

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

OBEZİTE İLE İNDÜKLENEN KRONİK İNFLAMASYONUN *DROSOPHILA*
MODEL ORGANİZMASI KULLANILARAK ANALİZ EDİLMESİ

Mehtap ŞAHİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

OBEZİTE İLE İNDÜKLENEN KRONİK İNFLAMASYONUN DROSOPHİLA MODEL ORGANİZMASI KULLANILARAK ANALİZ EDİLMESİ

Mehtap ŞAHİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Obezite kronik bir hastalık olup, 21. yüzyılın en büyük küresel sağlık sorunu olarak salgın haline gelmiştir. Obezite, birbiriyle bağlantılı çok sayıda değişken içeren karmaşık bir sorun olduğu için basit yaklaşımları ele alan sağlık uygulamaları ile bu hastalığa yönelik net ve iyi bir çözüm sunulması oldukça zordur. Bu karmaşık ağın incelenerek bütünsel yaklaşımların geliştirilmesinde uygun deney sistemi oluşturabilmek obezite araştırmalarının en önemli ve zorlayıcı konularından biridir. Bu tez kapsamında, metaflamasyon, insülin direnci ve adiposit fonksiyon bozukluğunun temel nedeni olan adipoz doku makrofaj (ATM) infiltrasyonunun altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatabilmek için yeni bir *Drosophila* modeli (*P0206>CG7839^{RNAi}*) kullanılmıştır. Bu *Drosophila* modelinde, GAL4/UAS genetik sisteminin ve evrimsel olarak korunmuş metabolik yolların avantajlarından faydalanılarak protoraks dokuya özgü olarak ecdison sentezi baskılanmıştır ve larval dönemden pupa dönemine geçiş için gerekli olan yeterli ecdison hormonunun sentezlenmemesi sonucunda beslenmeye bağlı olan larval dönem uzatılmıştır. Böylece *ad libitum* beslenen larvalarda hiperfaji modeli oluşturularak memelilerdeki obeziteye benzer özelliklere sahip oldukları ortaya koyulmuştur. Ayrıca, memeli adipoz doku ve karaciğerinin fonksiyonel homoloğu olan fat body dokusunda bağışıklık hücre (hemositler) infiltrasyonu gerçekleştiği gösterilmiştir ve memeli ATM infiltrasyonunun *Drosophila* versiyonu *P0206>CG7839^{RNAi}* modelinde tanımlanmıştır. Bu tez çalışması, *egr¹* ve *egr^{1AG}* mutant sinek soyları aracılığı ile Eiger/TNF α sinyal yolağının inhibisyonu sonucunda ATM infiltrasyonunda dramatik bir azalma olduğunu ve metabolik hasar ile ilişkili olan Eiger/TNF α sinyal yolağının grindelwald reseptörü aracılığı ile ATM infiltrasyonunu engellediği gösterilmiştir. Böylece, *D. melanogaster*'da obezite ile ilişkili makrofaj infiltrasyonunun mekanizması ilk kez ve geçerli olarak *P0206>CG7839^{RNAi}* modeli aracılığıyla gösterilmiştir. Verilerimiz, ATM infiltrasyonunu tetikleyen anahtar mekanizmaların evrimsel olarak korunduğunu ve obezite ile indüklenen kronik inflamasyonun en erken moleküler etiyolojisini oluşturan ATM infiltrasyonundaki kritik yolları daha iyi anlamak için geliştirilecek *Drosophila* modellerine öncülük edebileceğini göstermektedir. Modelimizin aynı zamanda genetik taramalar gerçekleştirmek veya metabolik hastalıklara yönelik yeni terapötik müdahalelerin etkinliğini ve güvenliğini test etmek için de değerli bir araç olarak umut vadetmektedir. Ayrıca bu modelin, steroid hormonları, metabolizma ve obezite arasındaki henüz aydınlatılamayan karmaşık ilişkileri düzenleyen mekanizmaların araştırılması için faydalı bilgiler sağlayacağı da düşünülmektedir.

Ağustos, 2023, 99 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, obezite, Eiger, TNF, Nimrod, makrofaj

ABSTRACT

PhD Thesis

ANALYSIS OF OBESITY INDUCED CHRONIC INFLAMMATION USING DROSOPHILA MODEL ORGANISM

Mehtap ŞAHİN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Obesity is a chronic disease and has become the biggest global health problem in the 21st century. Since obesity has complex ethiology with numerous interconnected variables, it is significant challenge to provide a clear, well-defined solution to this disease with simple weight loss centered approaches. Finding the appropriate experimental system for the development of holistic approaches by examining this complex network is one of the most important and challenging issues of obesity research. Within the scope of this thesis, a novel *Drosophila* model (*P0206>CG7839^{RNAi}*) was used to elucidate the molecular mechanisms underlying adipose tissue macrophage (ATM) infiltration that root cause of metaflammation, insulin resistance and impairment of adipocyte function. In this *Drosophila* model, we took advantage of the GAL4/UAS genetic system and evolutionary conserved metabolic pathways to reduce ecdysone levels specific to prothoracic gland to prolong the nutritial larval stage so these animals exhibit hyperphagia behavior with *ad libitum* feeding and as a consequence features resembling obesity in mammals. Moreover, we observed a significant infiltration of immune cells (hemocytes) in the fat bodies which is functionally analogous to the mammalian liver and adipose tissue so *Drosophila* version of ATM infiltration course was characterized in the *P0206>CG7839^{RNAi}* model. In this thesis, it has been demonstrated that there is a dramatic decrease in ATM infiltration as a result of inhibition of the Eiger/TNF α signaling pathway by used *egr¹* and *egr^{1AG}* mutant fly strains and that the Eiger/TNF α signaling pathway, which is associated with metabolic damage, inhibits ATM infiltration via the grindelwald receptor. Thus, the mechanism of obesity-associated macrophage infiltration in *D. melanogaster* was first and validly demonstrated through the *P0206>CG7839^{RNAi}* model. Our data suggest that the key mechanisms triggering ATM infiltration are evolutionarily conserved in *Drosophila* and can lead to development of *Drosophila* models to better understand the critical pathways in ATM infiltration that constitute the earliest molecular etiology of obesity-induced chronic inflammation. Our model is promosing valuable tool either to perform genetic screens or to test the efficacy and safety of novel therapeutic interventions for metabolic diseases. In addition, it is thought that this model will provide a convenient platform and useful information to investigate the mechanisms regulating the complex relationships between steroid hormones, metabolism and obesity, which have not yet been clarified.

August 2023, 99 pages

Key Words: *Drosophila melanogaster*, obesity, Eiger, TNF, Nimrod, macrophages

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel bilgi birikiminden faydalandığım, ileri görüşlülüğü ile akademik hedeflerimi gerçekleştirmem için bana yol açan, tecrübelerini yol haritası olarak kullandığım, eşitlik ve insancıl davranış ilkelerini her koşulda hayata geçiren ve bu zorlu süreçte desteğini esirgemeyen, çok kıymetli danışmanım ve hocam Sayın Prof. Dr. Özlem Yıldırım' a,

Tezimin laboratuvar çalışmaları sürecinde bilimsel deneyimleri ile bana yol göstererek teşvik edici bir ortamda bilimsel bakış perspektifimi genişletmemi sağlayan ve her zaman koşulsuz desteğini sunan CIBIO Araştırma Merkezi Hücre Büyüme Metabolizması Laboratuvar Başkanı Prof. Dr. Paola Bellosta' ya,

Tez çalışmamın gelişimine değerli görüşleri ve soruları ile katkı sağlayan TİK üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Reyhan Çolak ve Sayın Prof. Dr. Gülçin Sağdıçoğlu Çelep' e,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, akademik eğitimim boyunca desteklerini cömertlikle ve sabırla sunan sevgili annem Hayriye Şan Şahin, babam SALİH Şahin ve kardeşim Berkay Rafet Şahin'e şükranla sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Mehtap ŞAHİN
Ankara, Ağustos, 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Obeziteye Genel Bakış	4
2.2 Beden Kitle İndeksi (BKİ)	5
2.3 Obezitenin Nedenleri	8
2.4 Metabolik Komplikasyonlar	9
2.5 Memeli Adipoz Dokusu	12
2.6 Adipoz Doku İnflamasyonu.....	17
2.7 Adipoz Doku Makrofajları.....	22
2.8 <i>Drosophila melanogaster</i>	24
2.9 <i>Drosophila</i> Yaşam Döngüsü	27
2.10 <i>Drosophila</i> Fat Body.....	30
2.11 <i>Drosophila</i> Makrofajları.....	32
2.12 <i>Drosophila</i> Obez Model Yaklaşımları	34
2.13 <i>Drosophila</i> Genetiği.....	35
2.14 <i>Drosophila</i> Genetiğinde Kullanılan Genetik Yöntemler.....	36
2.14.1 RNA interferans (RNAi) tekniği.....	36
2.14.2 GAL4-UAS sistemi	37
2.15 Obezitede İnsülin Sinyal Yolağı.....	38
2.16 <i>Drosophila</i> İnsülin Sinyal Yolağı	40
2.17 TNF-a Sinyal İletim Yolağı	41
2.18 <i>Drosophila</i> TNF-a Sinyal İletim Yolağı.....	43
2.19 Obez <i>Drosophila</i> P0206>CG7839RNAi Modeli.....	45
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	49
3.1 Materyal.....	49
3.2 Yöntem	50
3.2.1 Çaprazlamada kullanılan <i>Drosophila</i> hatları	50
3.2.2 Sinek besiyerinin hazırlanması	53
3.2.3 Sineklerin cinsiyet ayrımının yapılması	55
3.2.4 Sinek kültürü	57
3.2.5 Çaprazlama ile deney gruplarının oluşturulması	58

3.2.6 Rekombinant ve mutant sinek hatlarının oluşturulması.....	59
3.3 <i>Drosophila</i> Larval Boyut ve Ağırlık Analizi	60
3.4 <i>Drosophila</i> Larval Fat Body Analizi.....	60
3.4.1 <i>Drosophila</i> larval fat body diseksiyonu ve floresan boyama teknikleri	60
3.4.2 Larval fat body hemositlerin kantitatif analizi	62
3.4.3 Larval fat body hemosit infiltrasyon analizi.....	62
3.5 İstatistiksel Analiz	63
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	64
4.1 <i>Drosophila</i> Larval Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	64
4.2 <i>Drosophila</i> Larval Fat Body Histopatolojik Değerlendirilmesi	65
4.3 <i>Drosophila</i> Fat Body Hemositlerinin Kantitatif Analizi	66
4.4 İmmunohistokimya Bulguları	69
4.5 TNF- α /eiger sinyali ile hemosit arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi	70
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	73
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ.....	99

SİMGELER DİZİNİ

A	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
°C	Celsius derece
CO ₂	Karbon dioksit
gr	Gram
μ m	Mikrometre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
nM	Nanomolar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
Mb	Mega baz çifti

Kısaltmalar

AGE	İleri glikasyon son ürünleri
Akh	Adipokinetik hormonu
ADM	Adipoz doku makrofajları
ATGL	Adipoz trigliserit lipaz
BDSC	Bloomington <i>Drosophila</i> Stok Merkezi
BKİ	Beden Kitle İndeksi
CA	Corpora allata
cAMP	siklik adenzin monofosfat
CC	Korpo kardiyaka
CLS	Taç benzeri yapılar
CRP	C-reaktif protein

DAG	Diaçilgliserol
Dilp	<i>Drosophila</i> insülin benzeri peptidler
ECM	Ekstraselüler matriks
Egr	Eiger
ETS	Elektron taşıma sistemi
ER	Endoplazmik retikulum
FoXO	Forkhead box faktörü
GLUT4	Glukoz kanalı 4
GPCR	G protein reseptörü
Grnd	Grindelwald
GS	Glukojen sentaz
GSK3	Glukojen sentez kinaz3
G3P	Gliserol-3-fosfat
HDL	Yüksek yoğunluklu
HSL	Hormon duyarlı lipaz
IPCs	İnsülin üreten hücreler
IRS	İnsülin reseptör substrat
IKK	κ kinaz inhibitörü
JNK	c-jun N-terminal kinaz
MAG	Monoaçilgliserol
MGL	Monoaçilgliserol lipaz
MAPK	Mitojen ile aktive edilen kinaz
MCP1	Makrofaj
MCR4	Melanokortin-4 reseptörü
MetS	Metabolik sendrom
MyD88	Miyeloid farklılaşma 88 protein
NAYKH	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı
NCEP-ATP III	Ulusal Kolesterol Eğitim Programı-Erişkin Tedavi Paneli III
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
NIG-Fly	Ulusal Genetik Enstitüsü-Fly
NimC1	Nimrod
NO	Nitrik oksit
PG	Protorasik doku
PI3K	Fosfotidilinozitol-3 kinaz

