



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***DE NOVO LİPOGENEZDE KARBONİK
ANHİDRAZ II, III, V İZOENZİMLERİ İLE BEYİN
KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR (BDNF)
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ***

Fazilet YALDUZ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***DE NOVO LİPOGENEZDE KARBONİK
ANHİDRAZ II, III, V İZOENZİMLERİ İLE
BEYİN KAYNAKLI NÖROTROFİK FAKTÖR
(BDNF) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ***

Fazilet YALDUZ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2018

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Fazilet YALDUZ'un hazırladığı “De Novo Lipogeneze Karbonik Anhidraz II, III, V İzoenzimleri ile Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ahmet ALVER

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet ALVER

Prof. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

Prof. Dr. İsmail ABİDİN

Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN

Tarih: ../../2018

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.../.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 30/11/2018

Fazilet YALDUZ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda hem bilge ve tecrübeleriyle hem de manevi destekleriyle her zaman yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER başta olmak üzere yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA hocama öncelikle teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım hayvanların teminini sağlayıp desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İsmail ABİDİN'e,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarım Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Birgül VANİZÖR KURAL, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE, Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN'a, doktora çalışmamda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Diler US ALTAY'a, Dr. İmran İNCE'ye, Arş. Gör. Elif ŞAHİN'e, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN'a ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde maddi kaynak sağlayan KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Her zaman yanımda olan aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Fazilet YALDUZ

TDK-2016-5409 numaralı bu tez çalışması KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

x

1.	ÖZET	1
2.	SUMMARY	2
3.	GİRİŞ ve AMAÇ	3
4.	GENEL BİLGİLER	5
4.1.	<i>De Novo</i> Lipogenez	5
4.2.	Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)	6
4.2.1.	BDNF Reseptörleri	9
4.2.1.1.	Pannötrofin Reseptör (p75NTR Reseptörü)	9
4.2.1.2.	Tropomiyozin Reseptör Kinaz (TrkB Reseptörü)	9
4.2.2.	<i>BDNF</i> Geni ve Obezite	10
4.3.	Karbonik Anhidraz Enzimi ve Genel Özellikleri	11
4.3.1.	Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	14
4.4.	CA II	15
4.5.	CA III	16
4.6.	CA VA ve CA VB	18
4.7.	Piruvat Karboksilaz	21
4.8.	Asetil CoA Karboksilaz	22
5.	GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1.	Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	25
5.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
5.3.	Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları	26
5.4.	Farelerin Genotiplemesi	27

5.4.1.	Agaroz Jel Elektroforezi	28
5.5.	Gen Ekspresyonu	29
5.5.1.	RNA İzolasyonu	30
5.5.2.	RT-PCR ile RNA Örneklerinden cDNA Elde Edilmesi	31
5.5.3.	Real Time PCR Protokolü	31
5.5.4.	RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	33
5.6.	Serumda Yapılan Glukoz ve Triasilgliserol Ölçümü	34
5.7.	İstatistiksel Analizler	34
6.	BULGULAR	35
6.1.	Farelerin Ağırlık, Glukoz ve Triasilgliserol Seviyeleri İle İlgili Bulgular	37
6.2.	Karaciğer ve Yağ Dokularında Gen Ekspresyonları ile İlgili Bulgular	35
6.2.1.	CA II Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	35
6.2.2.	CA III Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	36
6.2.3.	CA VA Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	37
6.2.4.	CA VB Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	38
6.2.5.	Piruvat Karboksilaz Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	39
6.2.6.	Asetil CoA Karboksilaz β Ekspresyonu ile İlgili Bulgular	40
7.	TARTIŞMA	42
8.	SONUÇ ve ÖNERİLER	50
9	KAYNAKLAR	49
10.	EKLER	55
10.1.	Ek 1	55
11.	ETİK KURUL ONAYI	56
12.	ÖZGEÇMİŞ	57

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. α -CA izoenzimleri, hidrataz aktivitesi ve hücre içi yerleşimleri	13
Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	25
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar	26
Tablo 4. Genotiplemede kullanılan BDNF ve Neomisin primerleri	28
Tablo 5. Genotiplemede kullanılan PCR karışımı	28
Tablo 6. RNA örneklerinin RT-PCR işlemine hazırlanması	31
Tablo 7. RT-PCR protokolü	31
Tablo 8. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	32
Tablo 9. Örneklerin Real Time PCR için hazırlanması	32
Tablo 10. Real Time PCR protokolü	33
Tablo 11. Grupların başlangıç ve deney sonu ağırlıkları ile serum glukoz, triaçilgliserol değerleri	35
Tablo 12. Karaciğer ve yağ dokusuna ait CA II ekspresyon sonuçları	36
Tablo 13. Karaciğer ve yağ dokusuna ait CA III ekspresyon sonuçları	36
Tablo 14. Karaciğer ve yağ dokusuna ait CAVA ekspresyon sonuçları	37
Tablo 15. Karaciğer ve yağ dokusuna ait CA VB ekspresyon sonuçları	38
Tablo 16. Karaciğer ve yağ dokusuna ait piruvat karboksilaz ekspresyon sonuçları	39
Tablo 17. Karaciğer ve yağ dokusuna ait asetil CoA karboksilaz β ekspresyon sonuçları	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Yağ asidi biyosentezinde karbonik anhidraz izoenzimlerinin rolü	6
Şekil 2. BDNF'nin üretimi ve salgılanma mekanizması	7
Şekil 3. Fare ve rat BDNF genlerinin yapısı ve transkriptleri	8
Şekil 4. BDNF reseptörleri ve ilişkili oldukları sinyal iletim yolları	9
Şekil 5. Karbonik anhidraz enziminin dönüşümlü reaksiyonu	12
Şekil 6. Karbonik anhidraz enzimi hidrataz aktivitesinin mekanizması	14
Şekil 7. Glukozun oksidatif metabolizması ve süperoksit üretiminde mitokondrial karbonik anhidrazların rolü	20
Şekil 8. BDNF ve neomisin bantlarının gösterildiği örnek bir agaroz jel görüntüsü	29
Şekil 9. Grupların karaciğer ve yağ dokularının CA II ekspresyonu karşılaştırması	36
Şekil 10. Grupların karaciğer ve yağ dokularının CA III ekspresyonu karşılaştırması	37
Şekil 11. Grupların karaciğer ve yağ dokularının CA VA ekspresyonu karşılaştırması	38
Şekil 12. Grupların karaciğer ve yağ dokularının CA VB ekspresyonu karşılaştırması	39
Şekil 13. Grupların karaciğer ve yağ dokularının piruvat karboksilaz ekspresyonu karşılaştırması	40
Şekil 14. Grupların karaciğer ve yağ dokularının asetil CoA β karboksilaz ekspresyonu karşılaştırması	41

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ACC1	Asetil CoA karboksilaz 1
ACC2	Asetil CoA karboksilaz 2
AMPK	Adenosin monofosfat aktive olan protein kinaz
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CA	Karbonik anhidraz
CARPs	CA ilişkili proteinler
CPSI	Karbamoil fosfat sentetaz I
CPSII	Karbamoil fosfat sentetaz II
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
DNL	<i>De novo</i> lipogenez
EC	Enzim kodu
mBDNF	Olgun beyin kaynaklı nörotrofik faktör
NT	Nörotrofin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	Real-time polimeraz zincir reaksiyonu
SOD	Süperoksit dismutaz
TCA	Trikarboksilik asit
TrkB	Tropomiyozin reseptör kinaz B

Simgeler

Alfa	α
Beta	β
Gama	γ
Mikro	μ
Lamda	λ
Epsilon	ϵ

Formüller**CH₃COOH**

Asetik asit

C₂H₅OH

Etanol

C₃H₇OH

İzopropil alkol

CHCl₃

Kloroform

HCl

Hidroklorik asit

KCl

Potasyum klorür

MgCl₂

Magnezyum klorür



ÖZET

***De Novo* Lipogenezde Karbonik Anhidraz II, III, V İzoenzimleri ile Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi**

De novo lipogenez (DNL), obezite başta olmak üzere metabolik sendrom, diyabet gibi birçok metabolik bozuklukla ilişkili kompleks bir metabolik yoldur. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) proteini ise nöronal fonksiyonlarının yanısıra enerji homeostazı için de önemli olan bir nörotrofindir. BDNF heterozigot farelerle yapılan çalışmada bu farelerde kilo artışı, diyabet bazen de yeme davranışlarında bozukluklar görülmüştür. Karbonik anhidrazlar hem glukoneogenez, üregenez, lipogenez gibi çeşitli fizyolojik olaylarda hem de obezite, diyabet gibi patolojik olaylarda rolü olan metaloenzimlerdir. Sitozolde ve mitokondride bulunan karbonik anhidraz (CA) izoenzimlerinin, yağ asidi sentezinde asetil CoA'yı yağ asitlerinin yapı taşı olan malonil-CoA'ya dönüştürmek için gerekli bikarbonat iyonununu sağladığı ileri sürülmüştür. Tüm bu verilerden yola çıkarak, *de novo* lipid sentezinde BDNF ile CA II, III, VA-VB izoenzimleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Dört aylık wild tip ve BDNF (+/-) farelerden iki grup oluşturuldu. Hayvanlardan alınan karaciğer ve yağ dokularında CA II, III, VA-VB, asetil CoA karboksilaz ve piruvat karboksilaz ekspresyonlarına ölçüldü. BDNF heterozigot farelerde hem karaciğer hem de yağ dokusunda CA II, CA VA izoenzimleri ile piruvat karboksilaz ve asetil CoA karboksilaz enzimlerinin gen ekspresyonları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). CA III ekspresyonu yağ dokusunda yüksek bulunurken karaciğer dokusunda anlamlı bir değişiklik görülmedi. Karaciğer dokusundaki CA VB ekspresyonunda da wild tipe göre anlamlı bir değişiklik görülmedi. Bu bilgiler ışığında, BDNF'nin *de novo* lipogenezi (DNL)'i karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinden düzenleyebileceği kanatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: BDNF, CA II, CA III, CA VA-VB, *de novo* lipid sentezi

SUMMARY

The Investigation of the Relationship Between the CA II, III, V Isoenzymes and BDNF in the *De Novo* Lipogenesis

De novo lipogenesis is a complex pathway associated with many metabolic disorders such as metabolic syndrome, diabetes and especially obesity. BDNF protein is a neurotrophin that is important for energy homeostasis as well as neuronal functions. Carbonic anhydrases are metalloenzymes which have roles both in physiological events such as gluconeogenesis, ureogenesis, lipogenesis, and in pathological events such as obesity and diabetes. CA isoenzymes in the cytosol and mitochondria have been suggested to provide the bicarbonate ion needed to convert acetyl CoA to malonyl-CoA, which is the building block of fatty acids, in fatty acid synthesis. Based on all these information, the relationship between BDNF and CA II, III, VA-VB isoenzymes was investigated in *de novo* lipid synthesis. Four-month wild-type and BDNF heterozygous mice (BDNF (+/-)) mice were divided into four groups. Expressions of acetyl CoA carboxylase and pyruvate carboxylase with CA II, III, VA-VB in the liver and adipose tissues were studied. Gene expressions of pyruvate carboxylase and acetyl CoA carboxylase enzymes with CA II, CA VA isoenzymes in both liver and adipose tissues were significantly higher in BDNF heterozygous mice compared to the control group ($p < 0.05$). CA III expression was high in adipose tissue while there was no significant increase in liver tissue. CA VB expression in liver tissue showed no significant change compared to the wild type. In the light of this information, it was found that BDNF could regulate DNL via carbonic anhydrase isoenzymes.

Key Words: BDNF, CA II, III, VA-VB, *de novo* lipid synthesis

3. GİRİŞ ve AMAÇ

De novo lipogenez, diyetle alınan fazla miktardaki protein ve karbohidratların asetil CoA vasıtasıyla yeni yağ asitlerine dönüşümünün biyokimyasal sentezini ifade eder. Bu endojen metabolik yol temelde tüm hücrelerde meydana gelir fakat adipoz doku ve karaciğer dokusu başlıca oluşum yerleridir. Kompleks bir metabolik yol olan *de novo* lipogenezin, obezite başta olmak üzere metabolik sendrom, tip 2 diyabet gibi birçok patogeneze de ilişkili olduğu görülmüştür (1).

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), omurgalıların merkezi ve periferel sinir sisteminde önemli rolleri olan nörotrofin (NT) ailesinin tanımlanan ikinci üyesi olup, ilk kez domuz beyin dokusundan izole edilmiştir (2). BDNF proteininin nörolojik gelişim, sinaptik iletim, öğrenme ve hafızadaki rolünün yanısıra, vücut ağırlığının kontrolü ve enerji hemeostazı için de önemli olduğunu gösteren deliller mevcuttur (3). BDNF heterozigot farelerle yapılan çalışmada bu farelerin vücut ağırlıklarında artış bazen de yeme davranışlarında bozukluklar görülmüştür (4).

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1, karbonat hidrolizaz) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan, aktif bölgelerinde çinko ihtiva eden ve başlıca beş farklı gen ailesi (α , β , γ , λ , ϵ) tarafından kodlanan metaloenzimlerdir (5, 6). Karbonik anhidraz aktivitesi; pH regülasyonu, karbondioksit homeostazı, solunum, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu gibi olaylarda hem de glukoneogenez, üregenez, lipogenez gibi çeşitli fizyolojik proseslerde için önem arz etmektedir (7). Sitozolde ve mitokondride bulunan CA izoenzimlerinin, yağ asidi sentezinde asetil CoA'yı yağ asitlerinin yapı taşı olan malonil-CoA'ya dönüştürmek için gerekli bikarbonat iyonununu sağladığı ileri sürülmüştür (7, 8). *De novo* lipogenezin mitokondride gerçekleşen piruvatın okzaloasetata dönüşüm basamağı, bikarbonat ve piruvat karboksilaz varlığında gerçekleşir ve bu tepkime için gerekli olan bikarbonat CA VA ve/veya VB tarafından sağlanır. Asetil CoA karboksilaz basamağında asetil CoA'dan malonil CoA eldesi için gerekli olan bikarbonat ise CA II ve/veya CA III tarafından sağlanmaktadır (9, 10).

Literatürde *de novo* lipid sentezinde BDNF ile karbonik anhidraz enzimleri arasında bir ilişki olup olmadığını gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Biz de bu amaçla çalışmamızda *de novo* lipid sentezinde özellikle kilit rol oynayan enzimlere bikarbonat

kaynağı olan karbonik anhidraz enzimleri ile BDNF arasındaki ilişkiyi farelerin karaciğer ve yağ dokuları üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır.

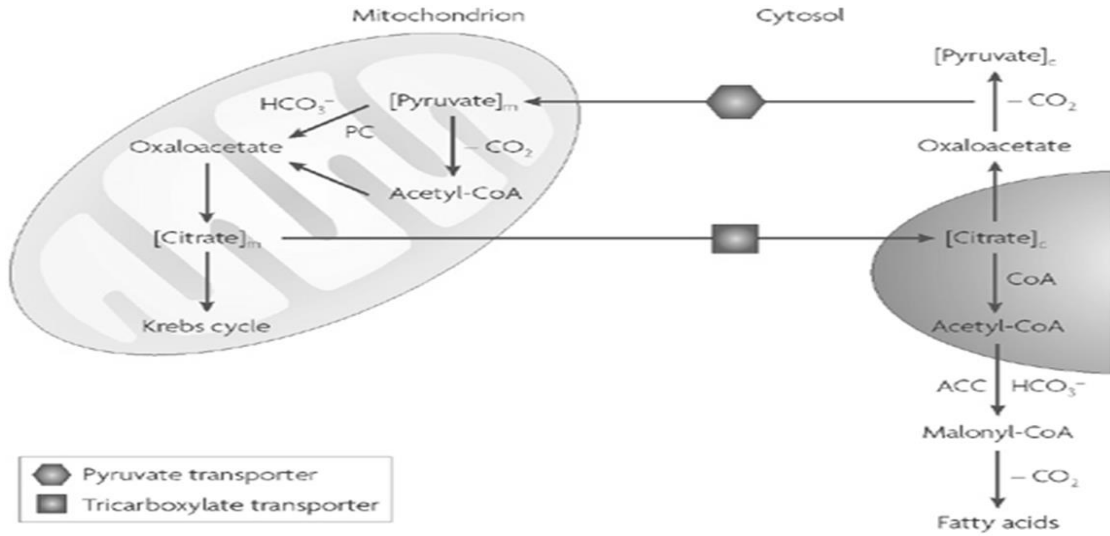


4. GENEL BİLGİLER

4.1. *De Novo* Lipogenez

De novo lipogenez, diyetle alınan fazla miktardaki enerjinin yeni yağ asitlerine dönüşümünü ifade eder. Endojen proses olan *de novo* lipogenez temelde tüm hücrelerde meydana gelir fakat adipoz doku ve karaciğer dokusu başlıca oluşum yerleridir. Kompleks bir metabolik yol olan bu proses obezite başta olmak üzere çeşitli karaciğer hastalıkları, metabolik sendrom, kanser, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patogeneze de ilişkili olduğu görülmüştür. Lipogenezin düzenlenmesi diyet, enzimatik ve hormonal yolla gerçekleşir (1).

