flier E, Myers MG Jr. 2004 “LRb-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin” *Diabetes.* Dec;53(12):3067-73.

Bates SH, Myers MG Jr 2003 “The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function” *Trends Endocrinol Metab.* Dec;14(10):447-52.

Belgardt BF, Okamura T, Brüning JC 2009 “Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons” *J Physiol.* Nov 15;587(Pt 22):5305-14.

Bernales S, Papa FR, Walter P 2006 “Intracellular signaling by the unfolded protein response” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 487–508.

Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, Moore SC, Tobias GS, Anton-Culver H, Freeman LB, Beeson WL, Clipp SL, English DR, Folsom AR, Freedman DM, Giles G, Hakansson N, Henderson KD, Hoffman-Bolton J, Hoppin JA, Koenig KL, Lee IM, Linet MS, Park Y, Pocobelli G, Schatzkin A, Sesso HD,

Weiderpass E, Willcox BJ, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Willett WC, Thun MJ 2010 “Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults” *N Engl J Med.* Dec 2;363(23):2211-9

Björnholm M, Münzberg H, Leshan RL, Villanueva EC, Bates SH, Louis GW, Jones JC, Ishida-Takahashi R, Bjørbaek C, Myers MG Jr. 2007 “Mice lacking inhibitory leptin receptor signals are lean with normal endocrine function” *J Clin Invest.* May;117(5):1354-60.

Brennan AM, Mantzoros CS. 2006. "Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications". *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2 (6): 318–327.

Caballero B 2007 “The global epidemic of obesity: an overview” *Epidemiol Rev.* 29:1-5.

Casazza K, Fontaine KR, Astrup A, Birch LL, Brown AW, Bohan Brown MM, Durant N, Dutton G, Foster EM, Heymsfield SB, McIver K, Mehta T, Menachemi N, Newby PK, Pate R, Rolls BJ, Sen B, Smith DL Jr, Thomas DM, Allison DB 2013 “Myths, presumptions, and facts about obesity” *N Engl J Med.* Jan 31;368(5):446-54.

Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S 2010 “The melanocortin system in control of inflammation” *Scientific World Journal.* Sep 14;10:1840-53.

Cone RD 2006 “Studies on the physiological functions of the melanocortin system” *Endocr Rev.* Dec;27(7):736-49. Epub 2006 Oct 31.

de Luca C, Kowalski TJ, Zhang Y, Elmquist JK, Lee C, Kilimann MW, Ludwig T, Liu SM, Chua SC Jr 2005 “Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes” *J Clin Invest.* Dec;115(12):3484-93.

Diano S, Horvath TL 2012 “Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism” *Trends Mol Med.* Jan;18(1):52-8.

Fantuzzi G, Faggioni R 2000 “Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis” *J Leukoc Biol.* Oct;68(4):437-46.

Farooqi IS, O'Rahilly S. 2005 “Monogenic obesity in humans” *Annu Rev Med.* 56:443-58.

- Fonseca SG, Burcin M, Gromada J, Urano F 2009 “Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes” *Curr Opin Pharmacol*. Dec;9(6):763-70.
- Friedman JM, 2000 “Obesity in the new millennium” *Nature*. Apr 6;404(6778):632-4.
- Friedman JM, Halaas JL. 1998 “Leptin and the regulation of body weight in mammals” *Nature* 395:763–70
- Gage, G. J., Kipke, D. R., Shain, W. 2012 Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.* (65), e3564, doi:10.3791/3564
- Gong N, Einarsdottir IE, Johansson M, Björnsson BT 2013 “Alternative Splice Variants of the Rainbow Trout Leptin Receptor Encode Multiple Circulating Leptin-Binding Proteins” *Endocrinology*. Published online before print May 3, 2013, doi: 10.1210/en.2012-2082
- Haniu M, Arakawa T, Bures EJ, Young Y, Hui JO, Rohde MF, Welcher AA, Horan T, 1998. “Human leptin receptor. Determination of disulfide structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain” *J Biol Chem*. Oct 30;273(44):28691-9.
- Hetz C, Lee AH, Gonzalez-Romero D, Thielen P, Castilla J, Soto C, Glimcher LH. 2008 Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 15;105(2):757-62
- Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH 2011 “The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α ” *Physiol Rev*. Oct;91(4):1219-43.
- Hewitt JK 1997 “The genetics of obesity: what have genetic studies told us about the environment” *Behav Genet*. Jul;27(4):353-8.
- Hofbauer KG, Nicholson JR, Boss O. 2007 “The obesity epidemic: current and future pharmacological treatments” *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 47:565-92.
- Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS 2009 “Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells” *J Cell Biol* 186: 323–331.

Hollien J, Weissman JS 2006 “Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response” *Science* 313: 104–107.

Hotamisligil GS 2006 “Inflammation and metabolic disorders” *Nature*. Dec 14;444(7121):860-7.

Hotamisligil GS 2008 “Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes” *Int J Obes (Lond)*. Dec;32 Suppl 7:S52-4.