PKA	Protein kinaz A
Plin1	Perilpin 1
PPAR γ	Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör γ
ProPO	Pro-fenoloksidaz
PTTH	Protrosikotropik hormon
RNAi	RNA interferans
RISC	RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksi
ROS	Reaktif oksijen türleri
SAPK	Stres ile aktive olan protein kinaz
SYA	Serbest yağ asidi
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
TNF	Tümör nekroz faktör
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
T2DM	Tip 2 diyabet mellitus
TG	Trigliserid
TNFR	TNF reseptörü
UV	Ultraviyole
VDRC	Viyana <i>Drosophila</i> Kaynak Merkezi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 2016 yılında dünya genelinde yetişkinlerde görülen obezite oranı.....	5
Şekil 2.2 L4-L5 disk seviyesindeki VAT ve SAT görüntüsü	7
Şekil 2.3 SHC-MAPK yolu üzerinden uyarılan ikinci insülin sinyal yolağı	11
Şekil 2.4 Adipositlerin genişlemesi ve küçülmesi	14
Şekil 2.5 Beyaz adipoz dokuda bulunan hücre popülasyonu	16
Şekil 2.6 Adipoz dokunun histolojik görüntüleme ile değerlendirilmesi.....	17
Şekil 2.7 Adipoz doku makrofaj infiltrasyonu.....	20
Şekil 2.8 TLR4 yolağının aktivasyonu ile enflamasyon yanıtın indüklenmesi.....	21
Şekil 2.9 Adipoz doku makrofaj infiltrasyonu ile oluşan CLS yapıları	23
Şekil 2.10 <i>Drosophila melanogaster</i> dişi (solda) ve erkek (sağda) birey	25
Şekil 2.11 <i>Drosophila</i> yaşam döngüsü ve gelişim dönemleri.....	28
Şekil 2.12 Yüzük dokusundaki protorasik bezin şematik gösterimi	29
Şekil 2.13 <i>Drosophila</i> gelişim süreci ve ecdison titreleri	30
Şekil 2.14 <i>Drosophila</i> larval fat body A) Şematik gösterim B) Fat body doku görüntüsü.....	31
Şekil 2.15 <i>Drosophila</i> fat body immün, metabolik ve hematopoietik sistemleri içerir	31
Şekil 2.16 <i>Drosophila</i> hemosit morfolojilerinin şematik gösterimi.....	33
Şekil 2.17 <i>D. melanogaster</i> dişi ve erkek kromozomları	35
Şekil 2.18 RNAi mekanizmasının şematik gösterimi	37
Şekil 2.19 GAL4-UAS sistemi.....	38
Şekil 2.20 İnsülin sinyalinin etki mekanizması	39
Şekil 2.21 IRS molekülünü aktive eden tirozin (pY) fosforilasyonu ve inaktive eden ser/thr (pS) fosforilasyonu	40
Şekil 2.22 <i>Drosophila</i> insülin benzeri peptidlerin (ILPs) CHICO aracılı sinyal iletimi	41
Şekil 2.23 TNF- α sinyal iletim yolağı.....	43
Şekil 2.24 İnsan ve <i>Drosophila</i> JNK yolağının insülin etki mekanizması	45
Şekil 2.25 Kontrol (A) ve P0206>CG7839RNAi larvalarından alınan protorasik bez (B)	46
Şekil 2.26 Protorasik dokuda CG7839RNAi ifadesinin ecdison seviyeleri üzerindeki etkisi	46
Şekil 2.27 Tüm larvada TAG ve serbest yağ asidi seviyeleri	47
Şekil 2.28 brummer lipaz gen ifadesi seviyeleri	47
Şekil 3.1 Dengeleyici ve belirteçlerden kıvrık kanat (CyO) (A), sert kıl yapısı (MKRS) (B), daha yoğun kıl miktarı (TM6b) (C).....	53
Şekil 3.2 CyO dengeleyici kromozomuna sahip kıvrık kanatlı sinek	53

Şekil 3.3 Sinek besiyerinin hazırlanışı	54
Şekil 3.4 <i>D. melanogaster</i> cinsiyet tayini dişi (üst), erkek (alt)	55
Şekil 3.5 <i>D. melanogaster</i> çalışma istasyonu ve anestezi pedi	56
Şekil 3.6 a) Bakire dişi sineklerdeki mekonyum yapısı b) bakire sineklerin toplanması	57
Şekil 4.1 P0206-Gal4 (5. gün), P0206-Gal4;UAS-Ni (5. ve 12. gün) larva boyutları.....	64
Şekil 4.2 <i>P0206-Gal4</i> (5. gün) ve <i>P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (5. ve 12. gün) larval ağırlıkları.....	65
Şekil 4.3 Fat body hücreleri ve hücrelerin lipid damlacıkları içeriği (40×).....	66
Şekil 4.4 Fat body histolojik hücre boyut analizi.....	66
Şekil 4.5 Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni larva modelinin yaşamlarının 12. gününd e fat body hemositlerinin immünofloresan analizi (10×)	68
Şekil 4.6 Fat body dokusunda bulunan hemositlerin oranları.....	68
Şekil 4.7 P0206-Gal4;UAS-Ni larva modelinde fat body dokusunda Hoechst boyama ile nükleusların ve Hml-Ds-RFP ile etiketlenmiş hemositlerin konfokal görüntüleri (20×)	69
Şekil 4.8 Fat body hücrelerinde TNF/eiger sinyalinin hemosit birikimi ile ilişkisi	71
Şekil 4.9 <i>egr¹</i> ve <i>egr^{1AG}</i> mutasyonlarının hemosit infiltrasyonu üzerindeki etkisi.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Metabolik sendrom tanısı için kullanılan kriterler.....	12
Çizelge 3.1 Sinek hatları, ifade özellikleri ve kaynakları	50
Çizelge 3.2 <i>D. melanogaster</i> genotipleri ve kullanılan sinek hatları	51
Çizelge 3.3 Sinek besiyerinin içeriği	54
Çizelge 4.1 Kontrol grupları arasında hemosit migrasyonunun karşılaştırılması	72



1. GİRİŞ

Obezite genel sağlığı ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyen, sağlık sisteminde ağır bir yük oluşturan, karmaşık etiyolojiye sahip olan en önemli küresel sağlık sorunlarından biridir. Obezite prevalansı küresel olarak dünya genelinde hızla artmakta olup, 1975 ve 2016 yılları arasında üç katına çıkarak bulaşıcı hastalıklarda olduğu gibi küresel bir salgın boyutuna ulaşmıştır (WHO 2021).

Obezite, besinlerle alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olduğu durumun sürekliliği halinde oluşan fazla enerjinin vücutta aşırı yağ olarak depolandığı bir sağlık sorunu olarak tanımlanır. Günümüzde küresel olarak hareketsiz yaşam tarzına geçiş ve enerjisi yüksek işlenmiş gıda tüketiminin artması sonucunda obezogenik çevreye maruz kalmak obezite riskini artıran en önemli nedenlerden biridir. Obezitenin etyopatogenezi son derece karmaşık olup, aşırı ve/veya yanlış beslenme alışkanlıklarının yanında genetik yatkınlık, davranış, sosyo-ekonomik gibi faktörler ve bunların birbirleri ile etkileşimi obezitenin ortaya çıkmasına neden olur. Obezitenin gelişiminde rol oynayan etkenler vücudun enerji metabolizmasının bozulmasına ve aynı zamanda bireylerin epigenetik kalıtımını değiştirerek gelecek nesillerin obeziteye yatkınlığının artmasına neden olmaktadır (WHO 2021, Wen vd. 2022). Epidemiyolojik çalışmalara göre obezite salgının devam etmesi durumunda 2025 yılına kadar her beş kişiden birinde obezitenin görüleceği tahmin edilmektedir. Ayrıca obezite başta tip 2 diyabet olmak üzere kardiyovasküler rahatsızlıklar, karaciğer hastalıkları, metabolik sendrom, Alzheimer, osteoartrit ve bazı kanser türleri (meme, kolon, karaciğer, prostat) gibi yaşamı tehdit eden hastalıklar için oldukça yüksek bir risk faktörü olup, obezite prevalansı ile birlikte bu hastalıkların görülme sıklığı artmaktadır (Grundy 2000, WHO 2021).

Adipoz doku enerji depolamak ve kullanmak için rezervuar fonksiyonuna sahip olmasının yanında enerji taleplerini algılayarak enerji homeostazının düzenlenmesinde rol oynar. Adipoz dokuda bulunan adipositler fazla enerjiyi depolayabilmek için genişleyebilme özelliğine sahiptirler. Obezite sürecinde oluşan aşırı enerjinin depolanması ile adipositlerin boyutlarının eşik düzeyine ulaşması sonucunda adipoz dokuda metabolik sisteme hasar veren bazı değişiklikler meydana gelir. Adiposit hipertrofisi, hipoksi,

adiposit hücre ölümü ve adipoz doku makrofaj (ADM) infiltrasyonu ile sonuçlanan bu histolojik değişiklikler obezite ile birlikte adipoz dokunun immünolojik özellik kazanmasına ve kronik enflamasyon gelişimine neden olmaktadır. Obezite ile indüklenen enflamasyon, insülin sinyal yolağı ile birleşerek insülinin etkinliğini bozar, bu durum insülin direncinin başlıca nedeni olarak kabul edilir. Obezite ile indüklenen kronik enflamasyonun metabolik düzensizliklere yol açarak insülin direncine neden olması, metabolik ve enflamatuvar yollar arasındaki ilişkinin mekanik yönünü ortaya koymaktadır (Solinas ve Karin 2010, Hotamışlıgil 2017). Obezite ve obeziteye bağlı gelişen hastalıkların ortak paydasını insülin direncinin oluşturduğu göz önüne alındığında, enflamasyon ve metabolik yollar arasındaki etkileşime odaklanmak olası terapötik ajanlar ve önleyici tedavi seçenekleri için günümüzde oldukça önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir (van den Brink vd. 2019).

Obezite önlenabilir ve tedavi edilebilir bir hastalıktır. Bu nedenle obezitenin erken dönemde fark edilmesi ve obezite ile ilişkili patolojilere karşı gerekli önlemlerin alınması yaşamsal önem taşımaktadır. Obezite tedavisinde yaşam boyunca hedeflenen sağlıklı beslenme alışkanlıkları, kalori sınırlandırılması ve eversiz gibi yaşam tarzı değişiklikleri kilo kontrolünde oldukça etkili sonuçlar verse de verilen kiloyu kalıcı bir şekilde korumak son derece zordur (Wen vd. 2022). Obezitede bağışıklık ve metabolik yolların birleşmesi ile hücre fonksiyonu bozulmaktadır. Bu nedenle antienflamatuvar etkiye sahip terapötik stratejilerin geliştirilmesi ile hücresel homeostazın sağlanmasını amaçlamak obezite ile daha etkili bir şekilde savaşmayı mümkün kılarak morbidite ve mortaliteyi azaltacaktır (Gregor ve Hotamışlıgil 2011).

Obezitede kronik enflamasyona bağlı hastalıkların önlenmesine yönelik tedavilerin geliştirilmesinde enflamasyonun ilk tetikleyicisinin ve hiyerarşik mekanizmaların aydınlatılması son derece önemlidir. Buna yönelik araştırmaların yapılabilmesi için uygun deneysel sistemlerin geliştirilebilmesi bir ihtiyaç haline gelmiştir. Meyve sineğı olarak bilinen “*Drosophila melanogaster*” obeziteye yönelik araştırmalarda ideal bir model olarak kullanılmaktadır. Obezite ile ilgili analog doku, organ ve sistemlere sahip olması, metabolik hastalıklar ile ilişkili çoğı genin evrimsel olarak korunmuş olması

meyve sineğinin uygun bir deney sistemi olarak kullanılmasının en önemli nedenleridir (Musselman ve Kuhnlein 2018).

Yukarıda kısaca basettiğimiz bilgiler ışığında, bu tez kapsamında “*Drosophila melanogaster*” modeli kullanılarak insanlarda obezite ile indüklenen kronik enflamasyon gelişimini en iyi şekilde temsil edebilecek deneysel sistem araştırılmıştır. Çalışmamızda, metabolik ve bağışıklık sistemlerini bir arada bulunduran, memeli adipoz dokusu ve karaciğerine analog olan, yağ, glikojen ve protein depolayan bir bez olan *Drosophila* “fat body” (yağ cisimciği) incelenmiştir. Bu çalışmada “*D. melanogaster*” modeli kullanılarak hemositler (makrofaj benzeri hücreler) olarak adlandırılan bağışıklık hücreleri ile adipositler (yağ cisimciği) arasındaki korunmuş fonksiyonel ilişki *in vivo* ortamda araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Obeziteye Genel Bakış

Obezite, vücut yağ dokusunun normal oranların üzerine çıkarak birikmesi ile fizyolojik fonksiyonları olumsuz etkileyerek morbidite ve mortalitesi yüksek çeşitli hastalıkların gelişiminde risk faktörü olan ve halk sağlığı tehdidi oluşturan multifaktöriyel patolojik bir durumdur (Chooi vd. 2019). Besleyici içeriğe sahip olan gıdaların, doymuş yağ ve basit karbonhidrat içeriği yüksek olan gıdalarla yer değiştirmesi sonucunda yetersiz beslenme olarak başlayan bu durumun uzun süre devam etmesi, tıbbi komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olur.