Yağ asitlerinin *de novo* biyosentezi sitoplazmada gerçekleşir. Yağ asidi sentezi, substratların bulunuşu (asetil CoA ve glukoz metabolizmasından oluşan NADPH) ve astil CoA karboksilazın aktivasyonu ile gerçekleşir. Mitokondride oluşan asetil CoA'nın yağ asidi sentezine katılabilmesi için sitozole geçmesi gerekir. Asetil CoA, mitokondriden sitozole doğrudan geçemez bir mekik mekanizması vasıtasıyla geçer. Piruvatın okzaloasetata dönüşümü ise bikarbonat ve piruvat karboksilaz enzimi varlığında gerçekleşir. Bu tepkime için gerekli olan bikarbonat CA VA ve/veya VB tarafından sağlanır. Mitokondri membranı okzaloasetat ile birleşip sitratı oluşturmak için gerekli olan asetil CoA için geçirgen değildir. Sitrat trikarboksilik asit taşıyıcısı ile sitoplazmaya taşınır ve burada sitrat liyaz enzimi ile tekrar okzaloasetat ve asetil CoA'ya dönüşür. Mitokondri membranı okzaloasetata geçirgen olmadığı için tekrar piruvata dekarboksilasyonla dönüşür ve piruvat taşıyıcısı ile mitokondriye alınır. Daha sonra okzaloasetat malata indirgenir ve malat dikarboksilat taşıyıcısı ile mitokondriye taşınabildiği gibi sitoplazmada malik enzim tarafından piruvat ve CO₂'ye de dönüşebilir ve oluşan piruvat da mitokondriye geçer. Sitozolde oluşan asetil CoA ise asetil CoA karboksilaz ve bikarbonat varlığında malonil CoA'yı oluşturur. Bu reaksiyon için gerekli bikarbonat ise başlıca CA II enzimi olmak üzere kısmen de CA III enzimi ile sağlanır (11, 12). Doymuş uzun zincirli yağ asitlerinin sentezi oluşan bu malonil CoA ve asetil CoA'ların kondensasyonu sonucu gerçekleşir. Yağ asidi sentezinin başlıca ürünü palmitattır (1).



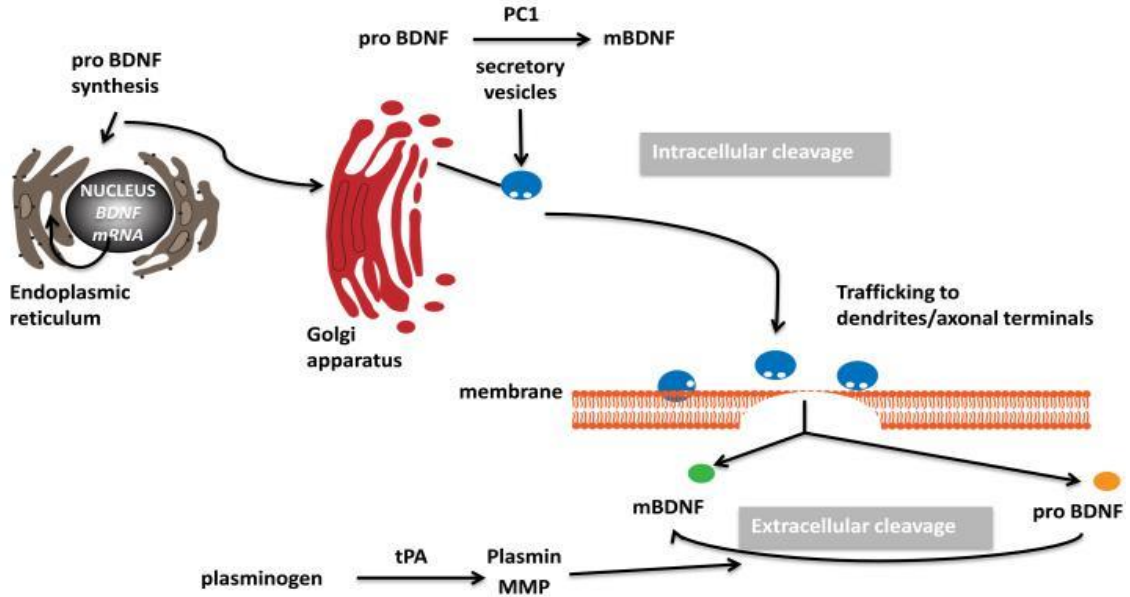
Nature Reviews | Drug Discovery

Şekil 1. Yağ asidi biyosentezinde karbonik anhidraz izoenzimlerinin rolü (Supuran'dan, 13) ACC: Asetil CoA karboksilaz PC: Piruvat karboksilaz

4.2. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)

BDNF omurgalılarda merkezi ve periferel sinir sisteminin gelişiminde, devamlılığında ve plastisitesinde önemli rolleri olan nörotrofin (NT) ailesinin tanımlanan ikinci üyesi olup, ilk kez domuz beyin dokusundan izole edilmiştir (2).

BDNF proteini dimerik pre-proBDNF protein şeklinde sentezlenir daha sonra ileri işlemler sonucu olgun ve aktif formu olan yaklaşık 14 kDa'luk olgun BDNF (mBDNF: mature BDNF) oluşur (2). Öncül pre-proBDNF endoplazmik retikulumda öncül dizisinin kesimi sonucu 32 kDa'lık proBDNF olarak golgi aygıtı aracılığıyla trans golgi ağına (TGN) ve golgi cisimciğine hareket eder. proBDNF intrasellüler alanda furin ya da pro-konvertaz enzimleri tarafından kesilerek ya da proBDNF olarak salındıktan sonra ekstrasellüler alanda metalloproteinaz ve plazmin gibi proteazlarla kesime uğrayarak 14kDa'luk BDNF'yi meydana getirir (Şekil 1) (2).

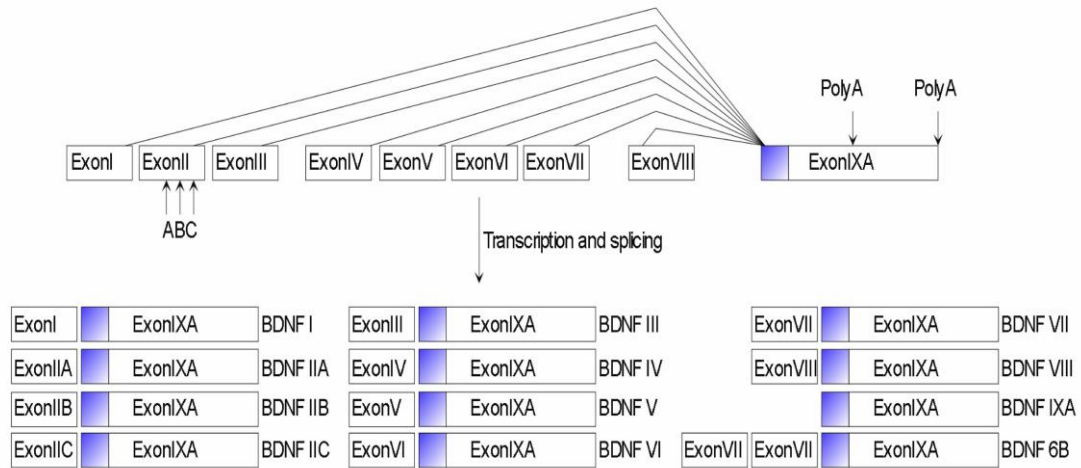


Şekil 2. BDNF'nin üretimi ve salgılanma mekanizması (Marosi'den, 3)
PC1: Prohormon konvertaz-1 enzimi tPA: Doku plazminojen aktivatörü
MMMP: Matriks metalloproteinaz

Beynin birçok bölgesinde özellikle de öğrenme, hafıza ve yüksek bilişsel fonksiyonların gerçekleştiği hipokampus, korteks, serebellumda en yüksek seviyede salındığı bilinmektedir (3, 14).

Ayrıca birçok dokuda da timus, karaciğer, dalak, adipoz doku, böbrek, prostat, mide, trake, iskelet kası, endotel hücreleri, ince bağırsak, retina, kalp, akciğer ile immun sistemde lenfositlerden, trombositlerden lökositlerden, monositlerden, T ve B hücrelerinde sentezlenmektedir (15). Serum BDNF miktarının büyük bir kısmı trombositlerde depolanmıştır. Trombositler BDNF'yi üretemezler, dış kaynaklardan elde ederler ve belli bir uyarıyla salarlar. Bu sebeble trombositler insan vücudunda tek BDNF taşıma sistemi olarak gözükmemektedir. Santral sinir sistemindeki BDNF konsantrasyonu ile serum BDNF konsantrasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğuna dair kanıtlar vardır. Trombositlerdeki BDNF, kan-beyin bariyerini geçerek santral sinir sisteminden gelir. Trombositlerden salınabilen BDNF miktarının serumdaki BDNF miktarını yansıttığı düşünülmektedir (16).

BDNF gen kodları balıklarda, amfibilerde, sürüngenlerde ve memelilerde bulunmuştur. *BDNF* geni insanda 11p 14.1 lokalizedir ve 247 aminoasitlik bir proteini kodlar (2, 17).



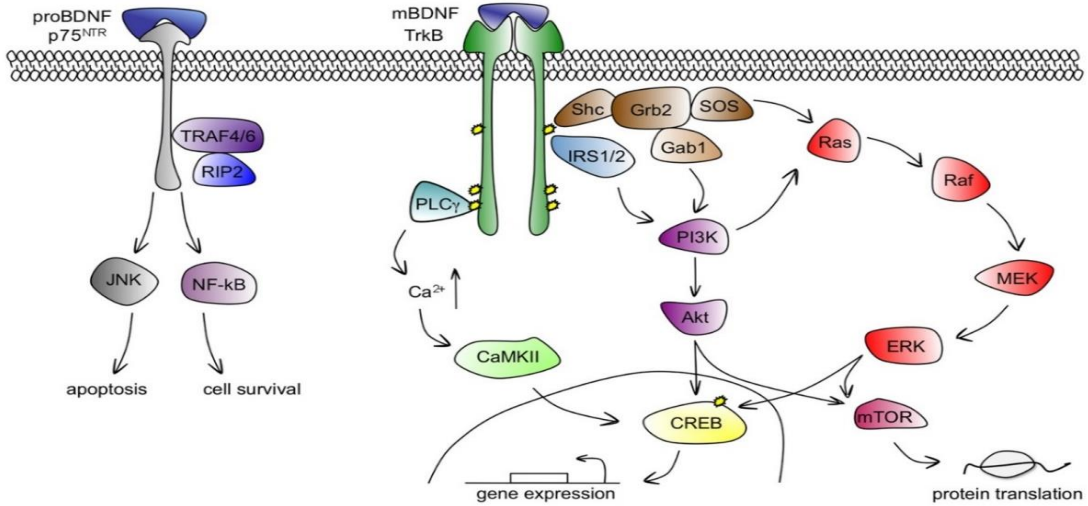
Şekil 3. Fare ve rat BDNF genlerinin yapısı ve transkriptleri (Cunha'dan, 2)

BDNF geni; protein sentezini denetleyen, promotör elementlerine sahip sekiz kısa 5' eksona (ekson I-VIII) ve olgun *BDNF* proteinini kodlayan bir tane 3' (ekson IX) eksona sahiptir. Promotörlerin alternatif kullanımı ve splicing mekanizmaları ile farklı promotör ve transkriptler oluşmaktadır (Şekil 2). Ekson 4; en çok akciğer ve kalpte eksprese olurken, ekson 1, 2, 3 transkriptleri en çok beyinde bulunur. Ekson 3 içeren transkript, hipokampus ve kortekste nöronal aktivite kontrolünde önemli etkiye sahiptir (2, 18).

Hormonlar, bazı noröpeptidler ve uyarıcı sinaptik aktivatörler tarafından BDNF salınımı ve ekspresyonu stimüle edilir. Uyarıcı sinapslardan açığa çıkan glutamat sinaptik membran üzerindeki reseptörlerine bağlanır ve α -amino-3-hidroksi-5 metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) resöptörler, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörler ve voltaj bağlı Ca^{+2} kanalları vasıtasıyla Na^{+} and Ca^{+2} iyonlarının girişi sağlanır. Ca^{+2} iyonu ise Ca^{+2} -kalmodulin-bağlı protein kinazları (CaMK), protein kinaz C ve mitojen aktiviteli protein kinazları (MAPK) aktive eder. Bu aktivasyon ise BDNF gen transkripsiyonunu indüklemek için siklik AMP yanıt bağlayıcı protein (CREP) ve nükleer faktör κB (NF- κB) transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Olgun BDNF sinaptik aktivite ile stimüle edilen protein translasyonunun gerçekleştiği dendritlerde yer almaktadır. Lokal BDNF üretimi ve salınımı, sinaptik partner nöronlar veya diğer yakın hücrelerdeki BDNF'nin yüksek afiniteli reseptörü TrkB veya düşük afiniteli reseptörü p75NTR'yi aktive eder ve bu reseptörlere bağlı şekilde hücre içine alınır (2).

4.2.1. BDNF Reseptörleri

BDNF, TrkB ve p75NTR adlı iki farklı transmembran reseptör ile etkileşir (Şekil 3). BDNF, TrkB ile yüksek etkileşim, p75NTR ile ise düşük etkileşim halindedir (2).



Şekil 4. BDNF reseptörleri ve ilişkili oldukları sinyal iletim yolları (Cunha'dan, 2)

4.2.1.1. Pannörotrofin Reseptör (p75NTR Reseptörü)

p75NTR tümör nekroz faktör (TNF) süper ailesinin bir üyesidir. Nörotrofinlerin bu reseptöre bağlanması nükleer faktör-kB, Jun kinaz gibi sinyal iletim yollarıyla ilişkilidir. Ekstrasellüler kısmı dört adet negatif yüklü sistein tekrarına sahiptir, üçüncü ve dördüncü tekrarlar glikozillenmiş ekstrasellüler ligand bağlanma bölgesini oluşturur. İntrasellüler kısmı ise apoptozu teşvik eden 'ölüm' bölgesi içerir (18).

p75NTR, proBDNF ve olgun BDNF'nin her ikisine de bağlanabilme yeteneğine sahiptir ve diğer birçok proteinle etkileşime girerek nöron gelişimi, çoğalma ve hücre ölümü gibi hücrel olaylarda önemli rol alır. p75NTR'nin sortilin ile etkileşimi ve proBDNF'ye bağlanması nöronal apoptozu teşvik eder (2).

4.2.1.2. Tropomiyozin Reseptör Kinaz (TrkB Reseptörü)

Farklı sinyalizasyon yeteneklerine göre üç farklı TrkB reseptörü tanımlanmıştır. TrkB.FL tam boy katalitik reseptör ve kesime uğramış iki izoformu; TrkB.T1 ve TrkB.T2. Kesime uğramış izoformlar intrasellüler tirozin kinaz aktivitesine sahip değildir fakat farklı biyolojik cevaplara karşı sinyal oluşturabilirler. TrkB.FL birçok tanımlanmış sinyal yolağıyla ilişkili olan, iyi korunmuş bir intrasellüler kısım içeren

transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. BDNF TrkB ile bağlandığında öncelikle reseptör dimerizasyonu olur ve kinaz aktivasyonu sonucu tirozin rezidülerinden otofosforilasyona uğrayarak p85 (PI-3 kinazın katalitik olmayan altbirimi), Shc gibi hücre içinde hedef proteinlere özel bağlanma bölgesi oluşur. Sitoplazmik kısımdaki tirozin fosforillenmesi üç önemli yolağı aktiveleştirir. Bunlar MAP kinaz yolağı (nöronal farklılaşma, nörit gelişimi), PI-3 kinaz yolağı (hücre sağ kalım), PLC yolağı (sinaptik plastisite)'dir (18).

4.2.2. BDNF Geni ve Obezite

BDNF proteininin nörolojik gelişim, sinaptik iletim, öğrenme ve hafızadaki rolünün ötesinde, vücut ağırlığının kontrolü ve enerji hemeostazı için de gerekli olduğu belirlenmiştir (3). Hipotalamusta nöronların kümeleşmesi ile oluşan nükleus bölgeleri bulunmaktadır. Bu bölgelerden biri olan VMN (ventromedial nükleus) beyinde tokluk merkezi olarak bilinir ve bu bölge BDNF'nin sentezlendiği bölgelerden biridir. BDNF ayrıca Arc (arkuat nükleus) denilen ve periferdeki besin alımının regüle edildiği bölge ile de ilişkilidir. Bu bölgede etkin olan ve iştah baskılayıcı etkisi olan melanokortin sistemi ile etkinliğini gösterir. Melanosit uyarıcı hormon, VMN'deki MC4R (melanokortin 4 reseptörü) reseptörüne bağlanarak bu bölgedeki iştah azaltıcı etkisini gösterir. VMN'deki BDNF ekspresyonunun da arttığı bilinmektedir (19).

BDNF sadece merkezi sinir sistemin üzerinden değil periferdeki birçok organ ve sistem üzerinden de enerji metabolizmasını düzenler. İnsanlarda iskelet kasında egzersizle BDNF seviyesi artmakta fakat bu BDNF dolaşıma katılmamaktadır. BDNF, AMPK yolu ile kas hücrelerine spesifik asetil CoA izoenzimi olan ACC 1 fosforilasyonunu sağlayarak lipid oksidasyonunu teşvik eder (3).

BDNF'nin termogenez üzerine de etkileri mevcuttur. PGC1 (peroksizom proliferatör reseptör gama koaktivatör 1) üzerinden beyaz yağ dokusunun kahverengi yağ dokusuna dönüşümünü indükler. Ayrıca PGC1 upregülasyonu sonucu daha fazla ATP üretimi de sağlanmış olur. Ayrıca hipotalamik BDNF uygulaması sonucu uncoupling protein-1 ekspresyonunu arttırarak termogenezi indüklediği ve vücut sıcaklığını arttırdığı belirlenmiştir (3).