Hotamisligil GS 2010 “Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease” *Cell*. Mar 19;140(6):900-17.

Hotamisligil GS, Erbay E 2008 “Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases” *Nat Rev Immunol*. Dec;8(12):923-34.

Hummasti S, Hotamisligil GS 2010 “Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes” *Circ Res*. Sep 3;107(5):579-91.

Ihle JN, Kerr IM. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*. 11:69–74

Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG Jr. 2002. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J. Biol. Chem*. 277:41547–55

Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM 2010 “Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance” *PLoS One*. Jun 29;5(6):e11376.

Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM 2010 “Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance” *PLoS One*. Jun 29;5(6):e11376.

Knobelspies H, Zeidler J, Hekerman P, Bamberg-Lemper S, Becker W 2010 “Mechanism of attenuation of leptin signaling under chronic ligand stimulation” *BMC Biochem*. Jan 8;11:2.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM 1996 “Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice” *Nature*. Feb 15;379(6566):632-5.

- Lee YS 2009 “The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: lessons from experiments of nature” *Ann Acad Med Singapore*. Jan;38(1):34-11.
- Lin JH, Walter P, Yen TS 2008 “Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis” *Annu Rev Pathol*. 3:399-425.
- M. Maffei, J. Halaas, E. Ravussin, R.E. Pratley, G.H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, S. Ranganathan, P.A. Kern & J.M. Friedman. 1995 “Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects” *Nature Med*. 1, 1155–1161
- Malhi H, Kaufman RJ 2011 “Endoplasmic reticulum stress in liver disease” *J Hepatol*. Apr;54(4):795-809.
- Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, Hamnvik OP, Koniaris A, 2011 “Leptin in human physiology and pathophysiology” *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Oct;301(4):E567-84
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA 2002 “Leptin: a review of its peripheral actions and interactions” *Int J Obes Relat Metab Disord*. Nov;26(11):1407-33.
- Mauro C, Crescenzi E, De Mattia R, Pacifico F, Mellone S, Salzano S, de Luca C, D’Adamio L, Palumbo G, Formisano S, Vito P, Leonardi A 2006 “Central role of the scaffold protein tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in regulating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis” *J Biol Chem* 281: 2631–2638.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW 2006 “Central nervous system control of food intake and body weight” *Nature*. Sep 21;443(7109):289-95.
- Mountjoy KG 2010 “Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes” *Biochem J*. May 27;428(3):305-24.
- Münzberg H, Björnholm M, Bates SH, Myers MG Jr 2005 “Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance” *Cell Mol Life Sci*. Mar;62(6):642-52.
- Münzberg H, Myers MG Jr 2005 “Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance” *Nat Neurosci*. May;8(5):566-70.

Myers MG Jr, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW 2010 "Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect" *Trends Endocrinol Metab.* Nov;21(11):643-51

Myers MG Jr, Münzberg H, Leininger GM, Leshan RL 2009 "The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC" *Cell Metab.* Feb;9(2):117-23.

Myers MG Jr, Olson DP 2012 "Central nervous system control of metabolism" *Nature.* Nov 15;491(7424):357-63.

Myers MG, Cowley MA, Münzberg H 2008 "Mechanisms of leptin action and leptin resistance" *Annu Rev Physiol.* 70:537-56.

Myers MG, Cowley MA, Münzberg H 2008 "Mechanisms of leptin action and leptin resistance" *Annu Rev Physiol.* 70:537-56.

Myers MG, Cowley MA, Münzberg H. 2008 Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol.* 70:537-56.

Nagy A 2000. "Cre Recombinase: The Universal Reagent for Genome Tailoring". *Genesis* 26: 99–109

Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW 2004 "Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis" *Trends Endocrinol Metab.* Oct;15(8):362-9.

O'Rahilly S, Farooqi IS, Yeo GS, Challis BG 2003 "Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders" *Endocrinology.* Sep;144(9):3757-64.

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U. 2009 Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* Jan 7;9(1):35-51

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U 2009 "Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance" *Cell Metab.* Jan 7;9(1):35-51.

Ozcan L, Tabas I 2012 "Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders" *Annu Rev Med.* 63:317-28.

Park SW, Zhou Y, Lee J, Lu A, Sun C, Chung J, Ueki K, Ozcan U 2010 “The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation” *Nat Med.* Apr;16(4):429-37.

Pavitt GD, Ron D 2012 “New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response” *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Jun 1;4(6).

Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M 2010 “The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid” *Peptides.* Apr;31(4):757-76.

Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B 1996 “The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents” *Horm Metab Res.* Dec;28(12):642-8.

Ron D and Harding HP 2007 “eIF2 α phosphorylation in cellular stress-responses and disease” In: Hershey JWB, Matthews MB, Sonenberg N, Eds. “Translational Control in Biology and Medicine” Pages 345-368 (Chapter 13). Cold Spring Harbor Press.

Sauer B. 1987. "Functional expression of the Cre-Lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Cell Biol* 7: 2087–2096.