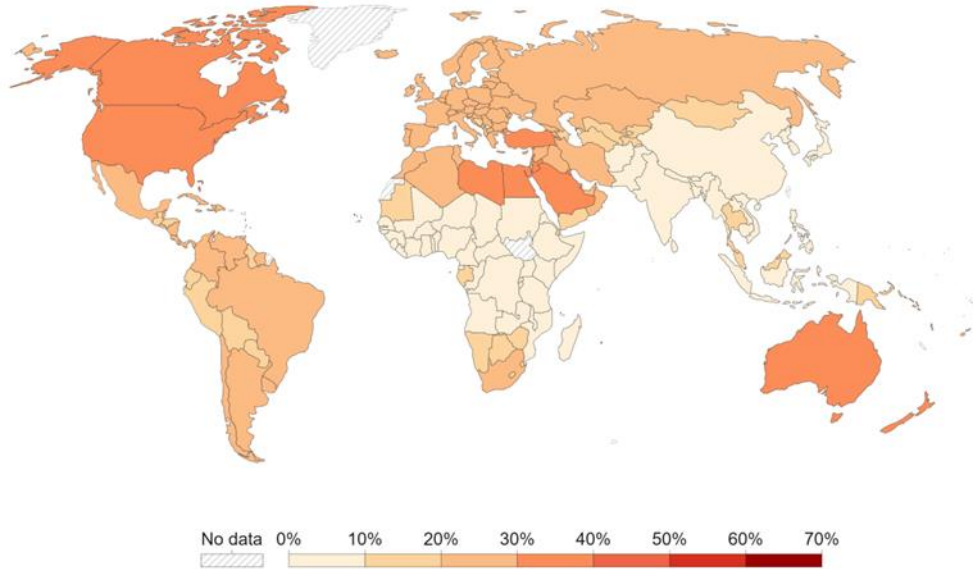
Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde obezite prevalansının geçtiğimiz on yıllar içinde dramatik bir biçimde artarak pandemi seviyelerine ulaştığı bildirilmiştir (Blüher 2019, Chooi vd. 2019). WHO verilerine göre dünya genelinde 2016 yılında, 1,9 milyardan fazla yetişkinin aşırı kilolu olduğu ve bunların 650 milyondan fazlasının obez olduğu ortaya konulmuştur (WHO 2021). Obezite prevalansındaki artışın devam etmesi durumunda 2030 yılına kadar dünya yetişkin nüfusunun %38'inin fazla kilolu ve diğer %20'sinin obez olacağı öngörülmektedir (Kelly vd. 2008).

Obezite, morbidite ve mortalitesi yüksek olan tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, osteoartrit ve kanser gibi kronik hastalıklara neden olur. Gelişmiş ülkelerde obezite ile ilişkili hastalıklara bağlı mortalite oranları en üst sıralarda yer almaktadır (Hruby ve Hu 2015). Küresel olarak, obeziteye bağlı ölüm oranı 2017'de 100.000'de 60 civarında olduğu bildirilmiştir. Ölüm oranları özellikle Doğu Avrupa, Orta Asya, Kuzey Afrika ve Latin Amerika'da yüksek olup Japonya ve Güney Kore ülkelerinde en düşük oranlara sahiptir. Obezite prevalansı ile ölüm oranlarının bağlantılı olduğu bilinmektedir. Ancak ülkeler arasında aynı obezite prevalansı için ölüm oranlarında farklılık görülebilmektedir. Bu durumun nedeni alkol, uyuşturucu, sigara, yaşam tarzı ve sağlık sistemleri gibi diğer faktörlerin ölüm oranlarını etkileyebilmesinden kaynaklanır (Ritchie ve Roser 2017). Kronik bir hastalık olarak tanımlanan obezite ile mücadele edebilmek için hastalığın hızlı ve doğru tanısı oldukça önemlidir. Bunun için tanı ve değerlendirmede kolay ulaşılır,

maliyeti düşük, çabuk sonuçlanan ve güvenilir yöntemler tercih edilmeli, toplum ve sağlık görevlileri bu konuda bilinçlendirilmelidir (Burki 2021).

2.2 Beden Kitle İndeksi (BKİ)

Beden Kitle İndeksi (BKİ), insan ağırlığının genel değerlendirilmesine yönelik kullanılan bir parametredir. Vücut yağ oranı ile uyumlu olabilen bir parametre olarak kabul edildiği için obez ve aşırı kilolu bireylerin ayırt edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. BKİ değeri sadece boy ve kilo ile ilişkilendirilerek kolayca hesaplanabilmektedir. Kilogram cinsinden vücut ağırlığının, metre cinsinden boyun karesine bölünmesiyle hesaplanan BKİ değerleri, 18,5'in altındaysa zayıf, 18,5-24,9 arasında ise normal kilolu, 25-29,9 arasında fazla kilolu, 30'un üzerinde ise obezite olarak sınıflandırılmaktadır. Obezite prevalansının takip edilmesinde BKİ sınıflandırması kullanılmaktadır. Buna göre dünya genelinde 18 yaş ve üstü yetişkinlerin 2016 yılında %13'ünün obez olduğu ve özellikle obezite oranlarının Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' de oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.1) (Lin ve Li 2021, WHO 2021).



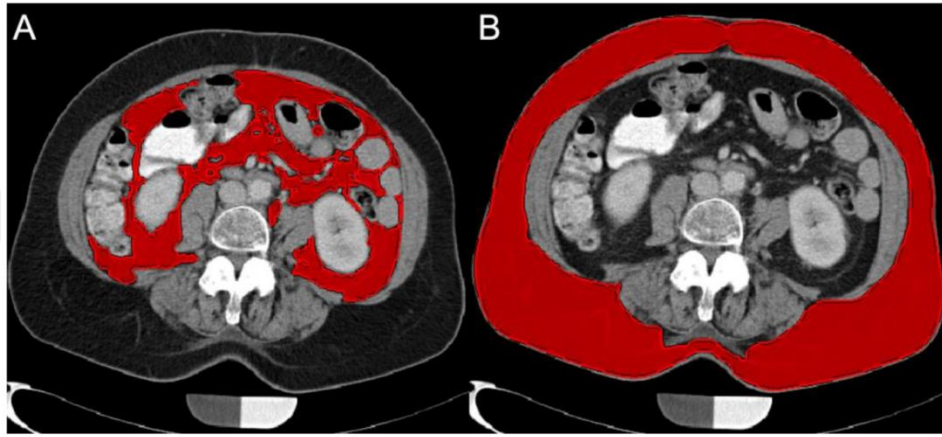
Şekil 2.1 2016 yılında dünya genelinde yetişkinlerde görülen obezite oranı (Ritchie ve Roser 2017)

BKİ vücut yağ miktarının genel bir göstergesi olup, bölgesel yağ dağılımları hakkında bir bilgi vermez ve doğrudan bir yağ ölçümü tekniği olmadığı için kas geliştiren sporcularda, hamilelerde, büyüme çağındaki çocuklarda, ileri derecede yaşlılarda, konjestif kalp yetmezliği veya böbrek yetmezliği gibi ödeme yol açan hastalıklarda yanıltıcı bilgi sağlayabilmektedir. Bu nedenle BKİ genel bir değerlendirme olarak kabul edilebilmektedir. Ancak cinsiyet, yaş ve etniğe göre kısmen sınıflandırabilen, kişiye göre değişkenlik gösterebilen, hassasiyeti olmayan bir ölçüm şeklidir. Bununla birlikte obezitenin kompleks bir hastalık olduğu düşünüldüğünde obezitenin tanımlanmasında basitçe BKİ değerlendirmesi tek başına yeterli değildir (Nuttall 2015). Obezitenin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine izin veren başka yöntemler mevcuttur.

Vücut yağ oranının ortalama olarak erkekte %25, kadında ise %33'ün üzerine çıkması obezite olarak tanımlanabilir ancak metabolik sağlığın belirlenmesinde BKİ sınıflandırması ve toplam vücut yağ kütlelerinden daha çok vücut yağının biriktiği vücut bölgesi metabolik komplikasyonlara neden olan riskler açısından daha önemli bir belirleyicidir (Vega 2001, Goossens 2017). Merkezi yağlanma (abdominal), periferik (kalça, bacak) yağlanmaya göre daha risklidir. Yağın abdominal bölgede toplanması obezite ile ilişkili morbitide ve mortalite sebebi olan patolojik bir yağlanma şeklidir. Yağın ekstremitelerde, gluteofemoral bölgede toplandığı periferik yağlanmada (jineoid tip obezite) ise hastalıklar için risk oluşumu abdominal obeziteye göre daha düşüktür. Normal kiloda ve normal BKİ değerine sahip olan bireylerde merkezi (abdominal) yağlanma görülebilirken, BKİ değerine göre obez olarak sınıflandırılmış bireylerde merkezi yağlanma görülmeyebilir (Goossens 2017, Wong vd. 2021). Bu nedenle metabolik sağlığın belirlenmesinde ve risk değerlendirmesinde bel çevresi ölçümü potansiyel patolojik yağ dokusunun belirlenmesinde doğruluğu kanıtlanmış önemli bir klinik ölçüm tekniğidir ve bu ölçüm tekniğinin kullanılmasının daha çok yaygınlaşması obezitenin önlenebilirliği açısından oldukça önemli yaşamsal bir belirteç haline gelmiştir (Ross vd. 2020).

Bilgisayarlı tomografi yöntemi ile elde edilen görüntülerde aynı bel çevresi ölçümüne sahip bireylerde deri altı (subkutanöz) veya visseral (intra-abdominal) olmak üzere iki farklı yağlanma tipinin görülebildiği ortaya koyulmuştur (Şekil 2.2). Visseral adipoz

doku (VAT), subkutanöz adipoz dokuya (SAT) kıyasla daha pro-enflamatuar bir profile sahip olup ektopik iç organ yağlanması ve insülin direncine yol açan metabolik komplikasyonların en önemli nedenidir (Bays 2014). Bu nedenle merkezi yağlanmada deri altı ve visseral adipozite arasındaki ayrımının iyi yapılması gereken durumlarda bel çevresi ölçümü yeterli değildir. Visseral obezitenin belirlenebilmesi için antropometrik (BKİ ve bel çevresi) ve metabolik (trigliserid ve HDL-Kolesterol) parametrelerin birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (Amato vd. 2010).



Şekil 2.2 L4-L5 disk seviyesindeki VAT ve SAT görüntüsü (Burian vd. 2021)

Biyoelektriksel impedans ölçümü, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, dual enerji x-ışını absorptiometrisi gibi teknikler kullanılarak vücut yağının bölgesel dağılımı ve oranı tespit edilebilmektedir. Ancak bu ölçüm tekniğinin maliyetleri yüksek olduğu için ve her hastanede/obezite merkezinde bulunmadığı için klinik uygulamalarda yaygın kullanılamamakta olup daha çok araştırmalarda kullanılmaktadırlar (Chooi vd. 2019, Nimptsch vd. 2019, Ross vd. 2020).

Obezite, multifaktöriyel kompleks bir hastalık olup klinik özellikleri oldukça heterojendir. Yaşam kalitesini ve süresini önemli derecede etkileyen obezite doğru teşhis ve tedavi ile düzeltilebilen bir hastalıktır. Obezite teşhisi BKİ, biyokimyasal parametreler, antropometrik ölçümler ve metabolik sağlık değerlendirmesine dayanmaktadır. Özellikle BKİ sınıflandırmasına göre obez olan bireylerden daha çok obezite hastalığına odaklanılması teşhis açısından çok önemlidir. Günümüzde obezite tedavisine yönelik bilgilendirmenin yapılabilmesi ve obezite prevalansının doğru bir şekilde

hesaplanabilmesi için obezitenin teşhisine yönelik yöntemlerin doğru bir şekilde uygulanması gerekmektedir (De Lorenzo vd. 2020, Z. Lin vd. 2021).

2.3 Obezitenin Nedenleri

Obezite tek bir nedene bağlı olmayıp; davranış, sosyo-ekonomik, çevresel ve genetik unsurlar gibi çeşitli faktörlerin kompleks etkileşiminin sonucunda indüklenmektedir. Obezitenin gelişimindeki en önemli nedenler, küresel olarak yaşam tarzı değişiklikleri, mikrobiyomun değişmesi, genetik yatkınlık ve epigenetik değişiklikler olarak belirtilmiştir (Hinney vd. 2010).

Obezitenin yayılması bulaşıcı hastalıkta olduğu gibi pandemik bir durumdur. Küresel olarak enerji yoğunluğu yüksek, besin değeri olmayan yiyecek ve içeceklerin aşırı tüketilmesi, sedanter yaşam tarzını oluşturan obesojenik çevre obezitenin ortaya çıkmasına neden olan en önemli etkidir. Günümüzde küresel olarak beslenme sistemini oluşturan gıdaların özellikle bitkisel lifler, mikro besinler, antioksidan ve polifenoller bakımından yoksun; kompleks karbonhidrat ve doymuş yağ içeriği bakımından yüksek olması ile birlikte bu gıdaların daha ekonomik ve kolay erişilebilir olması obezite salgınının en önemli nedenlerini oluşturmaktadır. Bunların yanında ayaküstü atıştırma davranışı, hızlı yemek yeme kültürü, hazır gıda tüketiminin artması, teknolojiye bağlı fiziksel aktivitenin azalması ve gece yemek-yeme alışkanlıkları da obezitenin gelişimindeki diğer önemli nedenlerdir (French vd. 2001, Bell vd. 2005).