BDNF, periferdeki birçok dokuyu etkileyerek glukoz metabolizmasını düzenler. Pankreasta beta hücrelerini etkileyerek insülin üretimini, iskelet kasında ise insülin

duyarlılığını arttırırken hepatositlerde glukoz alımını azaltmaktadır. Ratlarla yapılan bir çalışmada ise BDNF'nin rat beynine infüzyonunun portal vende glukagon seviyesini azalttığı ortaya çıkarılmıştır (3).

BDNF etkilerinin daha ayrıntılı olarak incelenebilmesi amacı ile deneysel hayvan modelleri oluşturulmaktadır. BDNF proteinini kodlayan iki alelden biri silinerek yerine memeli genomunda bulunmayan neomisin geni yerleştirilen fare modelinde pek çok beyin bölgesinde BDNF ekspresyonu yarı oranında azalmıştır (BDNF heterozigot knockout (+/-)). BDNF homozigot (-/-) knockout fareler ise sinir sistemindeki gelişimsel defektler sonucu doğumdan kısa süre sonra ölmeleri nedeniyle deneysel amaçlı kullanılamayan fare modelidir. Hem BDNF heterozigot knockout (+/-) hem de BDNF homozigot (-/-) knockout farelerde çeşitli defektler meydana gelmektedir. Bunlar hiperfaji, obezite, diyabet ve anksiyetik bozukluklarla ilgili olabilmektedir (20).

BDNF heterozigot farelerle yapılan çalışmalarda bu farelerde kilo artışı bazen de yeme davranışlarında bozukluklar görülmüş ve BDNF ile obezite arasındaki ilişki ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada BDNF heterozigot farelerde insülin seviyesinde artış görülmüştür (3, 21). Gotoh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise rat beynine BDNF infüzyonu ile portal vende glukagon seviyesinde azalma tespit etmişlerdir (22). Son yıllarda BDNF seviyesinin insülin, glukagon ve kan şekeri düzeylerine etkisi sebebiyle diyabet hastalığı tanısında kullanılabileceğini öne süren çalışmalar da mevcuttur (23).

4.3. Karbonik Anhidraz Enzimi ve Genel Özellikleri

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1, karbonat hidrolizaz) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan, aktif bölgelerinde çinko ihtiva eden ve başlıca beş farklı gen ailesi (α , β , γ , λ , ϵ) tarafından kodlanan metaloenzimlerdir (5, 6). Memelilerde şu ana kadar keşfedilen bütün izoenzimler alfa sınıfına aittir. Memeli dokuları içerisinde en fazla eritrositlerde, kaslarda ve karaciğerde bulunur. Alfa sınıfı için yapılan X-ışını kristalografik verilerine göre, aktif merkez yarığının 15 Å derininde çinko metal iyonu yer almaktadır ve üç histidin birimi (His 94, His 96 ve His 119) ve bir su molekülü/hidroksit iyonu ile koordine halindedir. Bitkilerin tamamı bu enzimin beta sınıfını bulundururken prokaryotlar alfa, beta ve gama sınıfları olmak üzere her üç sınıf enzimi de kodlarlar. Yapısında 259-260 aminoasit dizisi içeren bu enzim, 29-30 kDa

molekül ağırlığına sahiptir (24). Karbonik anhidraz enzimi, karbondioksit (CO₂) hidrasyonu ile bikarbonat iyonunun (HCO₃⁻) dehidrasyon reaksiyonunun dönüşümlü katalizinden sorumludur (Şekil 4) (8).



Şekil 5. Karbonik anhidraz enziminin dönüşümlü reaksiyonu (Şentürk'ten, 8)

Başlangıçta karbondioksitin dokulardan kana bikarbonat olarak taşınmasında gerekli olan bir enzim olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise karbonik anhidraz aktivitesinin; pH regülasyonu, karbondioksit homeostazı, solunum, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu gibi olaylarda hem de glukoneogenez, üregenez, lipogenez gibi çeşitli fizyolojik proseslerde önem arz ettiği görülmüştür. Bunun yanında enzimin sentezi ve aktivitesinde meydana gelen bozukluklar bazı hastalıkların etiyolojisinde önemli bir rol alabileceği bildirilmiştir. Bu özellikleri CA izoformlarını; kanser, glokom, epilepsi, obezite gibi çeşitli hastalıklar için tedavisel hedefler haline getirmiştir. Dolayısıyla, yeni ve gelişmiş tedaviler için izoform çeşitlerine spesifik inhibitörlerin dizaynı üzerine çeşitli çalışmalar yapılmakta ve bu çalışmalar gittikçe önem kazanmaktadır (7).

İnsanlarda hücrel yerleşimi ve doku dağılımı farklı 16 α -izoenzim izole edilmiştir. α -CA izoenzimleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu onaltı izoenzimden beş tanesi CA I, II, III, VII, XIII sitozolik, beş tanesi CA IV, IX, XII, XIV, XV membrana bağlı, ikisi CA VA ve CA VB mitokondriyal, bir tanesi ise CA VI salgısal formdadır. Bunlara ek olarak; üç tane CA VIII, X, XI katalitik özelliği olmayan ve CA ilişkili proteinler (CARPs) olarak adlandırılan izoenzimleri de mevcuttur. Katalitik olarak aktif karbonik anhidrazlar özellikle aktif bölge çevresi olmak üzere yapısal olarak benzerlik gösterirler. Aktif bölge çevresindeki amino asit farklılıkları ise enzim aktivitesini etkilemektedir (25). CA ilişkili proteinler de diğer karbonik anhidraz enzimleri ile yapısal benzerlik gösterse de çinko iyonuna bağlı histidinlerin hepsini veya bir ikisini kaybetmişlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda CA ilişkili proteinlerin sinaptik fonksiyon için gerekli olan nöreksinlere bağlandığı ve bu proteinlerin ekspresyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (26).

Tablo 1. α -CA izoenzimleri, hidrataz aktivitesi ve hücre içi yerleşimleri (Renner'dan, 26)

Hücre içi yerleşim	İzoenzim	$K_{kat} (x10^5) (s^{-1})$	Görevi	Başlıca doku dağılımı
Sitozolik	I	2	Solunum Asid/baz homeostazı	Kolon, göz, adipoz doku, kan hücreleri, ter bezleri
	II	14	Solunum Asid/baz homeostazı	Yaygın
	III	0.1	Metabolizma Oksidatif hasar Kanser	Adipoz doku, iskelet kası, karaciğer
	VII	9.5	Oksidatif hasar Kasılma nöbetleri	Beyin, kolon, karaciğer ve iskelet kasları
	XIII	1.5	Bilinmiyor	Akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kasları, bağırsaklar, üreme organları
Sitozolik (CARPs)	VIII	---	Motor fonksiyon Kanser proliferasyonu	Beyin
	X	---	Merkezi sinir sistemi	Merkezi sinir sistemi
	XI	---	Merkezi sinir sistemi Kanser proliferasyonu	Merkezi sinir sistemi
Membran ilişkili	IV	11	Solunum Merkezi sinir sisteminde asit baz dengesi Sperm motilitesi Gastrik homeostaz	Akciğer Böbrek
	IX	3.8	Kanser proliferasyonu Hipoksi	Mide, kolon, pankreas
	XII	4.2	Hipoksi Kanser proliferasyonu Sıvı homeostazı	Böbrek
	XIV	3.1	Merkezi sinir sisteminde asit baz dengesi Fotoreseptör sinyalizasyonu	Beyin ve göz
	XV	4.7	Bilinmiyor	Böbrek
	VA	2.9	Üregenez Lipogenez Glukoneogenez	Karaciğer, iskelet kasları, böbrek
Mitokondrial	VB	9.5	Üregenez Lipogenez Glukoneogenez	Yaygın
Salgılanan	VI	3.4	Diş çürümesi Tat algılama	Tükrük bezleri

4.3.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

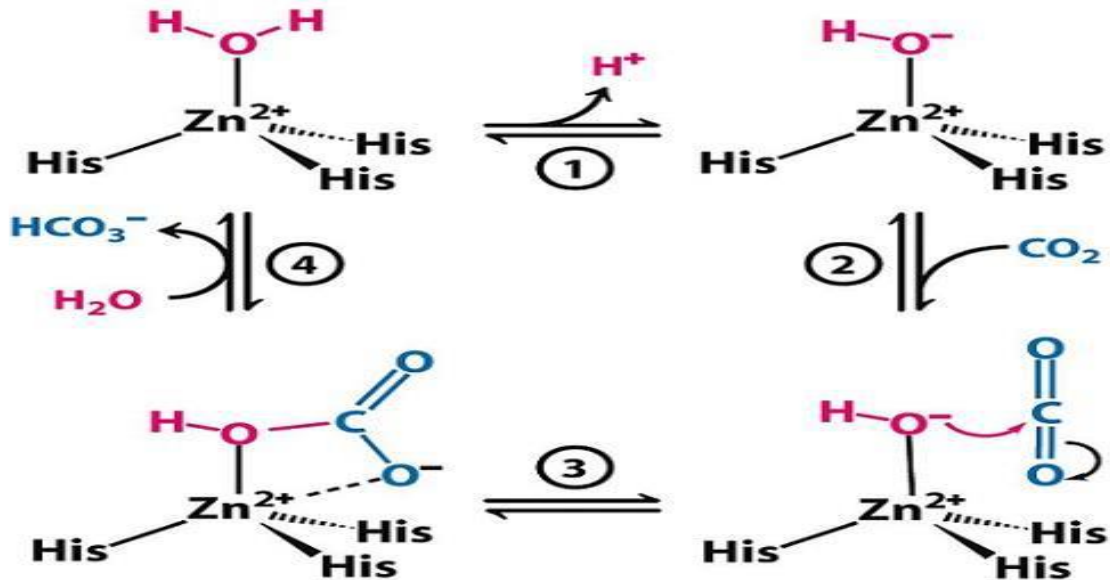
Karbonik anhidraz enziminin reaksiyon katalizinde Zn^{2+} iyonunun büyük önemi vardır. Çinko iyonuna bağlı su molekülünün yaptığı etkileşimler bu molekülün nükleofilikliğini artırmakta ve hidroksit iyonu oluşmasını sağlayan proton çıkışı kolaylaştırmaktadır. Bu tepkime mekanizması Şekil 5'teki gibi gerçekleşmektedir.

1. Zn^{2+} iyonuna, hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu meydana gelir. Daha sonra karbondioksit substrat olarak enzimin aktif bölgesine bağlanarak hidroksit iyonu ile tepkimeye girecek hale gelir.

2. Hidroksit iyonu CO_2 'e saldırarak HCO_3^- iyonunu oluşturur.

3. HCO_3^- 'in salınımı ve bir diğer su molekülünün bağlanmasıyla katalitik bölge ilk haline dönüşür.

4. Çinko iyonuna su molekülünün bağlanmasıyla enzimin inaktif formu oluşur bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar, protonun salınımını kolaylaştırır ve su molekülünün diğer reaktiflerin yakın bölgesine yerleşmesini sağlayarak geçiş halini uyarır. Enzimin tekrar temel haline dönmesi reaksiyonun hız belirleyici basamağıdır (27).



Şekil 6. Karbonik anhidraz enzimi hidrataz aktivitesinin mekanizması (Berg'ten, 27)

4.4. CA II

Daha önceleri elektroforetik mobilitesine göre CA C olarak da isimlendirilen CA II, üzerinde en çok çalışma yapılan karbonik anhidraz izoenzimidir. Karakteristik olarak eritrositlerden saflaştırılan CA II, yaygın doku dağılımına sahiptir. Eritrositlerde hemoglobinden sonra en fazla bulunan protein CA I olmasına karşın hücresel solunumun sürdürülebilmesi için CA II'nin daha kritik rolü olduğu gösterilmiştir. CA II eksik insanlarda pH dengesi ve solunumla ilgili çeşitli hastalıklar ortaya çıkarken CA I eksik kişilerde herhangi bir hastalık görülmemiştir. CA I eksikliği çeşitli moleküler yollar veya diğer karbonik anhidrazlarca telafi edilirken aynı durum CA II için geçerli değildir. CA II eritrositlerde, trombositlerde, kemikte osteoklastlarda, beyinde oligodendrositler ve beyin epitelyumunda, gözde lensler ve retina müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrek interkalate hücreleri, düşük seviyede proksimal tüp, henle kulpu ve toplama kanallarında, salgı bezlerinde asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterus endometriumunda, endotel hücrelerde, spermatozoada yoğun olarak sentezlenir. Bu izoenzimin eksikliğinde renal tubuler asidoz, osteopetrozis cerebral kalsifikasyon ile sonuçlanan 'CA II eksikliği sendromu' tanımlanmıştır. Dolayısıyla bu izoenzimin kemik, böbrek ve beyindeki önemi büyüktür (8).

Rodentlerde CA II sentezi seksüel dimorfizme bağlı olarak değişmektedir. Bir başka ifade ile CA II ekspresyon seviyesi erkek ve dişi eşeyler arasında farklılık göstermektedir. Bu izoenzimin sentezi rat karaciğerinde testesteron tarafından inhibe edilirken östrojen tarafından aktive edilir. Bu regülasyon CA III izoenzimi için tam tersi şekilde gerçekleşmektedir yani testesteron tarafından aktive edilirken östrojen tarafından inhibe edilmektedir. Dolayısıyla bu enzimlerin sentez seviyeleri erkek ve dişi rat karaciğerlerinde farklıdır. Cinsiyet nedeniyle sentez farkı CA III için yaklaşık 10-20 kat iken CA II için 3 kat kadardır. Fakat hem dişi hem erkek ratların karaciğerlerinde total karbonik anhidraz aktivitesi aynıdır. Bu durum rat karaciğerinde CA II ve CAIII izoenzimlerinin total karbonik anhidraz aktivitesini sabit tutmak için bir çeşit feedback mekanizması sergileyebileceklerini göstermektedir. Ayrıca büyüme hormonunun da CA II sentezi üzerinde etkili olduğu rat karaciğerinde görülmüştür. Dişi ve erkek ratlara büyüme hormonu verilmesi sonucu erkek ratların karaciğerinde CA II sentezi artarken CA III sentezi azalmış dişi ratlarda ise kontrol grubuna göre bir değişiklik gözlenmemiştir (28).

CA II, karbondioksit hidratasyonunu dönüşümlü olarak katalizlemesine ek olarak sitoplazmik pH dengesini sağlamak için klorür/bikarbonat taşıyıcısı (AEI), sodyum/bikarbonat taşıyıcısı (NBC1) ve sodyum/ hidrojen değişimcisi (NHE1) gibi çeşitli membrana bağlı taşıyıcılar ile etkileşim içindedir. Geçici yapısal-fonksiyonel kompleksler olan bu metabolonlar insan patolojilerinde de rol oynayabilirler. CA II ve NHE1, AE3 arasındaki etkileşimlerin kardiyomiyosit hipertrofisine dahil olması bu duruma örnek olarak gösterilebilir (7).

CA II yağ asidi sentezinde de rol almaktadır. Asetil CoA karboksilaz basamağında asetil CoA'dan malonil CoA eldesi için gerekli olan bikarbonat hücre sitozolünde CA II tarafından sağlanmaktadır (9).

4.5. CA III

CA III, ilk kez 1979'da insan iskelet kasından saflaştırılmış çok düşük aktiviteli sitozolik karbonik anhidraz izoenzimidir. Total protein içeriğinin %1-2'sini oluşturarak iskelet kasında bol miktarda bulunur. Yağ dokusu, karaciğer ve yavaş kasılan iskelet kası fiberlerinde (tip I lifler) bol miktarda; tükürük bezleri, uterus düz kas hücreleri, akciğer, böbrek, kolon, eritrositler, prostat ve testislerde ise düşük miktarda eksprese olmaktadır (7). CA III, sıçan yağ dokusunda total sitozolik proteinlerin %24'üne karşılık gelerek seviyesi en yüksek protein olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna karşın obez fare adipositlerinde ve karaciğerde kontrol grubuna göre daha düşük CA III seviyesi tespit edilmiştir. Obez ratların CA III mRNA seviyeleri kilo alıp verme ile değişmektedir. İskelet kasında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum CA III ekspresyonunun leptin tarafından azaltılıp insülin tarafından artırılarak düzenlendiğine kanıt olarak gösterilmiştir. Ayrıca son yapılan çalışmalarda CA III'ün adipogenezde PPAR γ 2 (peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama 2) gen ekspresyonunu düzenlediği de öne sürülmüştür. PPAR γ 2, prekürsör yağ hücrelerinde bulunur ve adipogenezin ana regülatörü olarak rol alır (7).

CA III, yapısal olarak CA II izoenzimine oldukça benzemektedir fakat CA III'ün hidrataz aktivitesi CA II' nin sadece % 3'ü kadardır. Düşük aktivitesi aktif bölgesinde proton mekiği görevi yapan His 64'ün olmamasından ve yine aktif bölgesinde CA II' nin aksine Leu 198 yerine Phe 198 bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu farklılıklar nedeniyle CA III 'ün aktif bölgesi diğer izoenzimlere göre daha dar bir oyuk oluşturur,

sterik kısıtlama ile de aktif bölgedeki etkileşimler değişir. CA III'ün aktivite farklılığı yağ asidi sentezinde bikarbonat kaynağı olmasından ziyade hücrel olaylarda farklı rolleri olabileceğini düşündürmektedir (7, 11).