Sauer B.; Henderson N. 1988. "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5166–5170.

Schröder M 2008 “Endoplasmic reticulum stress responses” *Cell Mol Life Sci.* Mar;65(6):862-94.

Schröder M, Kaufman RJ 2005 “The mammalian unfolded protein response” *Annu Rev Biochem.* 74:739-89.

Scott DE, Pepe GJ 1987 “The fetal baboon median eminence as a circumventricular organ: I. Transmission electron microscopy” *Brain Res Bull.* Jul;19(1):87-94.

Seeley RJ, Drazen DL, Clegg DJ 2004 “The critical role of the melanocortin system in the control of energy balance” *Annu Rev Nutr.* 24:133-49.

Seeley RJ, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, van Dijk G, Baskin DG, Schwartz MW 1997 "Melanocortin receptors in leptin effects" *Nature*. Nov 27;390(6658):349.

Song CK, Vaughan CH, Keen-Rhinehart E, Harris RB, Richard D, Bartness TJ 2008 "Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Aug;295(2):R417-28.

Stark GR, Darnell JE Jr. 2012 "The JAK-STAT pathway at twenty" *Immunity*. Apr 20;36(4):503-14.

Sternberg N, Hamilton D. 1981. "Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites". *J Mol Biol* 150:467-86.

Taniguchi T. 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268:251-55

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI 1995 "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R". *Cell* 83 (7): 1263-71.

Tripathi YB, Pandey V 2012 "Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses" *Front Immunol*. 3:240.

Varela L, Horvath TL 2012 "Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis" *EMBO Rep*. Dec;13(12):1079-86.

Wek RC, Anthony TG 2010 "Obesity: stressing about unfolded proteins" *Nat Med*. Apr;16(4):374-6.

White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA. 1997. Leptin receptor (OB-R) signaling. *J. Biol. Chem.* 272:4065-71

Winick JD, Stoffel M, Friedman JM 1997 "Identification of microsatellite markers linked to the human leptin receptor gene on chromosome 1". *Genomics* 36 (1): 221-2.

Winnay JN, Boucher J, Mori MA, Ueki K, Kahn CR 2010 “A regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase increases the nuclear accumulation of X-box-binding protein-1 to modulate the unfolded protein response” *Nat Med.* Apr;16(4):438-45.

Wiseman RL, Haynes CM, Ron D 2010 “SnapShot: The unfolded protein response” *Cell.* Feb 19;140(4):590-590.e2.

Yeo GS, Heisler LK 2012 “Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics” *Nat Neurosci.* Oct;15(10):1343-9.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K 2001 “XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor” *Cell* 107, 881–891.

Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K 2000 “ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response” *Mol. Cell. Biol.* 20, 6755–6767.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM 1994 “Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue” *Nature* 372, 425–432

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şafak MERT
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Yılı : 1979
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise	1990-1997	Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi
Lisans	1997-2003	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	2005-2008	Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yılı:

2003 – 2009 arası	Ankara'daki çeşitli dersanelerde biyoloji öğretmenliği
2006 – 2007 yılları	BİOTEK Haşare Kontrol Ltd. Şirketi bünyesinde Ankara Büyükşehir Belediyesi haşare mücadele projesinde koordinatör yardımcısı.
2008 yılı	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Teknoloji Ar-Ge biriminde BİYEP (bilim insanı yetiştirme projesi) asistanı.
2010 – 2011 yılları	Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinasyon birimi 09B4143001 kodlu “alfa 2 makroglobulinin farklı fizyolojik formlarının inflamasyon ve immün cevaptaki rolü” başlıklı projede proje asistanı.
2012-Devam ediyor	Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi “Boston Children’s Hospital” Endokrinoloji Departmanı Araştırma Laboratuvarında Araştırma Asistanı.

Yayımları (SCI ve diğer):

- SCI Buzoglu HD, Unal H, Ulger C, Mert S, Kücükıldırım S, Er N 2009 “The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses” Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Nov;108(5):e121-6.
- Diğer (sürelî yayın) Kahraman Ipekdal, Şafak Mert 2009 “Biyolojik Evrim ve Evrim Teorisi” Cogito, Yapi Kredi Yay., Cilt: 60-61, sayfa 92-126 (“Darwin Devrimi: Evrim” başlıklı özel sayıda)
- Diğer (kitap bölümü) Şafak Mert 2008 “Canlı Moleküllerinin Cansız Süreçlerle Üretilbildiği Gösterilmiştir” Harun Yahya Safsatası ve Evrim Kuramı Gerçeği, Bilim Ve Gelecek Yayınları, sayfa 71-79, İstanbul
- Ulusal Kongrelerde Yapılmış Sunum “Beşikten Mezara Tarımsal Yakıtlar” başlıklı sözlü sunum. 2007, Biyoyakıtlar ve Biyoyakıt Teknolojileri Sempozyumu (Kimya Mühendisleri Odası ve Ziraat Mühendisleri Odasıca düzenlenmiştir, Aralık 2007 Ankara)