Obezite ile ilişkili bazı genler çevresel faktörler ile etkileşimleri sonucunda vücut yağ kompozisyonunu, iştahı, besin alımını ve enerji harcama metabolizmasını etkileyerek obezite duyarlılığını artırabilmektedir. Obesojenik çevreye duyarlılıktaki bireysel farklılıklar genetik yatkınlık ile ilişkilidir (Bell vd. 2005). Obeziteye neden olan çevresel risk faktörlerine maruz kalmanın en önemli sonuçlarından biri de bireylerin epigenetik kalıtımını etkileyerek obeziteye yatkın nesillerin dünyaya gelmesidir (Wen vd. 2022). Obezitenin genetik nedenlerinden biri iştah ve vücut ağırlığını düzenleyen tek gen mutasyon çeşitleridir. İştah kontrolünü ve hipotalamusta tokluk sinyalini indükleyen bir hormon olan leptin ve leptin reseptörü geni olan melanokortin 4 reseptör (MCR4)

genindeki mutasyonlar erken başlangıçlı obeziteden ve hiperfajiden sorumludur (Llewellyn vd. 2014, Fairbrother vd. 2018). Konjenital leptin geni eksikliği ise normal doğum ağırlığından itibaren hızlı bir şekilde kilo alınmasına ve erken başlangıçlı obeziteye neden olmaktadır. Leptin-melanokortin yolağındaki proteinleri kodlayan genlerdeki problemler özellikle erken çocukluk döneminde hiperfaji ile birlikte çeşitli endokrin ve immün bozukluklara neden olarak şiddetli obeziteyi tetiklediği kanıtlanmıştır (Montague vd. 1997).

Ayrıca enerji homeostazının ve bağışıklığın korunmasında endokrin organ olarak fonksiyon gösteren bağırsak mikrobiyotası, obezitenin gelişiminde önemli bir rol oynar. Bağırsak disbiyozu toklukla ilgili gastrointestinal peptitlerin üretimini değiştirmesi sonucunda iştahın artmasına neden olarak obezite riskini artırır. Obezitede bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen değişiklikler yağ birikimine neden olarak obezitenin gelişiminden sorumlu olabilmektedir. Ayrıca bağırsak mikrobiyotası insan davranışını ve gıda seçimini etkileyebilmektedir (Gomes vd. 2018).

2.4 Metabolik Komplikasyonlar

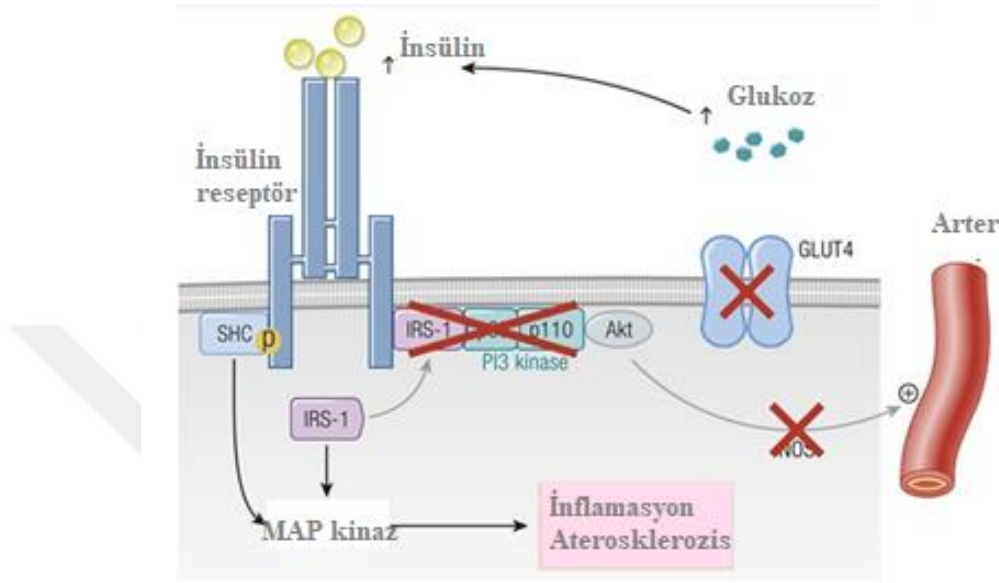
Açlık ve tokluk süreçlerindeki besin seviyelerindeki dalgalanmalara karşı yanıt oluşturabilmek yaşam için bir gerekliliktir. Besin kıtlığına karşı hücresel süreçlerin hayatta kalmaya yönelik olarak şekillendirilmesi evrimsel bir seçilimdir. Organizmalar açlık durumunda yaşamı tehdit eden bir durum olarak görülen hipoglisemiye karşı glukoz üretmek ve depolamayı desteklemek üzere çeşitli güçlü metabolik yollara sahiptirler. Bu metabolik adaptasyonlar hayatta kalmamızı sağlayan açlığa karşı avantaj sağlarken, küreselleşmenin getirdiği yaşam şekli ile aşırı enerji durumunda yaşamımızı tehdit eden obeziteye neden olan süreçten sorumludur. Aşırı besin ve enerji yükünün oluşturacağı risklere karşı önlemlerin geliştirilmesi evrimsel olarak desteklenmemiştir. Canlılar evrimsel olarak hipoglisemiyi ölümcül bir tehdit olarak algılarken, hiperglisemiyi ölümcül bir durum olarak algılamaz (Efeyan vd. 2015, Hotamışlıgil 2017). Hücre içi ve hücre dışı glukoz ve lipid seviyeleri hormonal olarak düzenlenmektedir. Örneğin glukagon hormonu açlık durumunda hipoglisemiye karşı kan glukoz değerlerini korumak

için karaciğerde gerçekleştirilen glikogenolizis veya glukoneogenezis aracılığı ile kana glukoz salınımını gerçekleştirir (Rizza 2010).

İnsülin, fazla besinin adipoz doku, karaciğer ve kas dokusunda glikojen ve lipid olarak depolanmasını uyaran sistemin anahtar hormonudur ve anabolik süreçleri uyarır. Ayrıca insülin, glukoneogenez gen ifadesini ve lipoliz gibi katabolik yolları inhibe ederek hepatik glukoz üretimini durdurur (Petersen ve Shulman 2018). İnsülin bu etkileri ile adiposit metabolizmasının önemli bir düzenleyicisidir (Kahn ve Cushman 1985). Obezitenin gelişimi ile birlikte bu sistemin bozulması tip 2 diyabet mellitus (T2D), alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), metabolik sendrom (MetS) ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi metabolik komplikasyonlara neden olur. Bu metabolik hastalıkların temelinde adipoz dokunun fonksiyonunu kaybetmesi ve enflamatuvar özellik kazanması sonucunda gelişen insülin direnci bulunmaktadır. İnsülin direncinde fizyolojik olmayan yüksek plazma glukoz değerleri hiperglisemiye neden olur ve bu durum diyabetin erken evrelerinde görülen klinik bir semptomdur (Kahn 2003). İnsülin direnci adipoz dokuda lipolizi uyarak serbest yağ asidi salınımı ile birlikte hiperlipidemiye neden olur. Karaciğerde ektopik lipid birikimine neden olan bu durumun NAYKH patogenezinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. NAYKH şiddetlenerek sırası ile karaciğer hasarı, fibrozis, siroz ve hepatoselüler karsinoma ile sonuçlanabilmektedir (Shields vd. 2009).

İnsülin etkisini iki ayrı yolak üzerinden gerçekleştirir. IRS (İnsülin reseptör substrat)-fosfotidilinozitol-3 kinaz (PI3K)-AKT yolağı ile hücre içine glukoz alımı, glikojen sentezi sağlanırken, Shc-MAPK (mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz) yolağı ile büyüme ve mitojenik etkiler gerçekleşir (Lebovitz 2001). Obezitenin artan kardiyovasküler risk ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sağlıklı bireylerde insülin sinyal yolağı (IRS-PI3K-AKT) aracılığı ile üretilen nitrik oksit (NO) sağlıklı endotel fonksiyonu için gereklidir ve endotel üzerinde vazodilatör etkiyi sağlayan en önemli moleküldür. İnsülin direnci ile birlikte inaktif olan IRS-PI3K-AKT yolağı nedeni ile NO üretilmemesi endotel sertleşmesi ve daralmasına neden olmaktadır (Şekil 2.3). Bu durum aterosklerozun başlangıç evresini oluşturmaktadır (Antonini-Canterin vd. 2014). Bir diğer yandan T2DM hastalarında hiperinsülinemi durumunda aşırı uyarılan Shc-MAPK

yolağı vasküler düz kas hücre proliferasyonunu aktive ederek aterom plağının oluşumuna neden olmaktadır (Di Pino ve DeFronzo 2019). Bu nedenle özellikle diyabetik hastalarda aterosklerozis görülme oranı ve buna bağlı mortalite riski oldukça yüksektir (Razani vd. 2008).



Şekil 2.3 SHC-MAPK yolu üzerinden uyarılan ikinci insülin sinyal yolağı (Di Pino ve DeFronzo 2019)

Obezite ile ilişkili dislipidemi artmış plazma serbest yağ asitleri ve trigliserid düzeyleri, azalmış HDL ve anormal LDL değerleri ile ilişkilidir ve hipertansiyondan sorumludur. Bir diğer yandan demans gibi dejeneratif hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, uyku apnesi, infertilite, osteoarthritis ve bazı kanser çeşitleri (meme, kolon, karaciğer, prostat) obezite ile birlikte gelişebilen diğer hastalıklardandır (Rashid vd. 2003, Semenkovich 2006, Alpert vd. 2016).

Metabolik sendrom, insülin direnci, glukoz intoleransı, dislipidemi, hipertansiyon, ateroskleroz gibi metabolik bozukluk özelliği taşıyan kronik ve karmaşık hastalıklar kümesinden oluşan bütün bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Metabolik sendromun neden olduğu komplikasyonlar klinik olarak gözden kaçabildiği için bu hastalığın tanısında kullanılan kriterlere çok dikkat edilmelidir. Ulusal Kolesterol Eğitim Programı-Erişkin Tedavi Paneli III (NCEP-ATP III) tarafından belirlenen kriterler metabolik

sendromun tanısında kullanılmaktadır. Metabolik sendromun tanısı için abdominal obezite, kan basıncı yüksekliği ve/veya hipertansiyon tedavisi almak, insülin direnci, trigliserid (TG) yüksekliği ve yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL kolesterol) düşüklüğü olarak sıralanmış beş kriterin en az üç tanesinin hastada saptanması gerekir (National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection ve Treatment of High Blood Cholesterol, 2002) (Çizelge 2.1). Ayrıca metabolik sendrom subklinik enflamasyon ile karakterize edilir ve metabolik sendromlu insanlarda plazma C-reaktif protein (CRP) değerleri yüksektir. (Monserrat-Mesquida vd. 2020). Obezite ile ilişkili gelişen metabolik komplikasyonlara baktığımızda, obezite metabolik sendrom olarak kabul edilmektedir. Metabolik sendrom geçmişte insülin direnci sendromu olarak tanımlanmıştır ve metabolik sendromu oluşturan komplikasyonların merkezinde insülin direnci yer almaktadır (Roberts vd. 2013).