Yapılan çalışmalar CA III'ün reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olarak rol oynayabileceğini göstermektedir. Böylece özellikle bol bulunduğu iskelet kası ve karaciğer hücrelerini oksidatif hasardan korumaktadır. Oksidatif stres altında CA III'ün iki sistein rezidüsü Cys 181 ve Cys 186 disülfid bağı ile glutatyona tersinir bir şekilde bağlanır. S-glutatyonilasyon reaksiyonu olarak adlandırılan bu reaksiyon ile hücrelerin dönüşümsüz protein oksidasyonundan korunduğu düşünülmektedir. Glutasyon yokluğunda ise oksidan maddeler vasıtasıyla sistein rezidülerinin okside formları (sisteik asit veya sistein sülfonik asit) geri dönüşümsüz olarak üretilmektedir. Hücre kültürü deneylerinde ise CA III'ün aşırı ekspresyonunun hücreleri H₂O₂-indüklü apoptozisten koruduğu ve hücre proliferasyonunu indüklediği görülmüştür. CA III sentezi gerçekleşmeyen NIH-3T3 hücrelerine rat CA III cDNA'sı yerleştirildiğinde de bu hücrelerin hidrojen peroksit indüklü apoptoza direnci artmıştır. SOD (süperoksit dismutaz) knockout farelerle yapılan çalışmalarda karaciğerlerindeki CA III protein ve mRNA ekspresyonunun azaldığı aynı zamanda oksitlenmiş CA III seviyesinin de düştüğü görülmüştür (26, 11).

CA III knockout farelerle yapılan çalışmalarda büyüme, yaşam süresi, üreme potansiyeli normal olduğu gösterilmiştir. Wild tiplerle knockout farelerin serum, kas, karaciğer, ve adipoz dokularında serbest yağ asidi seviyesi aynı oranlarda olup beyin, kas ve karaciğer mRNA'larında önemli bir değişiklik görülmemiştir (26). CA III ekspresyonu beslenme ile regüle edilebilir. Beslenme ile CA III gen ekspresyonundaki değişiklik kaslara göre karaciğerde daha belirgin görülmüştür. Protein açısından fakir beslenme, kronik alkol tüketimi CA III ekspresyonunu azaltan faktörlerdendir (25, 26). Beslenme ile CA III ekspresyonundaki değişim insülin ekspresyonundaki değişim ile korele gerçekleşmektedir. Ratlara streptozotosin denilen ve pankreas adacıklarından insülin üretimini engelleyen toksik bir ilaç verildiğinde CA III ekspresyonunun azaldığı ilaç ile muamele sonrası insülin verilmesi ile de CA III ekspresyonunun normal seviyesine geri döndüğü gözlemlenmiştir. Bu çalışma CA III ekspresyonunun insülin seviyesindeki değişime cevap verdiğini kanıtlamıştır (26).

Soğuk hava şartları boyunca vücut sıcaklığını korumak için kahverengi yağ dokusunda triaçilgliserol lipolizi ve yağ asidi oksidasyonu artar. Uzun süreli soğuğa maruz kalan farelerin kahverengi yağ dokusundaki CA III mRNA seviyesi ise azalır. Bu durum CA III'ün yağ asidi oksidasyonuna karşı lipid sentezini desteklediğini göstermektedir (26).

Kas kasılması için ATP gereklidir ve kas uyarıldığında ilk ATP kaynağı fosfokreatindir. Fosfokreatin fosfat grubunu ADP'ye bağışlayarak ATP üretimini sağlar. Fakat fosfokreatin kısa süreli enerji kaynağıdır ve kasların çalışmaya devam edebilmesi için gerekli olan ATP glikoliz, oksidatif fosforilasyon, yağ asidi oksidasyonundan karşılanır. CA III knockout farelerin iskelet kaslarında yapılan çalışmada kasların dinlenme seviyesine gelme sürelerinin wild tiplere nazaran daha yavaş olduğu tespit edilmiş ve knockout farelerin fosfokreatin ATP depolarından daha uzun süre yararlandıkları görülmüştür. Bu durum CA III knockout farelerde alternatif ATP üretim yolları olan glikoliz, oksidatif fosforilasyon ve yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesinin zarar gördüğünü düşündürmektedir (26).

4.6. CA VA ve CA VB

CA V, ilk kez 1980 yılında gine domuzu karaciğeri mitokondrisinden izole edilmiştir. Daha sonra sırasıyla fare, sıçan, insan CA V cDNA 'ları klonlanmıştır. 38 amino asitlik hidrofobik N-terminal mitokondrial sinyal sekansı ve 267 amino asitlik katalitik domaini ile 305 amino asitlik uzun bir polipeptid zincirine sahiptir. İnsanda 267 amino asitlik sekans daha önce karakterize edilmiş olan karbonik anhidrazlarla (CA I- CA VII) %30-49 oranında benzerlik göstermiştir (29). CA V enziminin öncül formu 34 kDa molekül ağırlığına sahipken olgun formu 30 kDa molekül ağırlığındadır (30).

Northern Blot analizinde farelerde karbonik anhidraz V transkripti sadece karaciğerde gözlenirken Western Blot verileri ve immünohistokimyasal sonuçlarda ise daha geniş bir doku dağılımı gösterdiği saptanmıştır. EST (expressed sequence tag) olarak adlandırılan fonksiyonel gen segmentleri için oluşturulan veritabanına göre ise doku dağılımları farklı iki mitokondrial karbonik anhidraz olduğu belirlenmiştir. Bu genler farelerde *Car5A* ve *Car5B* olarak adlandırılırken insanda *CA5A* ve *CA5B* olarak adlandırılmıştır. İnsan CA VA geni 16. kromozomda CA VB geni ise kromozom X'de lokalizedir (7).

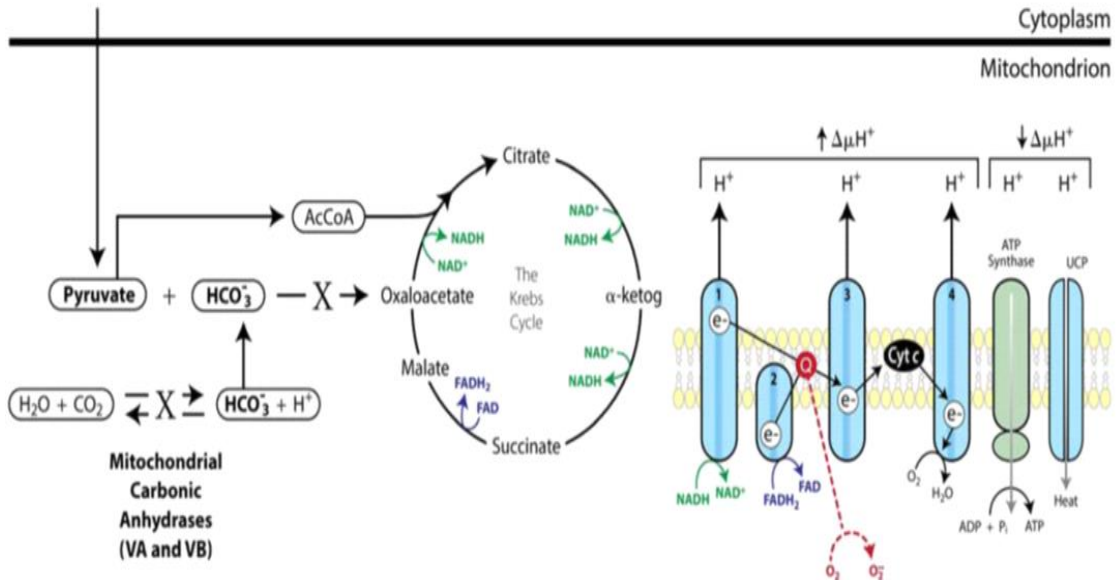
CA VA ve CA VB mitokondrial tek izoenzimler olup omurgalı ve omurgasızlarda lipogenez, glukoneogenez, üregenez gibi önemli metabolik proseslerde (Şekil 3) rol oynamaktadırlar (31).

De novo lipogenezin mitokondride gerçekleşen piruvatın okzaloasetata dönüşüm basamağı, bikarbonat varlığında ve piruvat karboksilaz enziminin katalizlediği reaksiyonla gerçekleşir. Bu tepkime için gerekli olan bikarbonat CA VA ve/veya VB tarafından sağlanır (10).

Üre siklusı, amino asitlerin yıkımından oluşan NH_4^+ 'ün karada yaşayan omurgalıların karaciğerinde üreye çevrilerek atılım şeklini oluşturur. Üre devrinin ilk reaksiyonu glutamatın oksidatif deaminasyonundan oluşan NH_4^+ 'ün CO_2 ile oluşturduğu dönüşümsüz reaksiyonudur. İki molekül ATP'nin kullanıldığı bu reaksiyon mitokondrial karbamoil fosfat sentetaz (CPS I) tarafından katalizlenir ve yüksek enerjili bir bileşik olan karbamoil fosfat oluşur. Üre devrinin hız kısıtlayıcı basamağını oluşturan bu reaksiyonda CPS I enzimi için gerekli olan bikarbonat iyonunu mitokondrial karbonik anhidraz enzimleri sağlar. Ayrıca CA VA eksikliği olan insanların kanlarında yüksek amonyak seviyesi görülmüştür (31).

Karbohidrat yapısında olmayan öncül maddelerden glukozun sentezlenmesi olayına glukoneogenez denir ve özellikle yakıt olarak en çok glukozu kullanan beyin gibi bazı dokular için çok önemli bir metabolik yoldur. Glukoneogenezin ilk basamağı olan ve aynı zamanda kontrol noktalarından biri olan piruvatın okzaloasetata çevrildiği dönüşümsüz reaksiyonda piruvat karboksilaza bikarbonat iyonunu mitokondrial karbonik anhidraz enzimleri sağlar (7, 31). Pankreas langerhans adacıklarından eksprese olan CA VA'nın insülin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynadığı da düşünülmektedir. CA VA'nın inhibitörü olan asetazolamidin glukoz indüklü insülin salgılanmasını inhibe ettiği de gözlemlenmiştir (32). Diyabet hastalığı ile ilişkili çeşitli komplikasyonlarda oksidatif stresin etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Diyabet hastalarında insülin insensitif beyin dokusuna glukoz girişi ile glukoz oksidasyonu, proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu ve glikozillenmiş proteinlerin oksidatif bozulmaları gibi nedenlerden dolayı serbest radikaller fazla bulunmaktadır. Serbest radikal oluşumuna mitokondrial karbonik anhidrazlar da dahil olur. Glikoliz sonucu oluşan piruvat, mitokondrial karbonik anhidrazlar tarafından oluşturulan

bikarbonat (mitokondri membranı bikarbonat için geçirgen olmadığından) ve piruvat karboksilaz varlığında okzalasetata dönüşür ve krebs devrine girer. Burada oluşan yüksek miktardaki elektron donörleri, elektron taşıma sisteminde elektronlarını oksijene verirken mitokondri matriksine pompalanan protonlar sayesinde çok daha yüksek bir membran potansiyeli oluşur. Bunun sonucunda elektron transportu kompleks III'te inhibe olur. Elektronlar kompleks IV'te oksijene transfer olup su molekülü oluşturmak yerine koenzim Q basamağında oksijene transfer olup süperoksit radikali oluştururlar (Şekil 6). Diyabetik hastalarda yapılan çalışmada güçlü bir mitokondrial karbonik anhidraz inhibitörü olan topiramatin serebral hiperglisemi indüklü perisit kaybını önlediği, kan beyin bariyer bütünlüğünü sağlandığı ve böylece antiinflamatuvar etkinin görüldüğü belirtilmiştir (32).



Şekil 7. Glukozun oksidatif metabolizması ve süperoksit üretiminde mitokondrial karbonik anhidrazların rolü (Shah'dan, 32)

CA VA ve CA VB enzimlerinin metabolizma üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak görebilmek için knockout fare modelleri oluşturulmuştur. CA VA knockout farelerde wild tiplere nazaran hastalıklı yavru doğumu, kilo kaybı ve yüksek amonyak seviyesi gözlenirken CA VB knockout farelerin fenotipinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. CA VA/B double knockout farelerde açlık kan şekeri artışı ve büyüme geriliği görülmüştür. Dolayısıyla CA V double knockout farelerde fenotipteki değişiklik daha fazla gözlemlenmiştir. Böylece CA VA'nın üregenez ve glukoneogenez gibi metabolik olaylarda temel fonksiyonlu enzim olduğu öne sürülmüştür (31).

4.7. Piruvat Karboksilaz

İlk kez 1959 yılında Merton Utter tarafından keşfedilen piruvat karboksilaz (EC 6.4.1.1), ligaz sınıfı bir enzim olup piruvatın ATP-bağımlı karboksilasyonunu dönüşümsüz olarak katalizleyerek okzaloastet oluşumunu sağlar. Bu enzim dört alt birimden oluşmaktadır ve bu alt birimler yaklaşık 120-130 kDa ağırlığındadır. ve her bir alt birim biyotin karboksilasyon domaini, transkarboksilasyon domaini ve biyotin karboksil taşıyıcı domain olmak üzere üç fonksiyonel domain içerir. Ökaryotik dokularda ve birçok prokaryotik türde yaygın olarak bulunan bu enzim biyotin prostetik grubunu içerir ve allosterik düzenleyici olarak asetil CoA yanında magnezyum veya manganez gerektiren bir enzimdir. Memelilerde ekspresyonu doku spesifik davranış göstermektedir ve en yüksek aktiviteye karaciğer ve böbreklerde sahiptir. Piruvat karboksilaz katalitik etkinliği için gerekli olan biyotin enzimin aktif bölgesinde bulunan özel bir lisin yan zincirine amid bağıyla kovalent bağlıdır ve bu hal biositin olarak tanımlanan enzimin aktif halini oluşturur (33).

Biotin birçok karboksilaz tepkimesinde kilit rol oynamaktadır. Tek karbonlu grupların en yaygın oksitlenmiş formu olan karbondioksitin özgülleşmiş taşıyıcısıdır. Karboksil grupları, ATP'nin yer aldığı ve CO₂'nin enzime-bağı biyotine katıldığı bir tepkimeyle aktive edilir. Bu aktive edilmiş CO₂ daha sonra bir karboksilasyon tepkimesinde bir alıcıya (burada piruvat) geçer (33, 34).

Piruvatın karboksillenmesi iki basamakta yürür: İlk adım karbondioksitin ATP'ın üçüncü fosfat grubu ile fosforillenip karbonil fosfat bileşiğinin oluşumunu ve böylece karbondioksitin aktive edilmesini içerir. Burada bikarbonat oksijenlerinden biri bir nükleofilik saldırı ile ATP'den fosfat grubunu koparır ve oluşan karbonil fosfat bileşiği daha sonra biyotin ile N-karboksibiyotini oluşturur. Bu yapı karbondioksitin kararlı bir halidir. Enzimin aktif bölgesinde bulunan piruvat metil hidrojenlerinden biri yine aktif bölgedeki özel bir zayıf bazik grup yardımıyla kopararak enolat şeklindeki karbanyona dönüştürülür. Karboksil grubunun piruvata enzimatik olarak eklenmesi enerji gerektirir, bu da ATP ile sağlanır. Karboksil grubunun piruvata atak yapması için gerekli olan serbest enerji, yaklaşık olarak ATP'den elde edilen serbest enerjiye eşittir. Son aşamada ise karbanyon N-karboksibiyotinin karboksil karbonuna saldırarak okzaloasetat oluşur (33, 34).

Piruvat karboksilaz tarafından üretilen okzalasetat; glukoneogenez (karaciğer ve böbrek korteksinde), *de novo* yağ asidi sentezi (karaciğer, adipoz doku ve meme bezi) ve glial hücrelerde nörotransmitter madde sentezi gibi çeşitli biyosentetik yollarda faydalanılan önemli bir aracı moleküldür (34).

Bu enzimin ekspresyonu transkripsiyonel olarak da düzenlenmektedir. Karaciğerde PPAR α , karaciğer X reseptör, CREB tarafından adipoz dokuda ise PPAR γ tarafından ekspresyonu düzenlenebilmektedir (34). Uzun dönemde bu enzimin ekspresyon seviyesi diyabet, obezite ve hipertiroidizm ile artarken, kısa dönemde aktivitesi asetil CoA ile düzenlenir. Piruvat karboksilaz aktivitesi allosterik olarak düzenlenebilir ve kendinin pozitif allosterik modülatörü olan asetil CoA'nın yokluğunda inaktiftir. Sitrik asit döngüsünün okzalasetat veya diğer herhangi bir ara maddenin eksikliği durumunda ya da sitrik asit döngüsünün bir yakıtı olan asetil CoA'nın aşırı varlığında piruvat karboksilaz tepkimesini daha çok okzalasetat oluşturmak için stimüle eder. Sonuçta döngünün sitrat sentaz tepkimesinde daha çok asetil CoA kullanılabilmesini olası kılar. Yüksek seviyedeki asetil CoA ayrıca glukoz azaldığı için yağların yıkılmaya başladığını ve bundan dolayı glukoz sentezlenebilmesi için de okzalasetat gerektiğini gösterir. Okzalasetatın metabolizasyonunu ATP seviyesi belirler. ATP fazla olursa okzalasetat glukoneogenezde az ise TCA devrinde metabolize olur. Böylece piruvat karboksilaz enzimi, amino asit sentezi veya porfirin biyosentezinde kullanılmaları durumunda TCA devri ara bileşiklerinin yenilenmeleri yani seviyelerinin sabit tutulmasında da görev alır (33, 34).