Çizelge 2.1 Metabolik sendrom tanısı için kullanılan kriterler

Parametre	Kriterler
Abdominal obezite	Bel çevresinin Erkeklerde ≥ 102 cm, Kadınlarda ≥ 88 cm
Hipertigliseridemi	≥ 150 mg/dl ya da TG yüksekliği için farmakolojik tedavi almak
HDL kolesterol	Kadınlarda <50 mg/dl, erkeklerde < 40 mg/dl ya da düşük HDL nedeniyle farmakolojik tedavi alıyor olmak
Kan basıncı	$\geq 130/85$ mmHg ya da anti-hipertansif tedavi alıyor olmak
Açlık kan şekeri	≥ 100 mg/dl ya da kan şekeri yüksekliği için tedavi alıyor olmak

2.5 Memeli Adipoz Dokusu

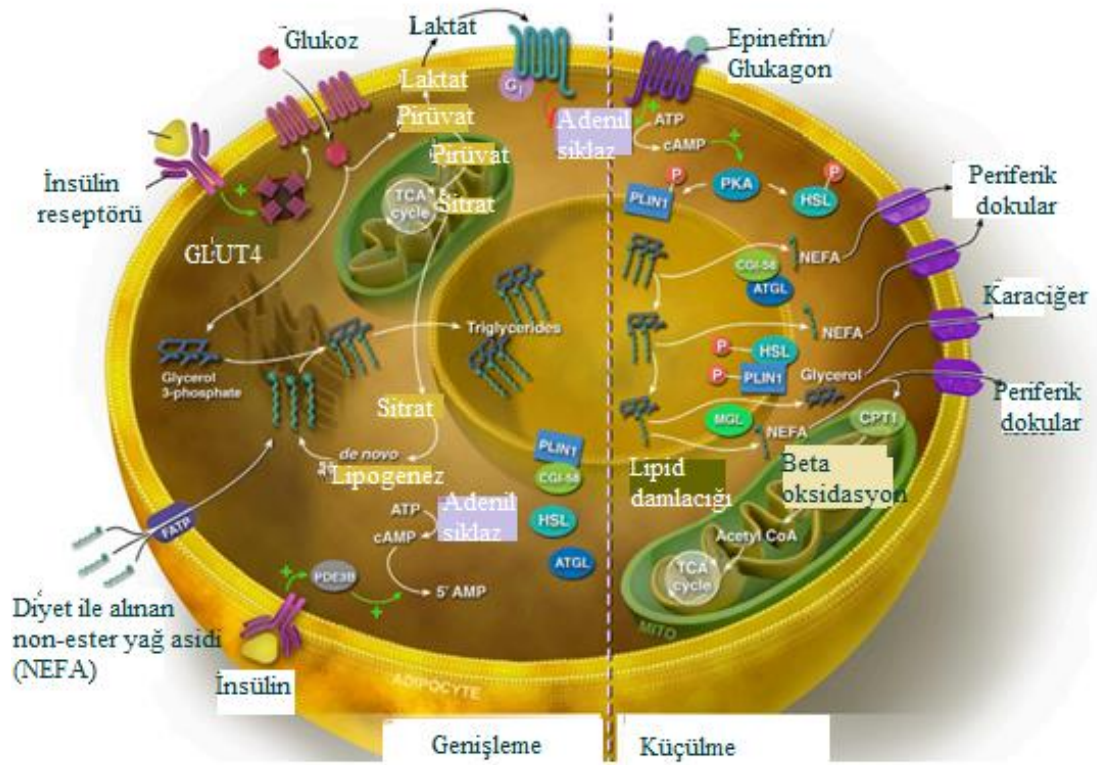
Adipoz doku, kahverengi yağ dokusu ve beyaz yağ dokusu olmak üzere renklerine ve fonksiyonlarına göre alt tiplerine ayrılır. Kahverengi adipositler çok sayıda mitokondri içeriği ile karakterize edilir ve mitokondriyal enzim olan sitokrom oksidazın demir içeren

hem grubundan dolayı mikroskopik görüntülerde kahverengimsi görünür. Bu yağ dokusu özellikle memelilerde ve yeni doğanlarda vücut sıcaklığını korumak için yağ asitlerini yakarak ısı üretilmesi ile termoregülasyonu sağlar. Beyaz adipoz doku klasik olarak hücrenin enerji deposu olarak bilinmektedir ve obezite ile ilişkili olan yağ dokusudur. Beyaz adipositler, visseral ve subkutanöz yağ dokusundaki hücreleri temsil etmektedir (Rosell vd. 2014, Rutkowski vd. 2015, Reyes-Farias vd. 2021).

Adipoz dokunun büyük bir kısmı lipid damlacığıyla kaplı adiposit adı verilen hücrelerden oluşmaktadır. Yüksek insülin hassasiyetine sahip olan sağlıklı bir adipoz dokunun en temel metabolik fonksiyonunun insülin yanıtı oluşturarak kan glukoz seviyelerini düzenlemek ve fazla enerji kaynaklarının adipositlerde TAG olarak depolanmasını sağlayarak lipid metabolizmasını kontrol etmek olduğu bilinmektedir. Ayrıca adipoz doku, tüm sistemi etkileyebilen ve adipokin olarak bilinen çeşitli biyoaktif molekülleri salgılayabilme yeteneğine sahip olan dinamik endokrin bir doku olarak kabul edilmektedir (Carobbio vd. 2017).

Adipoz dokuda bulunan adipositlerin boyutları, hormonal olarak kontrol edilen enerji ihtiyaçlarına göre değişebilme esnekliğine sahiptir. Açlık durumunda hormonal (glukagon/epinefrin) stimülasyon, adiposit membranındaki G proteini reseptörü (GPCR) aracılığı ile adenil siklazı aktive ederek siklik adenosin monofosfat (cAMP) yolağı üzerinden lipolitik enzimleri uyarak lipolizi başlatır. Anabolik durumda perilipin 1 (Plin 1) ile bağlanan CGI-58, katabolik süreçte cAMP sinyal yolağındaki protein kinaz A (PKA) tarafından Plin 1'in fosforilasyonu ile serbest kalır. Serbest CGI-582'in adipoz trigliserit lipaz (ATGL) enzimini aktive etmesi ile trigliseritlerden ilk yağ asidinin hidrolizi gerçekleştirilir. Ayrıca PKA tarafından fosforile edilen hormon duyarlı lipaz (HSL) enzimi, Plin 1 ile bağlanarak diaçilgliserolün (DAG) monoaçilgliserole (MAG) hidrolizini gerçekleştirir. Son olarak monoaçilgliserol lipaz (MGL) enzimi aracılığı ile üç yağ asidi ve bir gliserol molekülü elde edilir. Serbest kalan yağ asitleri beta oksidasyonda kullanılmak üzere adipositlerin mitokondrilerine veya diğer dokulara taşınabilirler. Böylece lipid damlacıklarının azaltılması ile adipositlerin boyutlarında küçülme meydana gelmektedir (Rutkowski vd. 2015).

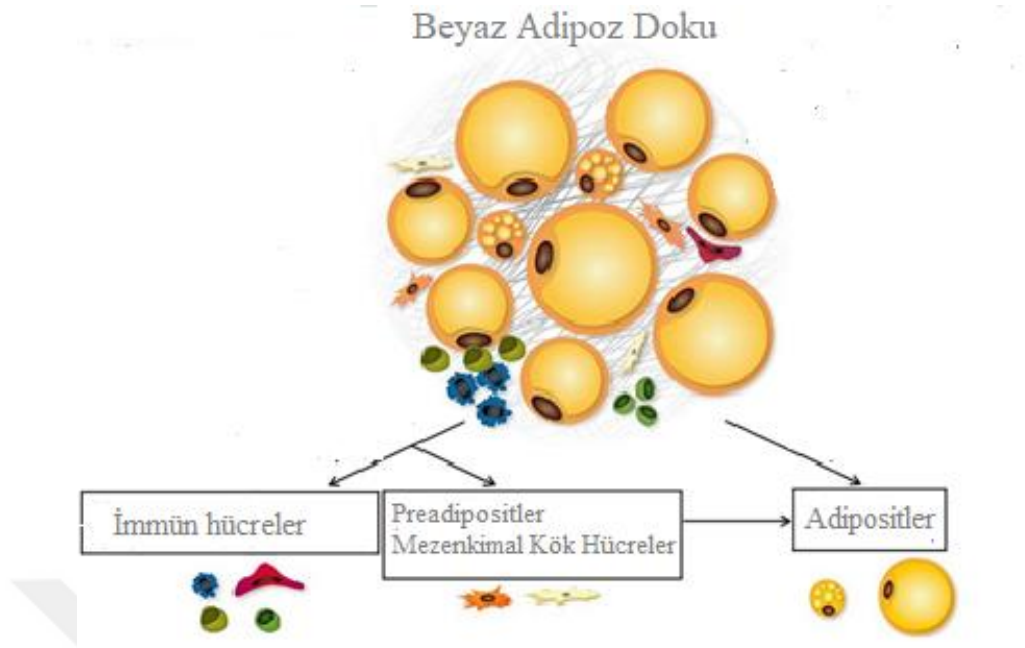
Tokluk durumunda insülin sinyal yolağının aktive olması ile sitozolde bulunan glukoz transporter 4 (GLUT4) kanalı hücre membranına yerleşerek glukozun hücre içine taşınması gerçekleştirilir (Kahn ve Cushman 1985). Adipositlerde artan glukoz miktarı ATP kaynağı olarak kullanılır. Ayrıca trigliserit sentezi için gerekli olan gliserol glikoliz sırasında oluşan gliserol-3-fosfat (G3P) tarafından, yağ asitleri ise dışarıdan diyet ile veya *de novo* lipogenez ile sağlanır. Endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenen trigliseritler, lipid damlacıklarında depolanarak adiposit boyutunun genişlemesine neden olur (Şekil 2.4) (Rutkowski vd. 2015). Bu durum aşırı lipid maruziyetinin meydana getireceği lipotoksisiteye ve ektopik lipid birikimine karşı adipoz doku dışındaki diğer organları korur (Rutkowski vd. 2015). Ayrıca adipoz dokunun metabolik değişikliklere adaptif bir yanıt oluşturarak boyut değiştirebilme yeteneğine sahip olması gıda kıtlığı zamanlarında hayatta kalmaya izin veren oldukça önemli evrimsel bir avantaj olarak bilinmektedir (Gealekman vd. 2014).



Şekil 2.4 Adipositlerin genişlemesi ve küçülmesi (Rutkowski vd. 2015)

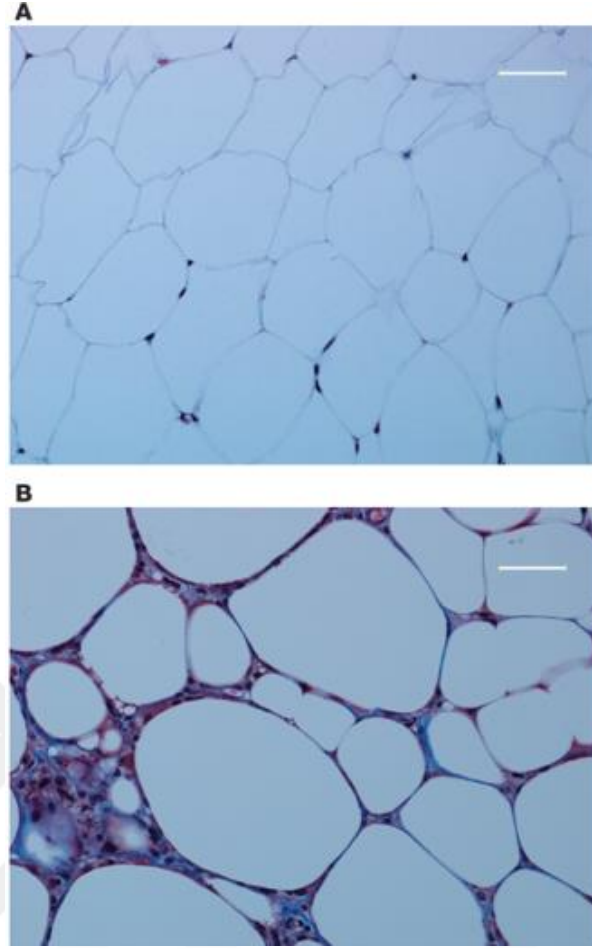
Adipoz dokuda leptinin salgılandığının keşfedilmesi ile birlikte metabolik süreçleri düzenleyebildiğinin gösterilmesi adipoz dokuya endokrin bir organ kimliği ile yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (Hotamışlıgil 2002, Kershaw ve Flier 2004, Grant ve Dixit 2015). Adipoz doku, salgıladığı leptin, sitokinler, adiponektin, plazminojen aktivatör inhibitörü-1, renin-anjiyotensin sisteminin proteinleri ve resistin gibi adipokinler, beyin, karaciğer, kalp ve pankreas gibi birçok organla doğrudan etkileşimde bulunabilmektedir. Bu adipokinler, enerji homeostazı (lipid ve karbonhidrat metabolizması, iştah, termojenez), bağışıklık sistemi, üreme fonksiyonu, hemostaz, kan basıncı ve anjiyogenez dâhil olmak üzere birçok biyolojik sistem üzerinde etkilere sahiptir. Yağ dokusu ayrıca seks steroidlerinin ve glukokortikoidlerin metabolizması için önemli bir dokudur (Schaffler vd. 2007, Sethi ve Vidal-Puig 2007). Aşırı kalori alımı ile birlikte artan depo ihtiyacını karşılayabilmek için adipozite olarak bilinen adiposit boyutunda iki kattan daha fazla genişleme meydana gelebilmektedir. Adipoz dokudaki bu genişleme adipokin regülasyonunu bozarak hormonlar, merkezi sinir sistemi ve diğer organlar arasındaki etkileşimde ciddi komplikasyonlara ve metabolik hasara neden olur (Singla vd. 2010).

Adipoz doku farklı hücre gruplarına sahip olup, hacminin %80' i ve toplam hücre popülasyonunun %60' ını adiposit hücreleri oluşturur (Bourgeois vd. 2019). Diğer hücre popülasyonlarının bulunduğu stromal vasküler fraksiyon kısmını multipotent mezenkimal kök hücrelerden köken alan; adiposit, kondrosit, osteoblast veya miyositlere dönüşebilme kapasitesine sahip adiposit prekürsörleri olan preadipositler, fibroblastlar, immun hücreler (makrofajlar, lenfositler, mast hücreleri gibi) oluşturur. Adipoz doku yoğun kılcal damar ağından oluşan ekstraselüler matriks (ECM) tarafından sarılmıştır (Şekil 2.5). ECM, kollajen tip 1, 3, 4 ve 6, fibronektin, osteonektin, osteopontin, tenascin-C, matriks metallaproteinaz proteinlerine sahiptir ve adipositlerin adipoz dokuya sıkıca bağlanmaları için mekanik destek olarak adipoz dokunun yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü sağlar (Revelo vd. 2014).



Şekil 2.5 Beyaz adipoz dokuda bulunan hücre popülasyonu (Bourgeois vd. 2019)

Adipoz dokudaki adipositler ve preadiposit hücreleri, inflamatuvar sitokin üretim yollarındaki fonksiyonları bakımından makrofajlar ile benzer özelliklere sahiptir. Adipoz dokuda bulunan preadipositlerin fagositik kapasiteye sahip olduğu ve uygun ortamda makrofajlara dönüşebildiği gösterilmiştir (Charriere vd. 2003). Adipositlerde transkripsiyon faktörlerini, sitokinleri ve inflamatuvar moleküllerini kodlayan kritik birçok gen, makrofajlarda da ifade edilmektedir (Wellen ve Hotamışlıgil 2003). Bu durum adipoz dokuda immün yanıt ve metabolizmanın yakın etkileşimini açıkça göstermektedir. Bu etkileşimin regülasyonu metabolik sağlık için oldukça önemlidir.



Şekil 2.6 Adipoz dokunun histolojik görüntüleme ile değerlendirilmesi (Sun vd. 2011)

(A) Sağlıklı adipoz dokusu yoğun bir şekilde paketlenmiş, altıgen adipositleri ve sağlıklı murin yağ yastığını içerir (B) Sağlıksız adipoz doku yüksek düzeyde immün hücre infiltrasyonu ve yoğun ECM birikimini içerir

2.6 Adipoz Doku İnflamasyonu

Klinik bulgular, hepatit C, HIV ve romatoid artrit gibi enfeksiyon hastalıklarına insülin direncinin eşlik ettiğini ve anti-enflamatuvar ilaç olarak kullanılan salisilatın hastalarda insülin duyarlılığını artırdığını göstererek insülin direnci ve enflamasyon arasındaki ilişkiye işaret etmiştir. (Shoelson vd. 2006, Gregor ve Hotamışlıgil 2011). Bu doğrultuda gerçekleştirilen çeşitli moleküler temelli çalışmalar sonucunda inflamatuvar bir molekül olan Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) seviyelerinin obez adipoz dokuda oldukça yüksek olduğunun keşfedilmesi ile adipoz dokunun güçlü proenflamatuvar yanıt oluşturabilen immün bir doku olduğu ortaya koyulmuştur (Hotamışlıgil 2002).

Sonrasında obez farelerde TNF- α nötralizasyonunun insülin direncini ve glukoz metabolizmasını iyileştirdiği, obeziteye bağlı olarak TNF- α seviyelerindeki artışın insülin direnci ile pozitif korelasyon göstermesi insülin direncinin enflamasyon sonucunda geliştiğini kanıtlamıştır (Hotamışlıgil vd. 1993, Hotamışlıgil vd. 1995, Uysal vd. 1998). Ayrıca obez adipoz doku, normal yağsız adipoz doku ile karşılaştırıldığında sadece TNF- α 'nın değil, aynı zamanda interlökin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), IL-1 β , monosit kemoatraktant protein-1 (MCP1) gibi bir dizi inflamatuvar sitokin de arttığı gösterilmiştir (Roytblat vd. 2000, Straczowski vd. 2002). Yapılan tüm bu çalışmalar klinik bulguları doğrulayarak obezitenin enflamasyon kökenli olduğunu, immün ve metabolik yolların birleşerek metabolizma üzerinde zararlı etkiler meydana getirdiğini göstermiştir (de Luca ve Olefsky 2008). Ateroskleroz, otoimmün hastalık, nörodejeneratif hastalık, kanser ve özellikle obezitenin ortaya çıkmasındaki ilk süreci kronik enflamasyon oluşturmaktadır (Tanaka vd. 2018).

Klasik literatürde yer alan enflamasyon şişlik, kızarıklık, ağrı ve ateş ile birlikte seyreden, yaralanmalara ve çeşitli patojenlere karşı organizmayı korunmak amacıyla meydana gelen bağışıklık yanıtı olarak tanımlanmaktadır. Bu akut enflamasyon hızlı bir şekilde gelişen ve kısa sürede çözünebilir bir özelliğe sahiptir (Larsen ve Henson 1983). Obezite ile birlikte indüklenen enflamasyon ile akut enflamasyonda ortak aracı moleküller bulunmaktadır ancak özellikleri birbirinden oldukça farklıdır. Metabolik hastalıklarda görülen enflamasyon koruyucu olmayan, uzun süren, ılımlı ve çözünemeyen özelliktedir (Hotamışlıgil 2006).

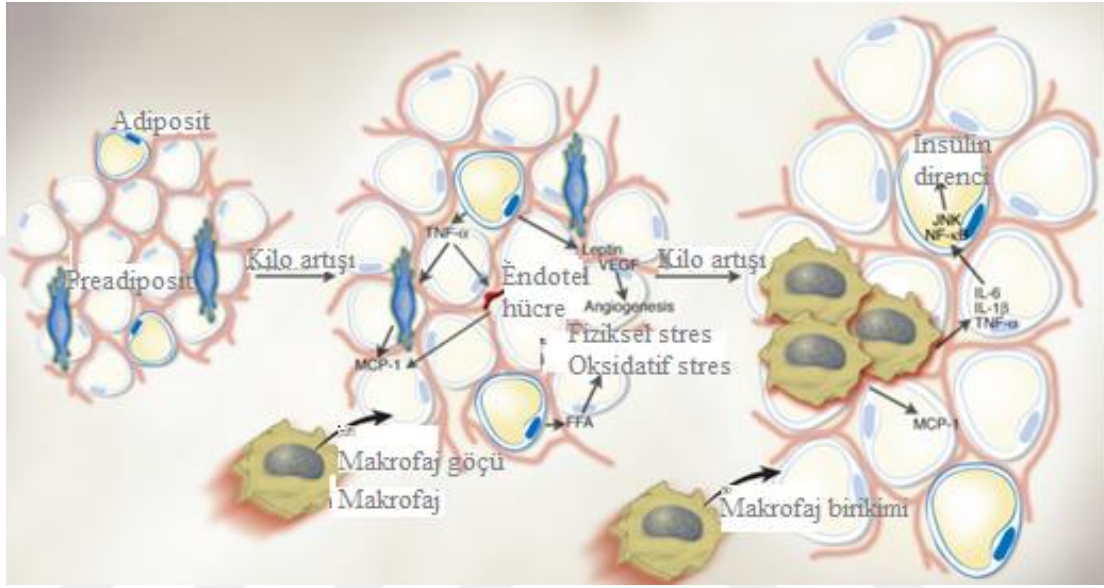
Artan enerji yükünün sürekliliği sonucunda adipositler kritik boyuta ulaşarak, lipid depolama fonksiyonlarını kaybederler. Adiposit hipertrofisi olarak bilinen bu boyut artışı sonucunda adipoz doku yeniden yapılandırılma sürecine girerek bazı değişiklikler geçirir (Spalding vd. 2008, Coelho vd. 2013, Lessard ve Tchernof 2017). Adipoz doku hipoksisi, adiposit hücre ölümü, proenflamatuvar sitokinlerin artışı, ECM proteinlerinin birikimi ile fibrozis, sınırlı vaskülerizasyon adipoz dokuda meydana gelen histolojik değişikliklerdir (Sun vd. 2011). Bununla birlikte adiposit hücre içinde ve hücre dışında metabolik stres meydana gelir. Yüksek kan glukozu ve buna bağlı oluşan ileri glikasyon son ürünleri (AGE), hücre içinde depolanamayan aşırı glukoz ve lipid metabolik bir yük oluşturarak

toksik metabolitlerin üretilmesine, organel (ER, mitokondri) yetmezliğine ve reaktif oksijen türleri (ROS) artışı ile oksidatif strese neden olur. Obezite ile ilişkili enflamasyon gelişimi adipoz dokuda proenflamatuar ve antienflamatuar sinyaller arasındaki denge ile ilişkilidir (Stolarczyk 2017). Sonuçta adipoz doku disfonksiyonu ile oluşan tüm bu süreçler adipoz dokudan salınan proenflamatuar sitokinlerin ve adipokinlerin artışına neden olarak adipoz dokuda enflamasyon oluşumunu uyarır (Solinas ve Karin 2010).

Obezite ile indüklenen adipoz doku enflamasyonu TNF- α 'nın aracılık ettiği c-jun N-terminal kinaz (JNK) ve κ kinaz inhibitörü (IKK β) enflamasyon sinyal yolları aracılığı ile gerçekleştirilmektedir (Hirosumi vd. 2002). Diğer bir yandan JNK ve IKK β enflamasyon yollarının aktivasyonu sırasıyla nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve aktivatör proteini 1 (AP-1) transkripsiyon faktörlerini uyararak proenflamatuar sitokinlerin ifadesinde artışa neden olurlar. Böylece artan inflammatuar sitokinler tarafından sürekli beslenen enflamasyon yanıt döngüsel bir durumda daha fazla şiddetlenerek belli bir eşik değerine ulaşır. Bu aşamada artan proenflamatuar ortam tarafından aktive edilen makrofajlar adipoz dokuya göç ederler ve burada çoğalarak birikmeye başlarlar. Adipoz doku makrofaj infiltrasyonu olarak bilinen bu süreçte, inflamasyon şiddetlenerek çözünmeye karşı direnç gösterir ve kısır döngüde kalarak kronikleşmeye başlar (Gregor ve Hotamışlıgil 2011).

Obez fare ve obez insanların hipertrofik adipositlerinde makrofaj infiltrasyonunu sağlayan MCP1 ifadesinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Xu vd. 2003, Kamei vd. 2006). Hipertrofik adipoz dokudaki adipositler tarafından düşük seviyelerde üretilen TNF- α gibi sitokinler, preadipositlerden ve endotel hücrelerden monosit MCP-1 üretimini uyararak makrofaj infiltrasyonuna neden olmaktadır. Bunun dışında adipositlerden salgılanan leptin sırasıyla makrofajların adipoz dokuya taşınmasını ve endotelial hücrelere adhezyonunu uyarır. Ayrıca adipositlerin boyutunda meydana gelen artışın endotelde oluşturduğu fiziksel hasar ve artan lipotoksisitenin neden olduğu oksidatif hasar makrofaj infiltrasyonunda rol oynayan diğer faktörlerdir (Wellen ve Hotamışlıgil 2003). Adipoz dokuya biriken makrofajlar IL-1 β , TNF α ve IL-6 gibi proenflamatuar sitokinler üreterek NF- κ B ve JNK sinyal yolları ile etkileşime girer. Makrofajların tek başına ve adipositlerle eşzamanlı olarak enflamasyona olan katkısı ile adipoz dokudaki

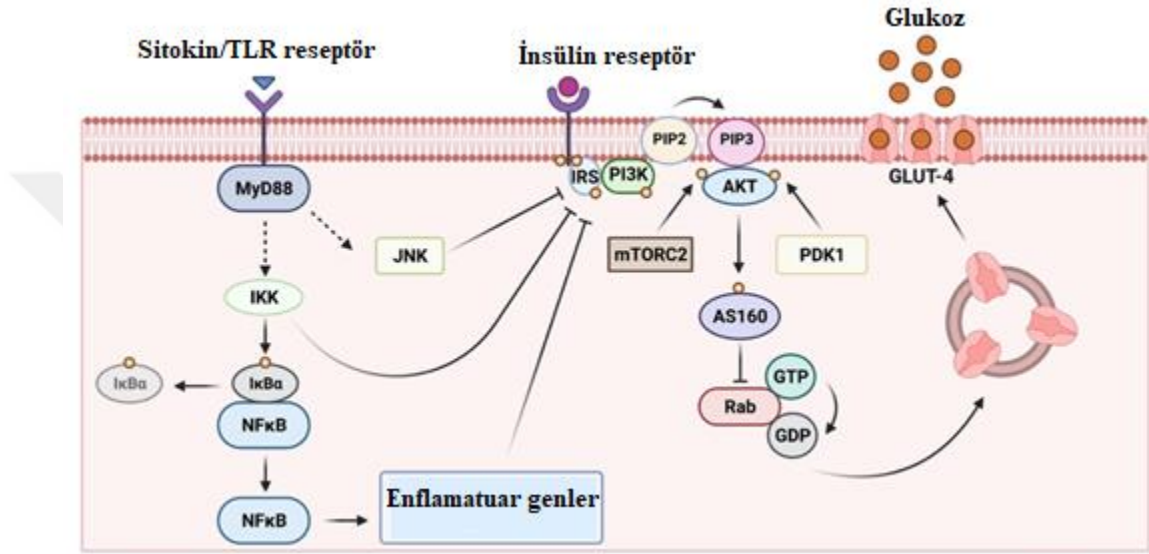
proenflamatuar ortam güçlenir. Böylece güçlü bir şekilde uyarılan enflamasyon yolları insülin sinyal yolağı ile birleşerek insülinin etkinliğini bozar ve adipoz doku kökenli olan enflamasyon insülin direncinin başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir. Adipoz doku hipertrofisi ile birlikte artan makrofaj infiltrasyonu insülin direnci ile pozitif korelasyon göstermektedir (Wellen ve Hotamışlıgil 2005, Zhou vd. 2014).