4.8. Asetil CoA Karboksilaz

Asetil CoA karboksilaz (EC 6.4.1.2), asetil CoA'nın malonil CoA'ya karboksilasyonunu katalizleyen yağ asidi sentezinin kontrol enzimidir. Memelilerde asetil CoA karboksilazın iki izoformu vardır (ACC 1 ve ACC 2). ACC2, ACC1 'den farklı olarak amino asit dizisinde 136 amino asit daha fazla içerir. ACC 1 adipoz dokuların sitozolünde bulunurken ACC 2 ise iskelet ve kardiyak kaslar gibi oksidatif dokuların mitokondrisinde mevcuttur. ACC1'in (ACC- α) molekül ağırlığı 265 kDa iken ACC2 (ACC- β) 280 kDa ağırlığındadır (35).

ACC1 *de novo* lipogenez için önem arz ederken ACC 2 yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesinde rol alır. ACC 2 ürünü olan malonil CoA yağ asitlerinin oksidasyonu

için yağ asitlerinin mitokondriye girmesinde görevli olan karnitin açıl transferaz I'in inhibisyonunu sağlar ve yağ asidi oksidasyonunu inhibe eder (36). Yağ asidi sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan asetil CoA'nın malonil CoA'ya karboksilasyonu tepkimesi, yapısında kovalent olarak bağlanmış biyotin taşıyan ve karbondioksit kaynağı olarak bikarbonatı kullanan asetil CoA karboksilaz enziminin dönüşümsüz olarak katalizlenir (37).

Bu enzimin kısa ve uzun süreli düzenlenme mekanizmaları vardır. Kısa süreli düzenlemede sitrat, enzimi aktif hale geçiren polimerizasyona, palmitoil CoA ise polimerin ayrışarak aktif olmayan monomerik hale dönüşmesine neden olur. Sitrat enzimin allosterik aktivatörü iken yolağın son ürünü olan palmitoil CoA allosterik inhibitörüdür. Kısa süreli düzenlemenin ikinci bir mekanizması geri dönüşümlü fosforilasyonla sağlanır. Epinefrin, glukagon gibi zıt etkili hormonların varlığında enzim fosforillenir, böylece inaktifleşir. İnsülin varlığında enzim defosforile edilir, bu durumda ise aktifleşir (36, 37).

Postprandial hiperglisemi sonucu insülin sekresyonu, sadece plazma glukoz seviyesini azaltmaz aynı zamanda karaciğer, yağ dokusu vb. periferel dokularda yağ asidi sentezini arttırır. Bu dokulardaki insülinin işlevi, yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda azalmaktadır (38). Bu enzimin aktivitesi ve ekspresyonu transkripsiyonel olarak da düzenlenmektedir. Transkripsiyonel düzeyde, ACC1/2 ekspresyonu ChREBP, karaciğer X reseptör, PPARs, SREBP-1, FOXO gibi transkripsiyon faktörlerince düzenlenmektedir. Glukoz, insülin ve tiroid hormonlar gibi sinyal molekülleri ACC ekspresyonunu bu transkripsiyon faktörleri vasıtasıyla etkilerler (35).

Asetil CoA karboksilaz yetmezliği sonucu, asetil CoA'ların malonil CoA'ya çevrilmesi önlenmiş olacağından, karaciğerde aşırı asetil CoA birikimi söz konusu olmaktadır. Bu durum, asetil CoA'ların asetik aside hidrolizine neden olur. Asetik asit plazmaya salınır ve aşırı miktarda asetik asit idrar ile atılır (36).

Bakteri asetil CoA karboksilazı üç farklı polipeptid alt birimine sahiptir; hayvan hücrelerinde üç aktivitenin tümü de çok işlevli tek bir polipeptidin parçasıdır. Bitki hücreleri asetil CoA karboksilazın her iki formuna da sahiptir. Her durumda, asetil CoA karboksilaz enzim molekülünün lizin amino grubu amid bağıyla kovalent olarak bağlı bir biyotin prostetik grubu taşır (37). İki kademeli tepkime, piruvat karboksilaz ve

propiyonil CoA karboksilaz tarafından katalizlenen diğer biyotin bağımlı karboksillenme tepkimelerine çok benzemektedir. Bikarbonattan (HCO_3^-) gelen karboksil grubu ATP-bağımlı bir tepkime, önce biyotine taşınır ve karboksibiyotin oluşur. Biyotin, enzime lizinin-amino grubu üzerinden bir amid bağı ile tutunmuştur. Biyotinli grup geçici bir CO_2 taşıyıcısı olarak hizmet eder; bunu, ikinci adımda, malonil CoA elde etmek üzere asetil CoA'ya aktarır. Substratların bu enzime bağlanmaları ve ürünlerin salıverilmesi spesifik bir sıra takip etmektedir (37).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasının bütün aşamalarında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler Tablo 2’te sıralanmıştır.

Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan cihazların ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka/Model
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Çalkalayıcı inkübatör	Nüve, Shel Lab/Sheldon
İnkübatör	Shel Lab, Heraeus
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R centrifuge
Santrifüj	Eppendorf 5810
Homojenizatör	OMNI-Tissue Master 125
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Electron Corporation
Thermocycle	Aplied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
Real Time PCR Cihazı	Roche Light cycler 480 II
Nanodrop spektrofotometre	Thermo Scientific
Mikrodalga fırın	Altus ALMD 171
Vorteks	IKA vortex genius 3
Jel Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat ECX-20-M
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC250-90
Elektroforez tankı	Bio-Rat Wide Mini –Sub.
PCR cover	BIoplastics, 157300
PCR plate	BIoplastics, B17489
DNAaz, RNAaz free pipet uçları	Axygen, Greiner
Otomatik pipetler	Eppendorf, Socorex

5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ile üretici firmalar Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındıkları firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Satın Alındığı Firma
Tripure RNA İsolation Reagent	Roche
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich
Dietil Pirokarbonat (DEPC)	Sigma
Kloroform	Sigma
Etanol (%75)	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Asetik asit	Sigma
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Merck
Potasyum klorür	Merck
Hidroklorik asit	Sigma
Proteinaz K	Roche
Loading dye	Sigma
Kalsiyum klorür	Merck
BDNF primeri ve Neomisin primeri	Integrated DNA Technologies

5.3. Çalışmamızda Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmamız Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’na 2015/45 protokol no’lu (Bkz. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onay Belgesi) başvurunun onaylanmasından sonra yapıldı.

Çalışmamızda kullanılan 16 adet C57BL/6J ırkı wild tip (n=8) ve BDNF heterozigot (BDNF(+/-)) (n=8) fareler Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi’nden temin edildi. Çalışmada dört aylık 20-25 g ağırlığındaki erkek fareler kullanıldı. Fareler dekapitasyona kadar temin edilen merkezde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda kontrol fare yemi ve içme suyu verilerek beslendi.

5.4. Farelerin Genotiplemesi

Çalışmamızda Korte ve arkadaşları tarafından geliştirilen BDNF heterozigot (BDNF (+/-)) transgenik fare modeli kullanıldı. Fare kuyruklarından örnekler alınıp PCR yöntemi ile genotipleme yapıldı. BDNF proteinini kodlayan iki alelden birine memeli genomunda bulunmayan neomisin geni yerleştirildiğinden neomisin geni bulunan fareler BDNF (+/-) olarak kabul edildi (BDNF heterozigot knockdown (+/-)). BDNF (+/-) farelerde neomisin geni kuyruk örnekleriyle PCR yapılarak belirlenmiştir.

Genotiplerede öncelikle farelerin kuyruklarından küçük parçalar alındı ve steril ependorflara konuldu. 20 mg/mL proteinaz K ve lizis tamponu (% 0.45 Tween 20, 500 mM KCl, 100 mM Tris, 0,1 mg/mL jelatin, %0.45 Nonidet P-40) 1/9 oranında karıştırıldı, kuyruk uçlarının bulunduğu ependorflara bu çözeltiden 200 µL eklendi ve 55 °C'lik Thermomixer'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 95 °C'de 15 dakika bekletildi. Son olarak BDNF geni ve BDNF heterozigot (BDNF (+/-)) farelerde bulunan neomisin geni için ayrı ayrı PCR karışımları hazırlandı. PCR işleminde kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilmiştir.

0.05 M Tris-HCl hazırlanışı (pH=8): 0.788 g Tris-HCl tartılıp bir miktar saf suda çözüldü. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

1mM CaCl₂ hazırlanışı: 11.098 mg CaCl₂ tartılıp bir miktar saf suda çözülüp son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

%0.45 Tween 20 çözeltisinin hazırlanışı: 45 µL Tween 20 alınarak son hacim 10 mL olacak şekilde destile su eklendi.

500 mM KCl çözeltisi hazırlanışı: 3.727 g KCl tartılıp bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

100 mM Tris hazırlanışı (pH=8.3): 1.21 g Tris tartılıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0.1 mg/mL jelatin hazırlanışı: 1 mg jelatin tartılıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

%0.45 Nonident P-40 hazırlanışı: 45 µL Nonident P-40 alınarak son hacim 10 mL olacak şekilde destile su eklendi.

Proteinaz K hazırlanışı: 0.05 M Tris-HCl, 1mM CaCl₂ 100 mL deiyonize su ile pH 8 olacak şekilde hazırlandı ve 121 °C’de 1 atm basınçta 20 dakika steril edildi. Bu hazırlanan tampon ile liyofilize haldeki proteinaz K’dan 20 mg/mL hazırlandı.

Tablo 4. Genotiplemede kullanılan BDNF ve Neomisin primerleri

Primer Adı	Primer Dizisi
BDNF	Forward Primer: 5’ACCATAAGGACGCGGACTTGTAC-3’
Neomisin	Forward Primer: 5’-GATTTCGACGCGCATCGCCTT-3’
BDNF/Neomisin	Reverse Primer: 5’GAAGTGTCTATCCTTATGAATCGC-3’

Tablo 5. Genotiplemede kullanılan PCR karışımı

Malzemeler	µL
MgCl ₂ (25 mM)	1.2
Buffer (10x)	2
dNTP (10mM)	0.5
Primer F	0.5
Primer R	0.5
Taq DNA Polimeraz (5u/µL)	0.25
DNA	1
dH ₂ O	14.05
Toplam hacim	20

Yukarıdaki tabloya göre her örnek için karışımlar hazırlandı ve 94°C-5', (94°C-30", 52°C-45", 72°C-1') x 40, 72°C-7', 10°C ∞ protokülü esas alınarak PCR işlemi gerçekleştirildi.

5.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Fare genotiplerinin belirlenmesi için PCR işleminden sonra agaroz jel elektroforezi yapıldı.

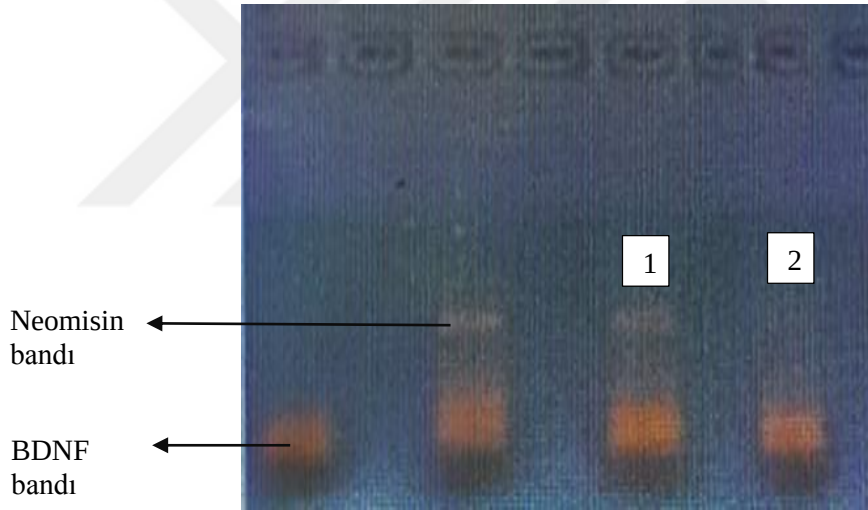
50xTris-Asetik asit-EDTA (TAE) Tamponu: 242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O₂ saf su ile çözüldükten sonra 57.1 mL asetik asit eklenerek pH 8.5 olacak şekilde hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan 50xTAE tamponu 1xTAE olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.

10mg/mL'lik Etidyum Bromür: 100 mg etidyum bromür 10 mL deiyonize suda çözüldü.

%2'lik Agaroz Jel: Bir erlene 2 g agaroz ve 100 mL 1xTAE tamponu konuldu ve mikrodalga fırında 2 dk bekletilerek agaroz çözüldü. Oluşan jel bir miktar soğutulduktan sonra 4 µL etidyum bromür jele ilave edilip karıştırıldı.

Jel taraklarının da yerleştirildiği jel kabına soğutulmuş %2'lik agaroz jel kabarcık olmayacak şekilde dikkatlice döküldü. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi. PCR işleminden çıkan ürünlere 4 µL yükleme boyası ilave edildi. Jel kuyucuklarına 15 µL eklenip 100 volt, 300 mA'de 30 dakika yürütme yapıldı.

Yürütme sonucu sadece BDNF geni çıkanlar wild tip, neomisin bandı çıkanlar heterozigot olarak gruplandırıldı (Şekil 7).



Şekil 8. BDNF ve neomisin bantlarının gösterildiği örnek bir agaroz jel görüntüsü
1: BDNF heterozigot 2: Wild tip

5.5. Gen Ekspresyonu

BDNF heterozigot ve wild tip farelerden dekapitasyon sonrası karaciğer ve yağ dokuları ile kan örnekleri alındı. Kanların santrifüjlenmesiyle elde edilen serumlar ile doku örnekleri analiz sürecine kadar -80°C'de saklandı. Daha sonra doku örnekleri RNA izolasyonu işlemine tabi tutuldu. Elde edilen RNA örnekleri ters transkriptaz yöntemi ile cDNA'ya dönüştürülerek Real Time PCR işleminde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

5.5.1. RNA İzolasyonu

- Karaciğer ve yağ dokularından RNA izolasyonu TriPure Isolation Reagent kit kullanılarak yapıldı.
- Ependorflara ayrı ayrı karaciğer dokusu için yaklaşık 180 mg, yağ dokusu için ise yaklaşık 300 mg doku ve 1 mL TriPure Isolation Reagent eklenerek homojenize edildi.
- Homojenize örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek nükleoproteinlerin ayrılması sağlandı.
- Karışım 12000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve iki faza ayrılması sağlandı.
- Karaciğer dokusunda üstteki faz yağ dokusunda ise orta faz santrifüj tüpüne alınarak her örnek başına 200 µL kloroform ilave edildi, ağzı kapatıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Karışım 12000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Üstteki faz alınarak üzerine 0.5 mL izopropil alkol eklendi, ağzı kapatıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi böylece RNA çökeleği oluşması sağlandı.
- Karışım çökeleğin ayrılması için 12000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine 1 mL %75'lik etanol eklendi ve hafifçe vortekslendi.
- 7500 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Tamamen kurumasına müsaade edilmeden fazla etanol uzaklaştırıldı.
- RNA pelleti 50 µL Dietil pirokarbonatlı (DEPC) su ile pipetaj yapılarak çözüldü ve etüvde 55°C'da 10-15 dakika bekletildi.
- Elde edilen RNA örneklerinin 260/280 nm'de konsantrasyonları ve absorbans oranları nanodrop spektrofotometre ile belirlendi (Elde edilen RNA'nın saflığı 260/280 absorbans oranına bağlıdır ve iyi bir RNA izolasyonu için bu oranın 2 civarında olması gerekir). Çalışmamızda bu oranı ~2 civarında bulundu.

5.5.2. RT-PCR ile RNA Örneklerinden cDNA Elde Edilmesi

cDNA elde etmek için Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti (catalog no: 04 896 866 001, Roche, Basel, İsviçre) kullanıldı ve aşağıdaki işlemler sırası ile kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. Kit protokolü uygulanmadan önce total RNA'ların konsantrasyonları kit içerisindeki nükleaz free su ile seyreltilerek 100 ng/ μ L'ye ayarlandı.

Tablo 6. RNA örneklerinin RT-PCR işlemine hazırlanması

Reaktifler	Hacim
600 pmol/ μ L Random hekzamer primer	2 μ L
Ters transkriptaz reaksiyon tamponu	4 μ L
RNaz inhibitörü	0.5 μ L
dNTP karışımı	2 μ L
Ters transkriptaz	0.5 μ L
Su	1 μ L

Her bir örnek için Tablo 6'ya göre pipetlemeler yapıldı ve Tablo 7'deki prosedürler uygulanarak total RNA karışımından cDNA örnekleri elde edildi. Elde edilen cDNA örnekleri -80 °C'de Real-Time PCR yapılana kadar saklandı.

Tablo 7. RT-PCR protokolü

Sıcaklık °C	Süre (dak)
25	10
50	60
85	5

PCR işlemi bittikten sonra cDNA konsantrasyonu ve saflığı nanodrop cihazı ile ölçüldü. Ölçüm sonucu konsantrasyonlar 1500-1600 ng/ μ L saflıklar ise 260/280 oranında 1.8 civarında bulundu.

5.5.3. Real Time PCR Protokolü

Çalışmamızdaki gen ekspresyon analizleri Roche tarafından "LightCycler" PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilen her bir assay, gen spesifik primer ve Universal Probelibrary (ULP) problemleri kullanılarak üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda

Roche Light Cycler 480 II marka cihazı ile gerçekleştirildi. Kullandığımız primerler ve dizilişleri Tablo 8’de verilmiştir. GAPDH housekeeping gen olarak kullanılmıştır.