Şekil 2.7 Adipoz doku makrofaj infiltrasyonu (Kathryn E. Wellen ve Hotamışlıgil 2003)

Obezitede meydana gelen enflamasyon yanıtının neden olduğu bir diğer önemli metabolik zarar adipoz dokuda lipolizin uyarılması olarak bilinmektedir. Enflamatuar özellik kazanan adipositlerde artan proenflamatuar sitokinler trigliserit sentezi için önemli olan peroksizom proliferatör aktive edici reseptör γ (PPAR γ) inhibisyonuna neden olur ve insülinin antilipolitik etkisini engelleyerek katabolik süreçleri aktive eder (Guilherme vd. 2008). Hipertrofik adipositlerde lipogenik sinyallerin ifadesi azalırken lipolitik sinyallerin ifadesi artar. Adipoz dokuda lipolizin kronik bir şekilde uyarılmasına neden olan bu durum ektopik (karaciğer, kas) lipid birikimi ve dolaşımda serbest yağ asit (SYA) artışı ile sonuçlanır (Langin ve Arner 2006, Kawai vd. 2021). Dolaşımda artan SYA, adiposit ve makrofaj hücrelerinin yüzeyinde bulunan doğal bağışıklık yanıt reseptörü olan Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) kompleksine bağlanarak miyeloid farklılaşma 88 (MyD88) adaptör proteinini aracılığı ile IKK β /NF- κ B ve JNK/AP-1 enflamasyon yanıt sistemlerini aktive eder (Şekil 2.8) (Shi vd. 2006, Wen vd. 2022). İntraperitoneal

bölgeden alınan TLR4^{-/-} makrofajların uzun zincirli doymuş yağ asidi olan palmitik asite yanıt olarak kısmen azalmış JNK ve IKK β aktivasyonu bu yolların diğer reseptörler tarafından da uyarıldığını gösterir. Yapılan çalışmalar özellikle doymuş yağ asitlerinin TLR4 aracılı enflamasyon yanıtını çok güçlü bir şekilde indükleyerek IL-1 β , TNF, IL-6, MCP-1 gibi inflamatuvar sitokin/kemokin salınımını en üst seviyelere çıkardığını ve insülin direncine neden olduğunu göstermiştir (Shi vd. 2006).



Şekil 2.8 TLR4 yolağının aktivasyonu ile enflamasyon yanıtın indüklenmesi (Jorquera vd. 2021)

Obezite ile ilişkili enflamasyon, metabolik sinyaller tarafından adipositlerden inflamatuvar sitokin salınımının uyarılması, inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenen JNK ve IKK β enflamasyon yanıtın başlatılması, adipoz dokuya makrofajların birikmesinden oluşan süreçlerin aşamalı olarak gerçekleştiği bir durumdur. Bu süreçler birbirini güçlendirerek inflamasyonun kısır döngüde kalarak kronikleşmesine, çözülmeye karşı direnç göstermesine neden olur. Bu nedenle, obeziteye özgü olan ve metabolik komplikasyonlar ile sonuçlanan bu enflamasyon türü düşük dereceli kronik enflamasyon ile karakterize edilen metaflamasyon olarak tanımlanmıştır (Hotamışlıgil 2006, Gregor ve Hotamışlıgil 2011).

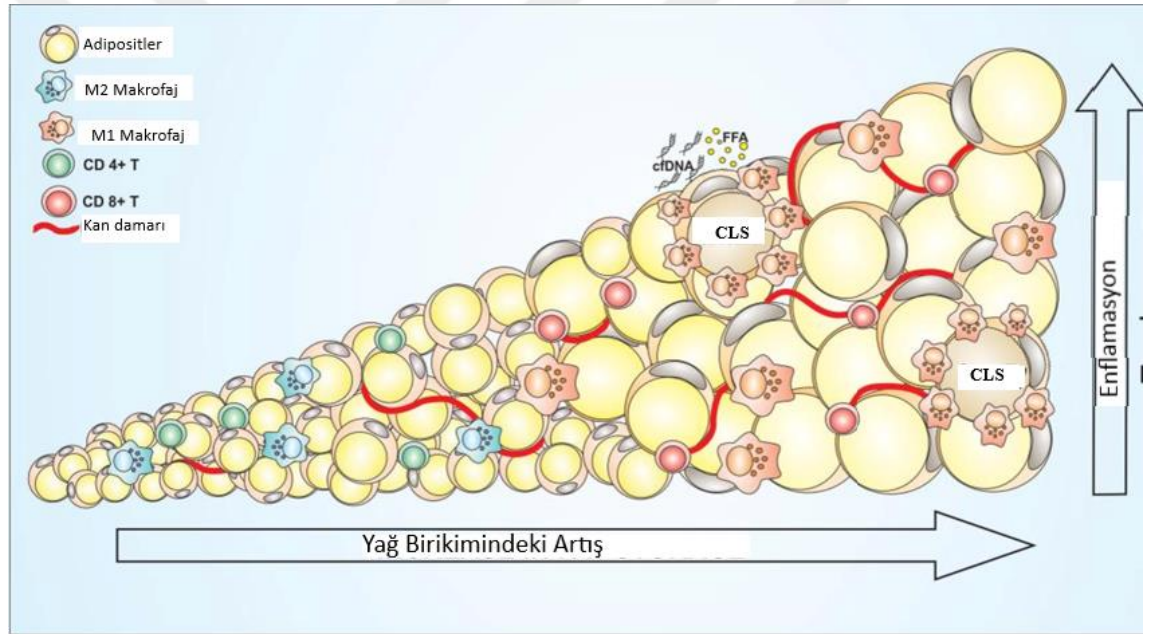
2.7 Adipoz Doku Makrofajları

Makrofajların en önemli özellikleri çeşitlilik ve plastisiteye sahip olmalarıdır. Adipoz dokuda bulunan makrofajlar yüzeylerindeki markerlar, salgıladıkları sitokinler, transkripsiyon yolları ve enflamasyon özellikleri bakımından iki alt tipe sınıflandırılır (Zhou vd. 2014). Proenflamatuar özellikte olan M1 tip makrofaj (klasik olarak aktive olan) ve anti-inflamatuar özellikte olan M2 tip makrofaj (alternatif aktive olan) popülasyonları metabolik duruma göre aktive olmaktadır (Lumeng vd. 2007). Sağlıklı yağsız (lean) adipoz dokuya yerleşik olan M2 tip makrofajlar, anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 ifadesine sahiptir ve insülin direncine karşı koruyucu özellik gösterirler (Chawla vd. 2011). Yapılan bir çalışmada obez adipositlerin IL-10 ile muamele edilmesi, TNF- α ile indüklenen insülin direncini iyileştirdiği gösterilmiştir (Lumeng vd. 2007).

Hipertrofik adipoz dokuda yeniden yapılandırılma sürecinde stromal hücrelerin çeşidinde ve sayısında önemli ölçüde değişiklikler meydana gelir. Sağlıklı adipoz dokuda bulunan toplam hücre sayısının %5-10 kadarını makrofajlar oluştururken, obezitede patolojik adipoz doku hipertrofisi ile pozitif korelasyon gösteren makrofaj miktarının %50 seviyelerine ulaştığı gösterilmiştir (Weisberg vd. 2003). Adipoz dokuda proenflamatuar M1 makrofajlarının sayıca artarak birikmesi olarak tanımlanan adipoz doku makrofaj infiltrasyonu kronik enflamasyondan sorumlu olan ve obezitenin patolojik karakteristik özelliği olarak bilinen en önemli fenomendir (Guerreiro vd. 2022). Obezite durumunda adipoz doku dışında karaciğer, kas, pankreas ve beyinde de inflammatuar sitokin ifadesi gerçekleşmektedir (Saghizadeh vd. 1996). Ancak makrofaj infiltrasyonunun sadece adipoz dokuya özgü olduğu bilinmektedir.

Obezite ile birlikte aktive olan M1 tip makrofajlar, TNF- α , IL-6, iNOS, CCR2, CD11c ve TLR4 gibi proenflamatuar faktörlerin ifadelerine neden olur (Weisberg vd. 2003, Russo ve Lumeng 2018). Obezite durumunda adipoz dokuda proenflamatuar moleküllerin birincil kaynağı olan M1 tip makrofaj infiltrasyonu ile birlikte enflamasyon yolları kronik olarak uyarılır (Weisberg vd. 2003, Olefsky ve Glass 2010).

Obez adipoz doku makrofajlarının en önemli fizyolojik fonksiyonlarından biri lizozomal aktiviteleri ile ölü adipositlerin ve ölü adipositlerden salınan lipidlerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamaktır (Cinti vd. 2005). Obezite ile birlikte histolojik farklılaşma geçiren adipoz dokuda, hasarlı veya ölü adipositlerin etrafında biriken CD11c-pozitif proenflamatuar M1 makrofajlar kümeler halinde toplanarak taç benzeri yapıları (CLS) meydana getirir (Miyako Tanaka 2020). Lipid damlacıklarının fagositozu ile lipid ile yüklenen makrofajlar birleşerek çok çekirdekli sinsitya yapısını oluştururlar (Giordano vd. 2013). Bu taç benzeri yapılar ileri derecede obezitenin ve kronik enflamasyonun histolojik ayırt edici özelliği olup CLS sayısı ile sistemik insülin direnci arasında pozitif korelasyon olduğu bilinmektedir (Kamei vd. 2006).



Şekil 2.9 Adipoz doku makrofaj infiltrasyonu ile oluşan CLS yapıları (Correa vd. 2019)

Adipoz doku ve makrofaj ilişkisine baktığımızda metabolik ve inflammatuar sistemdeki bozuklukların meydana gelmesinde ortak yolların kullanıldığı görülmektedir. Bu ortak yollarda meydana gelen düzensizlikler eş zamanlı olarak adiposit aracılığı ile metabolik bozukluklara, makrofaj aracılığıyla da enflamasyona bağlı bozukluklara neden olur. Yağ asitleri ve TNF gibi sitokinlerin adipositler aracılığı ile yol açtığı dislipidemi ve insülin direnci gibi düzensizlikler makrofajlar üzerindeki enflamasyonla ilgili etkileri ile bir araya gelerek obezite gibi metabolik hastalıkların karmaşık moleküler temellerini

oluşturmaktadır. Metabolik ve enflamasyon yanıtı ile ilgili bozuklukların birlikte görüldüğü obeziteyi moleküler düzeyde anlayabilmek için hedef hücreleri ve bu hücrelerde meydana gelen süreçlerin moleküler mekanizmalarını anlamak oldukça önemlidir. Bu nedenle adiposit ve makrofaj hücreleri arasındaki ilişkiyi araştırmak oldukça önem kazanmıştır (Hotamışlıgil 2002, Hotamışlıgil 2017).

Obezitede fizyopatolojik süreçleri izleyebilmek için uygun deney modelinin geliştirilmesinde en uygun yöntemin basit organizmalarla çalışmak olduğu düşünülmektedir. Bunun için model hayvan çalışmaları oldukça yaygındır. Özellikle bakım avantajı, dokuların kompleks olmaması, fonksiyonel homolog dokuların olması ve genetik analizlerin *in-vivo* olarak uygulanabilirliği açısından *Drosophila* oldukça elverişli bir modeldir. Adipoz dokuda gerçekleşen enflamasyonun en erken aşamasını tetikleyen endokrin ve immün faktörlerin kombinasyonlarından oluşan olaylar bütünü henüz bilinmemektedir. Uygun deney modelinin oluşturulması ile birlikte adipoz doku ve makrofaj hücreleri arasındaki ilişkiye odaklanmak obezitenin kompleks içyüzünün anlaşılabilirliğine yönelik umut vadetmektedir.

2.8 *Drosophila melanogaster*

Diptera takımının, Drosophilidae ailesine ait olan *Drosophila melanogaster* Afrika'daki atalarından dünyanın dört bir yanındaki laboratuvarlara kadar yayılan (Lachaise D 1988), yüz yılı aşkın süredir bilimsel araştırmalarda deney hayvanı olarak kullanılan en değerli model organizmalardan biridir (Şekil 2.10) (Haudry vd. 2020).

Thomas Hunt Morgan (1866–1945), Mendel genetiğinin hipotezlerini kanıtlamak ve genişletmek için *Drosophila* sistemini kullanmayı seçerek eşeye bağlı kalıtım, bağlı genlerin varlığı ve iyonize radyasyonun genlerde mutasyonlara neden olduğu ile ilgili büyük keşifler gerçekleştirmiştir. Bu keşifler Morgan'a ve Columbia Üniversitesi'ndeki öğrencilerine Nobel ödülleri kazandırmıştır ve bilim dünyasına modern genetiğin temelleri kazandırılmıştır (Kohler 1994).