Tablo 8. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi
Roche Real Time Ready Gapdh Assay ID: 307884	İleri Primer Dizisi: 5’GGGTCCTATAAATACGGACTGC-3’ Geri Primer Dizisi: 5’CCATTTTGTCTACGGGACGA-3’
Roche Real Time Ready Car2 Assay ID: 317969	İleri Primer Dizisi: 5’CTGTCAGCAGCGAGCAGAT-3’ Geri Primer Dizisi: 5’ACGCCAGTTGTCCACCAT-3’
Roche Real Time Ready Car3 Assay ID: 310716	İleri Primer Dizisi: 5’GACTTCGCCAATTCATCTT-3’ Geri Primer Dizisi: 5’CCAGTGAACCAGGTGAAGC-3’
Roche Real Time Ready Car5a Assay ID: 317965	İleri Primer Dizisi: 5’GGAGTTTGACGATTCCTGTGA-3’ Geri Primer Dizisi: 5’GTTGCTCCCCAGTGGAAAT-3’
Roche Real Time Ready Car5b Assay ID: 317968	İleri Primer Dizisi: 5’GAGCACACCGTGGACAGTAA-3’ Geri Primer Dizisi: 5’TGCGTTCCAATGTACCAAGT-3’
Roche Real Time Ready Pcx Assay ID: 313415	İleri Primer Dizisi: 5’ACCTGTACGAGCGAGACTGC-3’ Geri Primer Dizisi: 5’GGGCGATCTCTACCACCTTC-3’
Roche Real Time Ready Acaca Assay ID: 310268	İleri Primer Dizisi: 5’CAGTGCTATGCTGAGATTGAGG-3’ Geri Primer Dizisi: 5’ACACAGCCAGGGTCAAGTG-3’
Gapdh: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, Car2: Karbonik anhidraz II, Car3: Karbonik anhidraz III, Car5a: Karbonik anhidraz VA, Car5b: Karbonik anhidraz VB, Pcx: Piruvat karboksilaz, Acaca: Asetil CoA karboksilaz	

Tablo 9. Örneklerin Real Time PCR için hazırlanması

Eklenen Reaktifler	µL
Real Time Ready Assay (GAPDH, CA II, CA III, CA VA, CA VB, PCX, ACACA)	1
Nükleaz free su	4
cDNA (her bir örnek için)	5
LightCycler 480 Probe Master	10
Toplam Hacim	20

Kuyucuklara Tablo 9’da verilen miktarlar kullanılarak pipetlemeler yapıldıktan sonra pleytin üzeri özel cover ile iyice kaplandı. Pleyt hava kabarcıklarını gidermek için kısa süreli santrifüjlendikten sonra Roche LightCycler 480 II marka PCR cihazına yerleştirildi.

Tablo 10’da verilen, üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda PCR programı cihaza programlandı ve PCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 10. Real Time PCR protokolü

Program	Döngü	Analiz Modu	
Ön inkübasyon	1	-	
Amplifikasyon	45	Kantitasyon	
Soğutma	1	-	
Hedef sıcaklık °C	Elde etme modu	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	10 dakika	4.4
Amplifikasyon			
95	-	10 saniye	4.4
60	-	30 saniye	2.2
72	Tek	1 saniye	4.4
Soğutma			
40	-	30 saniye	2.2

5.5.4. RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

RT-PCR, reaksiyon sırasında nükleik asitlerin çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren florasan sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Real time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde diziye özgün olmayan interkalatör florasan boyalardan ya da diziye özgün florasan işaretli problardan yararlanılmaktadır. Aynı cihaz ve tüp içerisinde hem çoğaltma hem de çoğaltılan ürünlerin belirlenmesi işlemi eş zamanlı yapılabildiğinden bu yöntem süre ve kontaminasyon riski açısından daha avantajlı bir yöntemdir.

Real time PCR işlemi sonucunda elde edilen değerler Cp (crossing point) değeridir. Her bir genin Cp değerleri o örneğin referans gen (housekeeping gen) değerinden çıkarılarak delta Cp (ΔCp) değerleri hesaplandı. ΔCp değerleri kontrol grubunun Cp değerinden çıkartılarak delta delta Cp değerleri ($\Delta\Delta Cp$) hesaplandı. Son

olarak her bir genin kontrol grubuna göre ne kadar eksprese olduğunu hesaplamak için $2^{-\Delta\Delta C_p}$ (fold change) değerleri hesaplandı.

$$\text{kat değişim} = 2^{-\Delta\Delta C_p} = 2^{-(\Delta C_p \text{ hedef} - \Delta C_p \text{ kontrol})}$$

ΔC_p hedef: C_p hedef gen- C_p referans gen (housekeeping gen)

ΔC_p kontrol: C_p hedef gen- C_p referans gen

5.6. Serumda Yapılan Glukoz ve Triaçilgliserol Ölçümü

Serumda glukoz ve triaçilgliserol parametreleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarında bulunan AU 5800 Beckman Coulter otoanalizöründe orjinal kitler kullanılarak ölçüldü.

5.7. İstatistiksel Analizler

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veriler SPSS istatistik programına girildi. Normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi.

Normal dağılıma uymayan, bağımsız parametrelerin ikili karşılaştırmaları için Mann Whitney-U testi uygulandı. Sonuçlar aritmetik ortalama ve standart hata şeklinde gösterildi. İstatistiksel testlerdeki sonuçların $p < 0.05$ bulunması durumunda bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Farelerin Ağırlık, Glukoz ve Triaçilgliserol Seviyeleri İle İlgili Bulgular

Çalışmamızda başlangıçtaki ve dört ay sonraki grupların ağırlıkları ile serum glukoz ve triaçilgliserol değerleri Tablo 11’de verilmiştir.

Deney başında gruplara ayrılmadan önce fareler tartıldı ve ortalama ağırlıkları arasında bir fark gözlemlenmedi ($p=0.083$). Yaklaşık dört aylık BDNF (+/-) grubun son ağırlıkları wild tip gruba göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.001$). BDNF (+/-) grubun glukoz değerleri wild tip gruba göre karşılaştırıldığında bir fark görülmemiştir ($p=0.731$). BDNF (+/-) grubun triaçilgliserol değerleri de wild tip gruba göre karşılaştırıldığında gruplar arasında fark bulunamamıştır ($p=0.755$).

Tablo 11. Grupların başlangıç ve deney sonu ağırlıkları ile serum glukoz, triaçilgliserol değerleri

Genotipi	Wild tip	BDNF (+/-)	p değerleri
Başlangıç Ağırlığı (g)	16.2±1.7	16.7±1.9	$p=0.083$
Deney sonu ağırlığı (g)	21.63±0.64	23.42±1.39 ^a	$p=0.011$
Glukoz (mg/dL)	180.1±16.1	190.0±20.1	$p=0.731$
Triaçilgliserol (mg/dL)	96.6±12.0	96.0±18.1	$p=0.755$

a: Wild tip gruba göre $p<0.05$ düzeyinde anlamlıdır.

p değeri ‘Mann Whitney U’ testine göre belirlendi. Değerler ortalama±standart sapma şeklinde verildi.

6.2. Karaciğer ve Yağ Dokularında Gen Ekspresyonları ile İlgili Bulgular

Wild tip ve heterozigot gruba ait karaciğer ve yağ dokularından cDNA’lar elde edilen RT-PCR ile bu dokularda CA II, III, VA, VB ve piruvat karboksilaz ile asetil CoA karboksilaz ekspresyonları okundu ve her bir numune için elde edilen kesişim noktası (Cp, crossing point) değerlerinin ortalaması alınarak elde edilen Cp değerleri ışığında wild tip gruba göre heterozigot grupların kat değişimleri hesaplandı.

6.2.1. CA II Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Karaciğer ve yağ dokularının CA II gen ekspresyonuna ait sonuçlar Tablo 12’de verilmiştir.

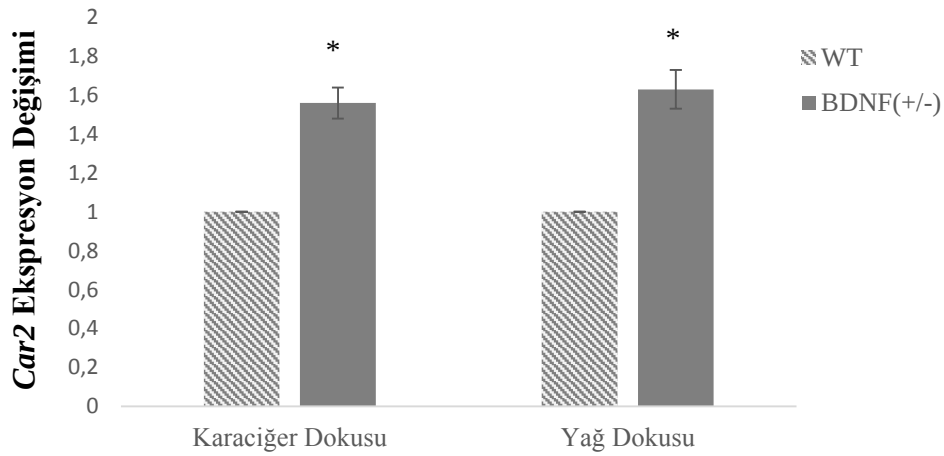
Tablo 12. Karaciğer ve yağ dokusuna ait CA II ekspresyon sonuçları

	Karaciğer dokusu	Yağ dokusu
Wild tip	1.0	1.0
BDNF (+/-)	1.56±0.08	1.63±0.10

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.

RT-PCR sonrası yapılan hesaplamalara göre heterozigot grubun karaciğer ve yağ dokusundaki CA II ekspresyonları wild tip gruba göre karşılaştırılmış ve elde edilen grafik Şekil 9’da gösterilmiştir.

Karaciğer ve yağ dokusunda CA II ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta istatistiksel olarak artmıştır (p=0.000).



Şekil 9. Grupların karaciğer ve yağ dokularının CA II ekspresyonu karşılaştırması. *Wild tip grubuna göre anlamlı bir artış bulundu (p<0.05). p değeri ‘Mann Whitney U testi’ne göre bulunmuştur.

6.2.2. CA III Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Karaciğer ve yağ dokularının CA III gen ekspresyonuna ait bulgular Tablo 13’de verilmiştir.

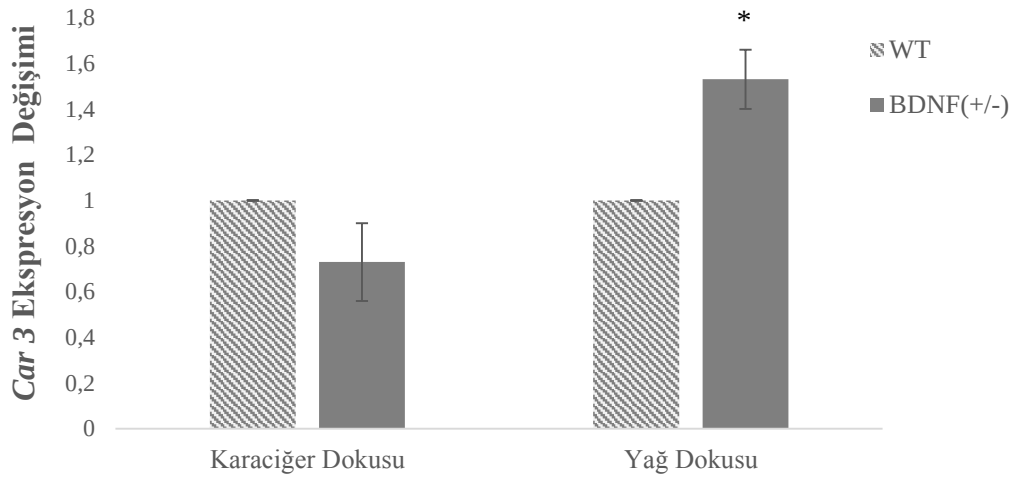
Tablo 13. Karaciğer ve yağ dokusuna ait CA III ekspresyon sonuçları

	Karaciğer dokusu	Yağ dokusu
Wild tip	1.0	1.0
BDNF (+/-)	0.73±0.17	1.53±0.13

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.

RT-PCR sonrası yapılan hesaplamalara göre heterozigot grubun karaciğer ve yağ dokusundaki CA III ekspresyonları wild tip gruba göre karşılaştırılmış ve elde edilen grafik Şekil 10’da gösterilmiştir.

Karaciğer dokusu CA III ekspresyonlarında gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p=0.369$). Yağ dokusunda ise CA III ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta daha yüksek bulunmuştur ($p=0.007$).



Şekil 10. Grupların karaciğer ve yağ dokularının CA III ekspresyonu karşılaştırması. *Wild tip grubuna göre anlamlı bir artış bulundu ($p<0.05$). p değeri ‘Mann Whitney U testi’ne göre bulunmuştur.

6.2.3. CA VA Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Karaciğer ve yağ dokularının CA VA gen ekspresyonuna ait değişiklikler Tablo 14’de verilmiştir.

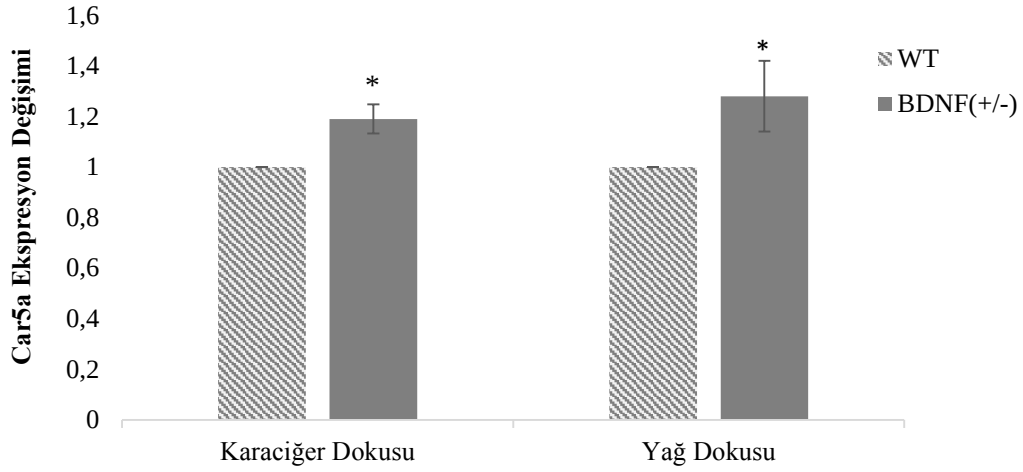
Tablo 14. Karaciğer ve yağ dokusuna ait CA VA ekspresyon sonuçları

	Karaciğer dokusu	Yağ dokusu
Wild tip	1.0	1.0
BDNF (+/-)	1.19±0.06	1.28±0.14

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.

RT-PCR sonrası yapılan hesaplamalara göre heterozigot grubun karaciğer ve yağ dokusundaki CA VA ekspresyonları wild tip gruba göre karşılaştırılmış ve elde edilen grafik Şekil 11’de gösterilmiştir.

Bu karşılaştırmaya göre karaciğer ve yağ dokusunda CA VA ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta farklılık göstermektedir ($p=0.007$).



Şekil 11. Grupların karaciğer ve yağ dokularının CA VA ekspresyonu karşılaştırması. *Wild tip grubuna göre anlamlı bir artış bulundu ($p<0.05$). p değeri ‘Mann Whitney U testi’ne göre bulunmuştur.

6.2.4. CA VB Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

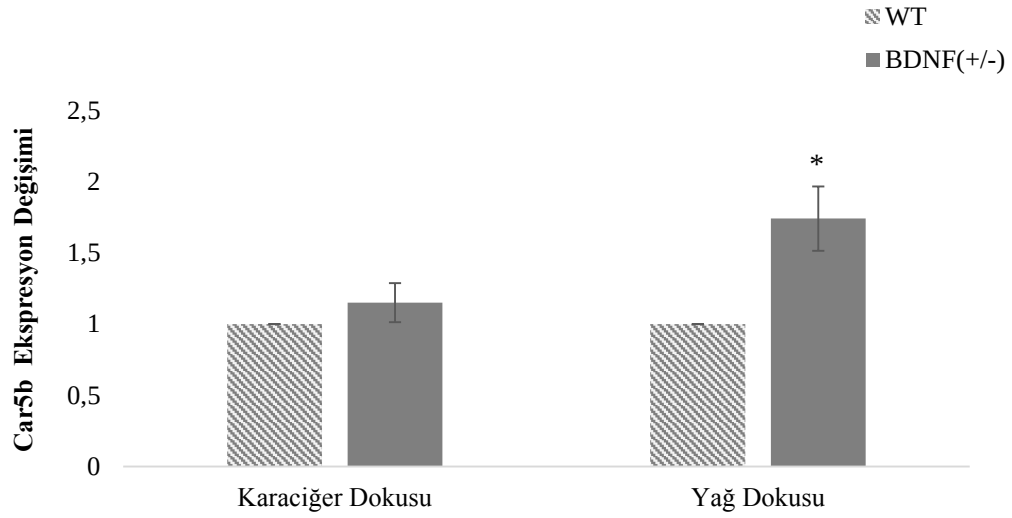
Karaciğer ve yağ dokularının CA VB gen ekspresyonuna ait ölçümler Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Karaciğer ve yağ dokusuna ait CA VB ekspresyon sonuçları

	Karaciğer dokusu	Yağ dokusu
Wild tip	1.0	1.0
BDNF (+/-)	1.15±0.14	1.74±0.23

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.

RT-PCR sonrası yapılan hesaplamalara göre heterozigot grubun karaciğer ve yağ dokusundaki CA VB ekspresyonları wild tip gruba göre karşılaştırılmış ve elde edilen grafik Şekil 12’de gösterilmiştir. Karaciğer dokusunda CA VB ekspresyonlarında wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta anlamlı bir fark belirlenememiştir ($p=0.073$). Yağ dokusunda CA VB ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta yüksek bulunmuştur ($p=0.007$).



Şekil 12. Grupların karaciğer ve yağ dokularının CA VB ekspresyonu karşılaştırması. *Wild tip grubuna göre anlamlı bir artış bulundu ($p < 0.05$). p değeri ‘Mann Whitney U testi’ne göre bulunmuştur.

6.2.5. Piruvat Karboksilaz Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Karaciğer ve yağ dokularının piruvat karboksilaz gen ekspresyonuna ait sonuçları Tablo 16’de verilmiştir.

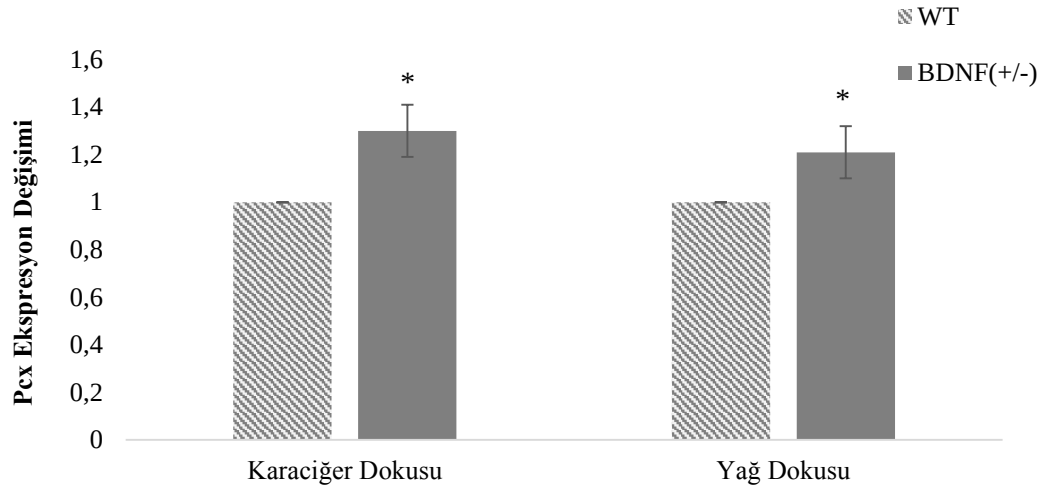
Tablo 16. Karaciğer ve yağ dokusuna ait piruvat karboksilaz ekspresyon sonuçları

	Karaciğer dokusu	Yağ dokusu
Wild tip	1.0	1.0
BDNF (+/-)	1.3±0.11	1.21±0.11

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.

RT-PCR sonrası yapılan hesaplamalara göre heterozigot grubun karaciğer ve yağ dokusundaki piruvat karboksilaz ekspresyonları wild tip gruba göre karşılaştırılmış ve elde edilen grafik Şekil 13’de gösterilmiştir.

Karaciğer ve yağ dokusunda piruvat karboksilaz ekspresyonları karşılaştırılması sonucu wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta anlamlı fark bulunmuştur. ($p=0.007$).



Şekil 13. Grupların karaciğer ve yağ dokularının piruvat karboksilaz ekspresyonu karşılaştırması.*Wild tip grubuna göre anlamlı bir artış bulundu ($p<0.05$). p değeri ‘Mann Whitney U testi’ne göre bulunmuştur.

6.2.6. Asetil CoA Karboksilaz β Ekspresyonu ile İlgili Bulgular

Karaciğer ve yağ dokularının asetil CoA karboksilaz β gen ekspresyonuna ait değişiklikler Tablo 17’de verilmiştir.

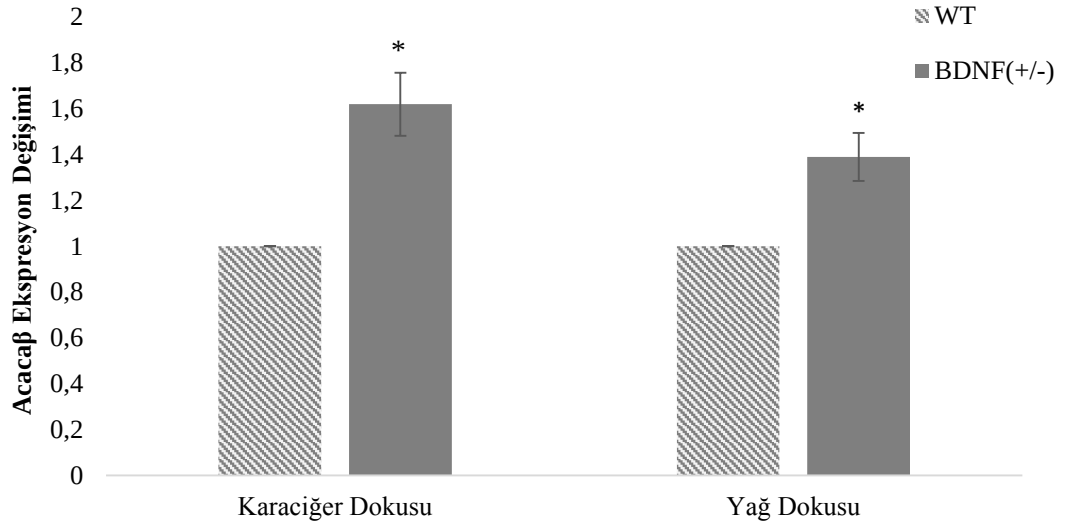
Tablo 17. Karaciğer ve yağ dokusuna ait asetil CoA karboksilaz β ekspresyon sonuçları

	Karaciğer dokusu	Yağ dokusu
Wild tip	1.0	1.0
BDNF (+/-)	1.62±0.14	1.39±0.10

Değerler ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir.

RT-PCR sonrası yapılan hesaplamalara göre heterozigot grubun karaciğer ve yağ dokusundaki asetil CoA karboksilaz β ekspresyonları wild tip gruba göre karşılaştırılmış ve elde edilen grafik Şekil 14’de gösterilmiştir.

Bu karşılaştırmaya göre karaciğer ve yağ dokusunda asetil CoA karboksilaz β ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta anlamlı yüksek bulunmuştur ($p=0.000$).



Şekil 14. Grupların karaciğer ve yağ dokularının asetil CoA karboksilaz β ekspresyonu karşılaştırması. *Wild tip grubuna göre anlamlı bir artış bulundu ($p < 0.05$). p değeri 'Mann Whitney U testi'ne göre bulunmuştur.

7. TARTIŞMA

De novo lipogenez (DNL), başlıca oluşum yeri adipoz doku ve karaciğer dokusu olan kompleks bir yoldur. (39). *De novo* lipogenezin yağ kütlesi artışına sebep olan önemli bir metabolik yol olduğunu iddia eden kaynaklar bulunmakla beraber, bazı kaynaklarda ise kilit görevdeki enzimlerin yağ dokusunda yer almasına rağmen ancak yüksek miktarda karbohidrat alımından sonra yağ dokusunda DNL'nin önemli bir metabolik yol olabileceği üzerinde durulmuştur (39, 40). Bu metabolik yolun regülasyonu, karaciğer x reseptör (LXR), sterol regülatör element bağlayıcı protein (SREBP-1c), karbohidrat yanıt elementini bağlayan protein (ChREBP) transkripsiyon faktörlerince sağlanır (39). Bu faktörlerin hepsi de metabolizmanın majör regülatörü olan adenosin monofosfat aktive olan protein kinaz (AMPK) ile ilişkilidir. AMPK, bir serin/treonin heterotrimer kinazdır. Artmış AMP ile aktive olur ve allosterik aktivasyon, kinaz enzimlerince aktivasyon ya da fosfatazlarca inhibisyon ile AMPK'ı regüle eder. AMPK, anabolik yolları inhibe ederken katabolik yolları aktive eder. Bu etkilerini anabolik yollardaki enzimleri fosforilasyonla regüle edebileceği gibi bu yollardaki genlerin ekspresyonunu etkileyerek de düzenleyebilir (41).

BDNF hem besin alımı hem de enerji metabolizmasında rol alan önemli bir nörotrofindir. (4). Bu amaçla BDNF'nin diyabet, obezite gibi metabolik hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülerek çeşitli çalışmalar yapılmıştır. BDNF metabolik etkilerini, enerji metabolizmasında önemli olan karaciğer, pankreas, iskelet kası gibi periferel dokularda gösterdiği değişiklikler aracılığıyla gerçekleştirebilmektedir (42, 43). BDNF ve TrkB'nin iskelet kası hücrelerinde sentezlendiği bilinmektedir (44). İnsanlarda *in vivo* olarak egzersiz sonrasında BDNF mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, BDNF proteinin iskelet kasında AMPK fosforilasyonunu aktive ederek yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı *in vivo* ve *ex vivo* yöntemlerle gösterilmiştir (42).

Karbonik anhidraz enzimi, vücudumuzda geniş bir doku dağılımına sahip olup glukoz metabolizması, *de novo* lipogenez gibi enerji metabolizmasında önemli birçok metabolik olayda görev alan enzimdir (26). *De novo* lipogenezde kilit rol oynayan asetil CoA karboksilaz ve piruvat karboksilaz gibi enzimlere CA II, CA III ve mitokondriyal CA izoenzimleri tarafından bikarbonat iyonu sağlandığı kabul edilmektedir (9, 10).

DNL nin ana düzenleyicisi AMPK dır. Yapılan alışmalar BDNF nin AMPK aktivitesini uyardığını ve lipid sentezini baskılandığını göstermektedir (41). Standart fare yemi ile beslediğimiz hayvanları BDNF heterozigot ve wild tip olmak üzere iki gruba ayırdık. BDNF heterozigot fareler, BDNF proteinin kodlayan iki allelden birinden yoksun olan hayvanlardır ve yapılan çalışmalarda bu farelerde obez karakter gözlemlenmiştir (4). Yaklaşık 4 aylıkken çalışmamıza dahil ettiğimiz bu iki grup farenin ağırlıklarında biz de heterozigot grupta anlamlı fark gözlemledik ($p=0.005$). Bu vücut ağırlığı artış, BDNF eksikliğinin AMPK tarafından baskılanan lipogenik enzimlerin aktivitesinin artışına bağlı oluşan lipid sentezinin bir sonucu olabilir. Bu bağlamda incelediğimiz DNL sentezi ile ilişkili enzimlerinden asetil CoA karboksilaz ve piruvat karboksilaz gen ekspresyonlarını bu sonucu teyit edecek şekilde artmıştır. Asetil CoA karboksilaz ve piruvat karboksilaz ekspresyonları heterozigot grubun hem karaciğer hem de yağ hücresinde wild tip gruba göre yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BDNF geni veya reseptöründe oluşan mutasyonun kilo artışına sebep olduğu gösterilmiştir (4). BDNF heterozigot farelerle yapılan bir başka çalışmada ise kilo alımı ile beraber farelerin yarısında yeme davranışı bozuklukları görülmüştür (4). Çalışmamızda gözlemlediğimiz BDNF heterozigot farlerdeki kilo artışı bu beslenme davranışı bozukluğunun bir sonucu olabilir.

Heterozigot farelerin triaçilgliserol değerlerinde kontrol grubuna göre herhangi bir fark gözlenmemiştir ($p=0.755$). Benzer şekilde hepatik BDNF mutasyonu oluşturulan farelerde serum triaçilgliserol seviyesi yönünden wild tiplere göre herhangi bir fark bulunamamıştır (45). İnsanlarda BDNF ile serum triaçilgliserol değerleri arasında ilişki olduğu gösterilmiş olmasına rağmen farelerde böyle bir durumun olmadığı insan-fare arasında triaçilgliserol seviyelerinin seruma yansımada farklılıklar olduğu bildirilmiştir (46).

Çalışmamızda heterozigot farelerde, glukoz değerı hafif yüksek olmakla beraber anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.731$). BDNF ile kan glukoz seviyesi arasında nasıl ilişki olduğu hakkında literatürde uyumlu sonuçlar elde edilemediğinden kesin bir kaniya varılamamıştır. Bu konu hakkında iki hipotez ne sürülmüştür. Bunlarda biri BDNF'nin kan glukoz seviyesini düşürebilmesi için endojen veya ekzojen kaynaklı

insüline ihtiyaç duyduğu bir diğeri ise BDNF'nin glukoz metabolizmasını etkileyebilmesi için tam bir BDNF eksikliğinin oluşması gerektirir (43, 47).

Çalışmamızda DNL görev alan enzimlerin gen ekspresyonu çalışmaları karaciğer ve yağ dokusunda gerçekleştirilmiştir. Karaciğer dokusunda CA VA ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta ($p=0.007$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Yağ dokusunda CA VA ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta ($p=0.007$) artış göstermiştir. Ayrıca karaciğer dokusunda CA VB ekspresyonlarında wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.073$). Yağ dokusunda CA VB ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta ($p=0.007$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. BDNF heterozigot grupta *de novo* lipogenez metabolik yolunun aktifleşmesiyle piruvat karboksilaz enzimi için gerekli olan bikarbonat CA VA ve/veya VB tarafından sağlandığı için bu izoenzimlerin ekspresyonları DNL destekleyecek şekilde artmış olabilir. Karaciğer dokusunda CA VB ekspresyonunda ise anlamlı bir artış bulunamamıştır. Mitokondrial karbonik anhidraz enzimlerinin doku dağılımları farklıdır. CA VA karaciğer dokusunda ve iskelet kasında daha bol bulunurken katalitik olarak daha aktif olan CA VB izoenzimi daha yaygın bir dağılım göstermektedir. Ayrıca CA VB izoenziminin katalitik domaini CA VA izoenzimine göre daha korunmuş halde bulunmaktadır. Doku dağılımı ve domainler arasındaki korunma farkı nedeniyle bu iki izoenzimin farklı fonksiyonları olabileceği kanısına varılmıştır (48). Üre devrinin karaciğerde gerçekleşen ilk reaksiyonunu katalizleyen mitokondrial karbamoil fosfat sentetaz (CPS I) için gerekli olan bikarbonat iyonunu CA VA enzimi tarafından sentezlenir (31). CA VA ile BDNF arasındaki ilişki Huntington hastalığında gösterilmiştir. CA VB ile ilgili bu ilişki gösterilememiştir. Huntington hastalığında karaciğer disfonksiyonu ile beraber üre devrinde bozulma ve kanda artmış amonyak seviyesi görülür. Huntington hastalığında, mutant Huntingtin geni varlığında, C/EBP α en önemli kofaktörü olan ve BDNF tarafından aktive edilebilen CREB proteinini kaybeder böylece C/EBP α gen ekspresyonu baskılanır. C/EBP α üre devri enzimlerinin ekspresyonu için önemli bir transkripsiyon faktörüdür (49). BDNF seviyesinin azalması Huntington hastalığındaki gibi üre sentezinin baskılanmasına ve CA VA tarafından üretilen bikarbonat iyonunun birikmesine sebep olabilir. Biriken bikarbonat karaciğerde lipid sentezini destekleyecek şekilde DNL de kullanılmış olabilir. Karaciğerde artan

DNL ile oluşan yağlar diğer dokulara gönderilerek depolanır ve vücud ağırlığı artışına sebep olur. Benzer şekilde yağ dokusunda da BDNF heterozigot farelerde *CA Va* ve *Vb* gen ekspresyonları artmıştır. BDNF eksikliği AMPK aktivitesini azaltır. Bu azalış lipid sentezini artırır. Lipid sentezini desteklemek için bu enzimlerin seviyeleri artırılır. Ayrıca, BDNF heterozigot farelerde görülen hiperfajiya bağlı olarak vücuda alınan fazla enerji yağ dokusunda triaçilgliserol olarak depolanır ve vücud ağırlığı artar.

Çalışmamızda karaciğer dokusunda *CA II* ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta ($p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Ayrıca aynı karşılaştırmaya göre yağ dokusunda *CA II* ekspresyonları wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta ($p=0.001$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu artış BDNF heterozigot grupta *de novo* lipogenez artışına paralel olarak asetil CoA karboksilaz enziminin aktivitesi için gerekli olan bikarbonat ihtiyaından kaynaklanmış olabilir.

CA II sentezi insanlardan farklı olarak, rodentlerde çeşitli hormonlarca da regüle edilebilmektedir. Bu izoenzimin sentezi rat karaciğerinde testosteron tarafından inhibe edilirken östrojen tarafından aktive edilir. Dişi ve erkek ratlara büyüme hormonu verilmesi sonucu erkek ratların karaciğerinde *CA II* sentezi artmıştır (28). Bu izoenzimin sentezi insülin seviyesizerinden de etkilenebilir. Literatür tarandığında BDNF heterozigot farelerde hiperinsulinemi görülmektedir (47). Buna bağlı *CA II* ekspresyonu artmış olabilir. Ayrıca heterozigot farelerdeki obeziteye bağlı değişen adipokin profili de (düşük adiponektin gibi) *CA II* sentezini uyarımış olabilir. BDNF'nin pankreas β hücreleri gibi glukoz metabolizmasında görevli dokuları etkilediği bilinmektedir (43). BDNF heterozigot farelerde insülin seviyesi artışı ile ya da insülinden bağımsız olarak BDNF gen eksikliği ile *CA II* seviyesi de artış göstermiş olabilir.

Çalışmamızda karaciğer dokusu *CA III* ekspresyonlarında wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.369$). *CA III*, karaciğer ve yağ dokusu gibi enerji metabolizmasının kilit organlarında bol bulunan, diğer izoenzimlere göre hidrataz aktivitesi daha düşük olan karbonik anhidraz izoenzimidir. Literatürde sentezinin seksüel dimorfizme bağlı olduğu özellikle erkek rat karaciğerinde testosteron kaynaklı olarak dişi rat karaciğerine göre yüksek seviyede

olduğu belirtilmiştir. Ayrıca obez ratlarda CA III seviyesi her iki dokuda da azalmaktadır (11). Çalışmamızda CA III ekspresyonu azalmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı düzeylere ulaşmamıştır. CA III'ün çok düşük hidrataz aktivitesine sahip olması bu izoenzimin katalitik aktivitesi dışında görevlerinin olabileceğini akla getirmektedir. Vücut ağırlığı artışına rağmen CA III seviyelerinin artmaması bu enzimin doğrudan DNL ile ilgili olmamasından kaynaklanabilir. Ayrıca yukarıda belirtilen diyetle indüklenmiş obez ratlarda CA III seviyesinin azalışının bu çalışmada gözlenmemiş olması BDNF eksikliğine bağlı obezitenin diyet indüklü obeziteye göre farklı moleküler mekanizmalara sahip olmasının bir sonucu olabilir. BDNF eksikliği ile ilişkili obezitede adipoz dokudan salınan adiponektin karaciğerde AMPK yoluyla lipid sentezinde görevli enzimleri fosforilleyerek lipid sentezini baskılayabilir (50).

Yağ dokusunda ise CA III ekspresyonları ise wild tip gruba göre BDNF heterozigot grupta ($p=0.007$) istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu durum yukarıda bahsettiğimiz gibi, diğer izoenzimlerden farklı olarak CA III'ün bikarbonat kaynağı olmanın dışında farklı fonksiyonlarının da olabileceğini akıllara getirmektedir. CA III'ün PPAR γ 2 gen ekspresyonu düzeyinde, adipogenezi düzenlemesi, oksidatif stres üzerine etkisi ve sentezinin hormonal olarak kontrol edilmesi bu enzimi diğer karbonik anhidrazilardan farklı kılar (7).

Öncül yağ hücrelerinden çeşitli faktörlerin etkisiyle olgun adipositlerin oluşması sürecine adipogenez denir. CA III'ün PPAR γ 2 gen ekspresyonu düzeyinde adipogenezi düzenlediği bildirilmektedir (7). CA III ekspresyonu adipogenez aşamalarına göre değişiyor olabilir.

CA III glutatyon ile tersinir bir şekilde konjuge olabilen iki adet reaktif sülfidril grubuna sahiptir. Bu S-glutatyonilasyon reaksiyonunun, hücrede proteinleri dönüşümsüz oksidasyonlardan koruyan muhtemel savunma mekanizmalarından biri olabileceği düşünülmektedir (51). CA III sentezleyemeyen NIH-3T3 hücrelerine rat CA III cDNA'sı yerleştirildiğinde bu hücrelerin hidrojen peroksit ile indüklenmiş apoptoza karşı direnci artmıştır. Burada CA III'ün hızlıca glutatyonlanılarak oksiradikalleri toplayıp hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu ileri sürülmüştür (51). Obeziteye bağlı vücut ağırlığının artışı ile yağ dokuları triaçilgliserollerini depolayarak büyür. Depo kapasitesi aşıldığında öncül hücrelerden yağ hücreleri farklılaşması ile olgun adipositler

oluşur. Adipogenez sırasında reaktif oksijen türlerinin artışı 3T3-L1 hücrelerinde gösterilmiştir (51). Adipogenez sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin etkilerini berteraf etmek için CA III miktarı artmış olabilir.

Streptozotocin verilerek diyabet yapılan obez ratlarda baskılanmış olan CA III seviyelerinin arttığı görülmüş ve beyaz yağ dokusunda CA III seviyelerinin insülin seviyesine bağlı olarak düzenlendiği öne sürülmüştür (52). BDNF heterozigot farelerde görülen yüksek insülin seviyesi de yağ dokusunda CA III ekspresyonunda bir artışa sebep olmuş olabilir.

De novo lipogenezde kilit rol oynayan asetil CoA karboksilaz ve piruvat karboksilaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar için gerekli olan bikarbonatı sağlayan CA VA, VB, CA II ekspresyonlarını artmıştır ve bulduğumuz değişim literatür ile uyumludur (9, 10). CA III ekspresyonundaki değişim ise yağ dokusunda *de novo* sentez artışı ile uyumlu iken karaciğer dokusunda uyumlu değildir. Bu durum CA III izoenziminin *de novo* lipid sentezi dışında farklı metabolik rolleri olabileceğini desteklemektedir. Sonuç olarak, BDNF'nin DNL'yi CA II, VA ve VB üzerinden düzenleyebileceği kanaatine varıldı.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda;

1. Heterozigot farelerin vücut ağırlıklarında wild tip gruba göre anlamlı seviyede artış tespit edildi.

2. BDNF heterozigot farelerin karaciğerinde CA II, VA-VB izoenzimleri ile piruvat karboksilaz ve asetil CoA karboksilaz enzimlerinin ekspresyonlarının wild tip farelere göre daha yüksek olduğu görüldü.

3. BDNF heterozigot farelerin yağ dokusunda CA II, III, VA-VB izoenzimleri ile piruvat karboksilaz ve asetil CoA karboksilaz enzimlerinin ekspresyonlarının wild tip farelere göre daha yüksek olduğu görüldü.

4. BDNF eksikliğinde gözlenen vücut ağırlığı artışında, *de novo* lipid sentezinde önemli olan bu enzimlerin etkileri olduğu kanaatine varıldı.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar doğrultusunda;

1. BDNF eksikliğine bağlı obez fenotipte *de novo* lipid sentezinde görevli CA II, VA-VB ekspresyonlarındaki değişiklikler göz önüne alınarak, BDNF agonistleri düzenleme mekanizmalarının aydınlatılması için kullanılabilir.

2. CA II, VA-VB izoenzimleri ile piruvat karboksilaz ve asetil CoA karboksilaz enzimlerinin aktivite ölçümleri yapılarak enzimlerin aktivite yönünden değişimleri belirlenebilir.

3. *De novo* lipid sentezinde görevli CA izoenzimleri inhibitörleri kullanılarak bu model için etkileri test edilebilir.

4. CA III izoenzim ekspresyonunun diğer enzimlerden farklı olarak, heterozigot farelerin sadece epididimal yağ dokusunda artış göstermesi bu izoenzimin *de novo* lipid sentezi dışında farklı rolü olabileceğini düşündürmektedir. CA III ile BDNF arasındaki ilişki oksidatif stres, tip 2 diyabet gibi çeşitli faktörler açısından incelenebilir.

9. KAYNAKLAR

1. Wenjie M, Wu JHY, Wang Q, Lemaitre RN, Mukamal KJ, Djoussé L, Mozaffarian D (2015). Prospective association of fatty acids in the *de novo* lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: The Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr* 101(1): 153-163.
2. Cunha C, Brambilla R, Thomas K (2010). A Simple Role for BDNF in Learning and Memory? *Front Mol Neurosci* (9): 3:1.
3. Marosi K, Mattson MP (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab* 25(2): 89-98.
4. Xu B, Xie X (2016). Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat Rev Neurosci* 17(5): 282-292.
5. Thiry A, Supuran CT, Masereee B, Dogné JM (2007). Recent Developments of Carbonic Anhydrase Inhibitors as Potential Anticancer Drugs. *J Med Chem* 51(11): 3051-3056.
6. So AK-C, Espie GS, Williams EB, Shively JM, Heinhorst S, Cannon GC (2004). A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (ϵ Class) is a component of the carboxysome shell. *J Bacteriol* 186(3): 623–630.
7. Frost SC, McKenna R (2014). Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications; Springer Science & Business Media: Haarlem, The Netherlands 20-50.
8. Şentürk A (2015). Oksidatif olarak modifiye edilmiş karbonik anhidraza karşı otoantikor oluşumunun ve bu antikorların bazı romatoid hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
9. Scozzafava A, Supuran CT, Carta F (2013). Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors: a literature and patent review. *Expert Opin Ther Pat* 23(6): 725-735.
10. Supuran CT, Winum JY (2009). Drug Design of Zinc Enzymes. John Wiley & Sons, New Jersey 241-251.

11. Harju A-K, Bootorabi F, Kuuslahti M, Supuran CT, Parkkila S (2013). Carbonic anhydrase III: A neglected isozyme is stepping into the limelight. *J Enzyme Inhib Med Chem* 28(2): 231-239.
12. Vullo D, Franchi M, Gallori E, Antel J, Scozzafava A, Supuran CT (2004). Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Mitochondrial Isozyme V with aromatic and Heterocyclic Sulfonamides. *J Med Chem* 47(5): 1272-1279.
13. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* (7): 168–181.
14. Hofer M, Pagliusu SR, Hohn A, Leibrock J, Barok YA (1990). Regional distribution of brain derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9(8): 2459-2464.
15. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B (2000). Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 24 470(2): 113-117.
16. Lommatzsch M, Niewerth A, Klotz J, Schulte-Herbrüggen O, Zingler C, Schuff-Werner P (2007). Platelet and plasma BDNF in lower respiratory tract infections of the adult. *Respir Med* 101(7): 1493-1499.
17. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL (2002). The Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Confers Susceptibility to Bipolar Disorder: Evidence from a Family-Based Association Study. *Am J Hum Genet* 71(3): 651–655.
18. Devin K, Binder A, Helen E, Scharfman B (2004). Brain-derived Neurotrophic Factor. *PMC* 22(3): 123-131.
19. Noble E, Billington C, Kotz C, Wang C (2011). The lighter side of BDNF. *Am J Physiol* 300(5): R1053-1069.
20. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci* 92: 8856-8860.

21. Rosas-Vargas H, Martínez-Ezquerro JD, Bienvenu T (2011). Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch Med Res* 42(6): 482-494.
22. Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* 19(6): 1290-1300.
23. Li B, Lang N, Cheng ZF (2015). Serum levels of brain-derived neurotrophic factor are associated with diabetes risk, complications, and obesity: a cohort study from Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Neurobiol* 53(8): 5492-5499.
24. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: An overview. *Curr Pharm Design* 14(7): 603–614.
25. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev* 23(2): 146–189.
26. Whitney Renner S (2017). Metabolic characterization of mice lacking carbonic anhydrase III. Doctoral dissertation, University of North Carolina Genet and Mol Biology Curriculum, Chapel Hill, 1-70.
27. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2012). *Biochemistry*. Sekizinci baskı. A Macmillan Education Imprint. New York; 264-277.
28. Jeffery S, Carter ND, Wilson C (1984). Carbonic anhydrase II isoenzyme in rat liver is under hormonal control. *Biochem J* (221): 927-929.
29. Nagao Y, Platero JS, Waheed A, Sly WS (1993). Human mitochondrial carbonic anhydrase: cDNA cloning, expression, subcellular localization, and mapping to chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 90, 7623-7627.
30. Jude KM, Wright SK, Tu C, Silverman DN, Viola RE, Christianson DW (2002). Crystal Structure of F65A/Y131C-Methylimidazole Carbonic Anhydrase V Reveals Architectural Features of an Engineered Proton Shuttle. *Biochem* 41(8): 2485-2491.
31. Carmen Diez-Fernandez PhD, Véronique Rüfenacht MSc, Saikat Santra MD, Allan M. Lund MD, DMSc, René Santer MD, Martin Lindner MD, Trine Tangeraas PhD, Caroline Unsinn MD, Pascale de Lonlay MD, Alberto Burlina MD, Clara D. M. van Karnebeek MD, PhD & Johannes Häberle MD (2016). Defective hepatic

- bicarbonate production due to carbonic anhydrase VA deficiency leads to early-onset life-threatening metabolic crisis. *Genet Med* (18):649.
32. Shah GN, Morofuji Y, Banks WA, Price TO (2013). High glucose-induced mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mouse cerebral pericytes is reversed by pharmacological inhibition of mitochondrial carbonic anhydrases: Implications for cerebral microvascular disease in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 440(2): 354-358.
 33. Jitrapakdee S, Wallace JC (1999). Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 340(Pt 1): 1–16.
 34. Jitrapakdee S, Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV (2008). Structure, Mechanism and Regulation of Pyruvate Carboxylase. *Biochem J* 413(3): 369–387.
 35. Zu X, Zhong J, Luo D, Tan J, Zhang Q, Wu Y, Liu J, Cao R, Wen G, Cao D (2013). Chemical genetics of acetyl-CoA carboxylases. *Molecules* (18): 1704-1719.
 36. Montgomery R, Thomas W, Spector AA (2000). *Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım*. Altıncı baskı. Palme Yayıncılık, Ankara.
 37. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2005). *Principles of Biochemistry*. Üçüncü baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; 770-791.
 38. Murayama Y, Mochizuki K, Shimada M, Fujimoto S, Nukui K, Shibata K (2009). Dietary supplementation with alpha-amylase inhibitor wheat albumin to high-fat diet-induced insulinresistant rats is associated with increased expression of genes related to fatty acid synthesis in adipose tissue. *J Agric Food Chem* 57(19), 9332–9338.
 39. Maggie SS, James M (2010). Genetic control of *de novo* lipogenesis: role in diet-induced obesity of nutritional sciences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45(3): 199–214.
 40. Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N (2014). *De novo* lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 63(7): 895-902.

41. Maria M. Mihaylova and Reuben J. Shaw (2011). The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat Cell Biol* 13(9): 1016–1023.
42. Matthews VB, Astrom MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerstrom T, Yanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA (2009). Brain derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 15(8): 41-43.
43. Nakagawa T, Ono-Kishino M, Sogawa E, Yamanaka M, Taiji M, Noguchi H (2002). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 18(3): 185-191.
44. Rios M (2013). BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci* 36(2): 83-90.
45. Teillon S, Calderon GA, Rios M (2010). Diminished diet-induced hyperglycemia and dyslipidemia and enhanced expression of PPARα and FGF21 in mice with hepatic ablation of brain-derived neurotrophic factor. *J Endocrinol* 205: 37-47.
46. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Apr; 15(4): 798-808.
47. Özkanlar S, Abidin İ, Aktaş MS, Erol HS, Gür C, Nergis U, Polat H (2016). BALB/C, BDNF Homozigot (+/+) ve BDNF Heterozigot Transgenik (+/-) Farelerde Glukoz, Lipid ve Protein Parametrelerinin Karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg* 11(1): 47-53.
48. Nishimori I, Vullo D, Innocenti A, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT (2005). Carbonic Anhydrase Inhibitors. The Mitochondrial Isozyme VB as a New Target for Sulfonamide and Sulfamate Inhibitors. *J. Med. Chem* 48(24): 7860-7866.
49. Ming-Chang Chiang, Hui-Mei Chen, Yi-Hsin Lee, Hao-Hung Chang, Yi-Chih Wu, Bing-Wen Soong, Chiung-Mei Chen, Yih-Ru Wu, Chin-San Liu, Dau-Ming Niu, Jer-Yuarn Wu, Yuan-Tsong Chen¹ and Yijuan Chern (2007). Dysregulation of

C/EBPa by mutant Huntingtin causes the urea cycle deficiency in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* Vol. 16, No (5) 483-498.

50. Fasshauer M, Bluher M (2015). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 36(7): 461-70.
51. Raisanen SR, Lehenkari P, Tasanen M, Rahkila P, Harkonen PL, Vaananen HK (1999). Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide induced apoptosis. *FASEB J* 13: 513-522.
52. Lynch CJ, Brennan WA, Vary JR. T. C, Carter N, Dodgson SJ (1993). Carbonic anhydrase III in obese Zucker rats. *Am J Physiol* 264: 621-630.



10. EKLER

10.1. Ek 1

Ek 1. Beslenme süresince kullanılan kontrol yemin (D12450J) içeriği

D12450J kodlu yem içeriği	% g	% kcal
Protein	19.2	20
Karbohidrat	67.3	70
Yağ	4.3	10
Toplam kcal/g	3.85	100
Bileşenler	g	kcal
Kazein	200	800
L-Sistin	3	12
Mısır nişastası	506.2	2024.8
Maltodekstrin 10	125	500
Sukroz	68.8	275.2
Selüloz	50	0
Soya yağı	25	225
Domuz yağı	20	180
Mineral karışımı	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat.H ₂ O	16.5	0
Vitamin karışımı	10	40
Kolin bitartarat	2	0
Sarı gıda boyası	0.04	0
Mavi gıda boyası	0.01	0

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI

KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

Sayı: 53488718 - 745
Konu: Onay Belgesi

Tarih: 18/12/2015

Sayın: Prof. Dr. E. Edip KEHA
Tıbbi Biyokimya ABD.

"De Novo Lipogeneze'de Karbonik Anhidraz II, III, V İzoenzimleri ile Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF) Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" başlıklı 2015/45 protokol no.lu tez çalışması incelenmiş olup bilimsel ve etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Bilal KUTRUP
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı V.

12. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Fazilet YALDUZ
Doğum Tarihi/Yeri	1985/ŞAVŞAT
E-posta	faziletyalduz@hotmail.com
Adres	KTÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AbD, TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Üniversite	Fakülte/Bölüm	Yıl
Doktora	KTÜ	SABE/Tıbbi Biyokimya AbD	2018
Yüksek Lisans	KTÜ	SABE/Tıbbi Biyokimya AbD	2012
Lisans	KTÜ	Fen-Edebiyat Fak./Kimya	2009

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR/BİLDİRİLER

Yüksek Lisans Tezi: Hipotiroidili ve Hipertiroidili Hastalarda CA I ve CA II Otoantikorları ile Oksidatif Stes Parametleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi (Danışman: Prof. Dr. E. Edip KEHA), 2012.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Yalduz F, Keha EE. Hipotiroidili ve Hipertiroidili Hastalarda CA I ve CA II Otoantikorları ile Oksidatif Stes Parametreleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi, XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Konya, 2012.