Domain: Eukarya

Âlem: Animalia

Şube: Arthropoda

Sınıf: Insecta

Takım: Diptera

Familya: Drosophilidae

Cins: *Drosophila*

Tür: *Drosophila melanogaster*



Şekil 2.10 *Drosophila melanogaster* dişi (solda) ve erkek (sağda) birey (Breugel 2017)

Drosophila ile yapılan araştırmalar, nörobiyoloji, davranış, evrimsel genetik ve gelişimsel biyoloji alanında sirkadiyen ritimlerin temeli de dâhil olmak üzere çeşitli keşiflere yol açmıştır. Karmaşık sinir sistemi ve korunmuş nörolojik fonksiyonlar, *Drosophila*'nın nörodejeneratif hastalık çalışmalarında kullanılmak için ideal bir model organizma olmasına izin vererek, Huntington, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıkların araştırılmasına yardımcı olmaktadır. *Drosophila* model organizması kullanılarak yapılan keşiflerle bugüne kadar altı adet Nobel ödülü kazanılmıştır. Bu nedenle *Drosophila* araştırmacılar için güçlü ve avantajlı bir genetik enstrüman olarak kullanılmaktadır (Stephenson ve Metcalfe 2013).

İnsan ve *Drosophila* anatomik olarak farklı yapıya sahiptir ancak *Drosophila* genomu ile insan genomu %60 homoloji gösterir ve insanda hastalıklar ile ilişkili genlerin %75'i *Drosophila* ile homolog olduğu kanıtlanmıştır (Ugur vd. 2016). Ayrıca büyüme, gelişme, beslenme, yaşam süresi ve yaşam kalitesi ile ilgili genetik ve biyokimyasal yollar evrimsel olarak yüksek derecede korunmuştur. Obezite ve obeziteye bağlı gelişen komplikasyonlar ile ilişkili mekanizmaların, metabolik yolların ve endokrin hormonların evrimsel süreçte korunmuş olmasından ve analog organlara sahip olmasından dolayı *Drosophila* obezite araştırmalarında oldukça ideal bir modeldir. (Pandey ve Nichols 2011). *Drosophila*'nın yaklaşık altmış günlük bir ömür uzunluğuna sahip olduğu için büyüme ve gelişim üzerindeki çevresel ve/veya genetik etkilerin nispeten kısa bir sürede araştırılabilmesine imkân verir. Ayrıca *Drosophila*, beslenme ve açlık dönemlerini içeren yaşam döngüleri ile obeziteye yönelik araştırmalarda diğer hayvan modellerine kıyasla laboratuvarında avantaj sağlar (Murillo-Maldonado ve Riesgo-Escovar 2017). Model organizma olarak *D. melanogaster*'in, oldukça küçük olması (2-3 mm), 4 çift kromozoma sahip olması (3 çift otozom ve 1 çift eşey kromozomu), bakım maliyetlerinin düşük olması, laboratuvarında saklama kolaylığı (çok sayıda stok saklanabilmektedir), hızlı üremeleri, kısa yaşam döngüleri (yaklaşık 10 gün 25°C), tek seferde yaklaşık yüz yumurta verebilmeleri, kısa sürede ve kolaylıkla anestezi edilebilmeleri ve morfolojik olarak kolaylıkla ayırt edilebilmeleri deney hayvanı olarak kullanılmalarında sahip oldukları diğer avantajlardır (Jennings 2011).

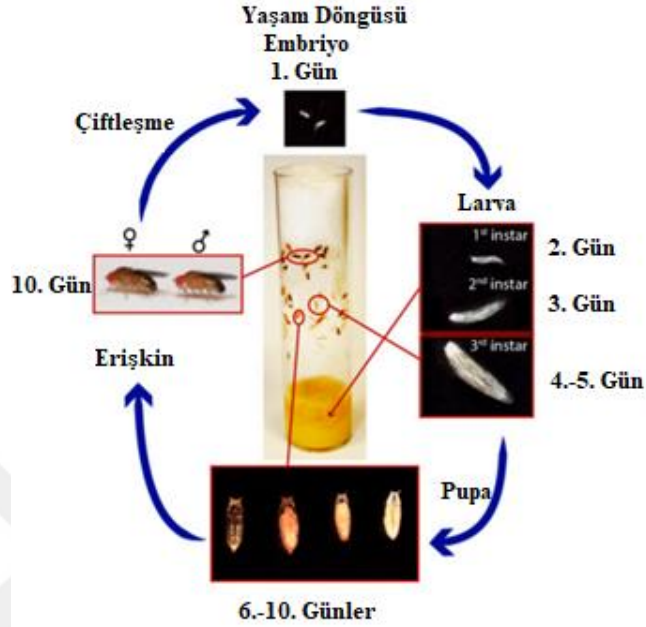
Drosophila, dengeleyici (balancer) kromozomlar, inaktive edilmiş mutant genler, Gal4/UAS sistemi ve CRISPR/Cas9 sistemi dâhil olmak üzere çok sayıda genetik aracın geliştirilmesine aracılık etmiştir. *Drosophila* genomu ~180 Mb' dir ve genomu tamamen dizilenen ilk ökaryotik canlı olmuştur (Haudry vd. 2020). *Drosophila*'da yaklaşık 14.000 gen olduğu tahmin edilmektedir ve bütün bu genlerin dizileri, gen ürünlerinin dizileri, bilinen mutasyonlar ve ilgili literatürleri içeren bağlantıların bulunduğu Flybase olarak adlandırılan özel bir veritabanı bulunmaktadır (Jennings 2011).

2.9 *Drosophila* Yaşam Döngüsü

Drosophila final vücut taslağına ulaşana kadar köklü değişimler geçirir ve kronolojik olarak geçirdiği embriyo, larva, pupa ve ergin evrelerin her biri araştırmalar için eşsiz bir platform sunmaktadır. Ergin birey olana kadar bu evrelerden geçen *Drosophila*, diğer deney hayvanlarına göre daha kısa yaşam döngüsüne sahiptir: 25 °C sıcaklıkta 10-12 günde yaşam döngülerini tamamlarlar. Bu süreç sıcaklığa bağlıdır, kültür edilen sinekler 18 °C’ de muhafaza edildiklerinde yaşam döngülerini tamamlama süreleri 19 güne kadar uzayabilmektedir (Perveen 2018). Tek bir dişi sinek yüzlerce döllenmiş yumurtayı tek seferde bırakabilir ve döllenmiş yumurta bırakıldıktan sonra *Drosophila*’ nın yaşam döngüsü başlar. Yeni bırakılan *Drosophila* yumurtası ortalama 24 saatte embriyogenez sürecini tamamlar ve embriyogenez süreci boyunca maternal kökenli determinant genler aracılığı ile anteriyor-posteriyor ve dorsal-ventral eksen boyunca vücut taslağı belirlenir. Embriyogenezden sonra yumurtadan birinci instar larva olarak çıkarak sürekli beslendiği, hızlı bir şekilde sürekli büyüdüğü ve boyutundaki büyük artışa uyum sağlamak için deri değiştirdiği larval evreye geçiş yapar. Larval dönemdeki beslenme sadece vücut büyüklüğünün artışı için değil pupa evresindeki metamorfoz sürecinde kullanmak üzere besin depolanmasına yöneliktir.

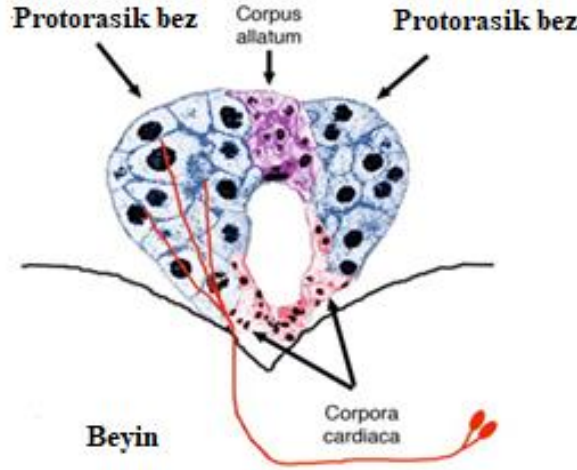
Birinci instar larva evresi sürekli beslenme ile karakterize edilen ve yiyecek arama davranışı için hareketin görüldüğü bir süreçtir. Yaklaşık 24 saat sonra ikinci instar larva aşamasına geçilir ve tekrar bir günün ardından da ikinci deri değişimini gerçekleştirip üçüncü instar (son larval dönem) larva halini alır. Bu son larval dönem yaklaşık iki gün sürer. Üçüncü instar larva evresinin son aşamasındaki larva gezmeye başlar ve tüpün üst kısmına tırmanarak kendine pupa evresini geçirmek için uygun bir yer bulur. Pupa evresi, embriyonik ve larval yapıların ortadan kaldırıldığı, erişkin sineğin final vücut taslağının tamamlanması için kapsamlı değişikliklerden geçildiği metamorfoz sürecinin başladığı 4-5 günlük sessiz bir dönemdir. Bu dönüşüm sürecinde hayvan dış ortamdan beslenemez ve “fat body” organında depolanmış besinleri hayatta kalmak için ihtiyaç duyduğu enerjiye çevirir. Döllenmeden itibaren 10 gün sonra erişkin sinek pupadan dışarı çıkarak 8-12 saat içerisinde üreme erginliğine ulaşmaya başlar (Şekil 2.11). Embriyonik dönemde erken vücut yapı planının oluşturulması, vücut planının tamamlanması, büyüme ve larval deri

(gömlük) değiştirme, üreme erginliğine ulaşma ve olgunlaşmadan oluşan ardışık süreçler tamamlanır (Ashburner 1989, Wolpert vd. 2015).



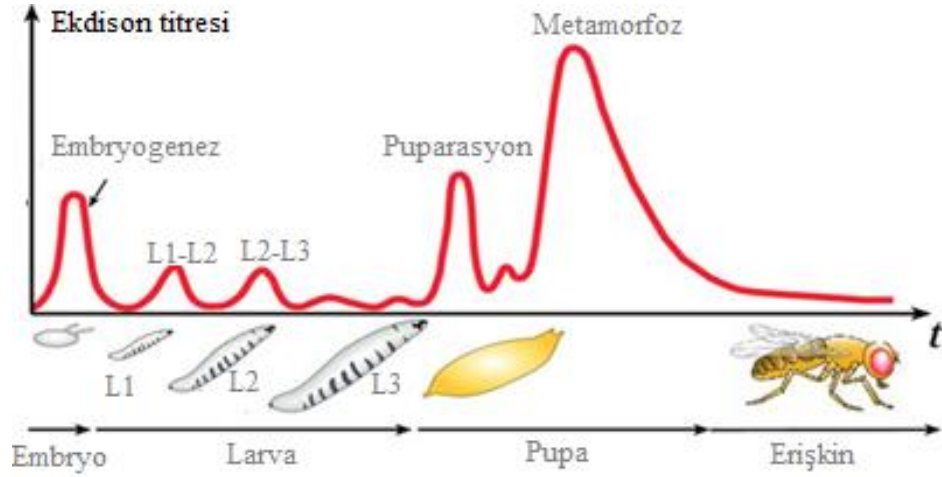
Şekil 2.11 *Drosophila* yaşam döngüsü ve gelişim dönemleri

Drosophila'nın gelişimsel süreci hormonlardan gelen sinyaller, besinler ve insülin benzeri peptidlerin (Dilps) sıkı koordinasyonu ile gerçekleştirilir. Endokrin bir bez olarak bilinen yüzük bezi larval beynin üst kısmında bulunup, yapısal olarak corpora cardiaca (CC), corpora allata (CA) ve protorasik bez (PG) olarak bilinen alt dokulardan meydana gelmiştir. Gelişim sürecini düzenleyen en önemli hormonlar protorasik bezden salınan ecdison, corpora allata dokusundan salınan juvenil ve corpora cardiaca dokusundan salınan PTTH (protrosikotropik hormon) olarak bilinmektedir (Quinn vd. 2012).



Şekil 2.12 Yüzük dokusundaki protorasik bezin şematik gösterimi (Talamillo vd. 2008)

Yüzük dokusunda bulunan protorasik bezden salınan ekdison hormonunun oluşturduğu titreler temel gelişimsel geçişleri tetikleyerek; embriyogenez, embriyodan larva dönemine geçiş, deri değişimini tetikleyerek beslenmeye bağımlı olan larval fazların (L1, L2, L3) tamamlanması ve beslenmeden bağımsız hareketsiz bir evre olan larvadan pupa dönemine geçişi metamorfozun başlatılmasını sağladığı bilinmektedir (Şekil 2.13) (Riddiford 1993, Thummel 2001). Üçüncül instar larval fazın son evrelerinde oluşan ekdison titresi larvanın vücut yapısında değişiklikler meydana getirerek pupa fazına geçebilmesi için gereklidir. Bu süreç pupanın hareketsiz bir şekilde yüzeye tutunması için gerekli olan glue proteinlerinin salgılanması ile başlar. Sonrasında erişkin dönemde gerekli olmayan bazı larval organlar ortadan kaldırılır, larval vücut kısalır, kütikül sertleşmesi ve vücut renginin koyulaşması gerçekleşir (Thummel 2001). Ekdison, gelişim süreçleri arasındaki hiyerarşik geçişleri sağlayan ve larvayı metamorfoza hazırlayan bir hormon olması nedeni ile merkezi bir role sahiptir. Larval instar fazlarda deri değişiminden önce ekdison hormonunun salınımını tetikleyen PTTH ve larval dönem boyunca salgılanarak, larva kritik ağırlığa ulaştığında salınımı sona eren juvenil hormon ise gelişim süreçlerinde rol oynadığı bilinen diğer önemli hormonlardır (Allocca vd. 2018).

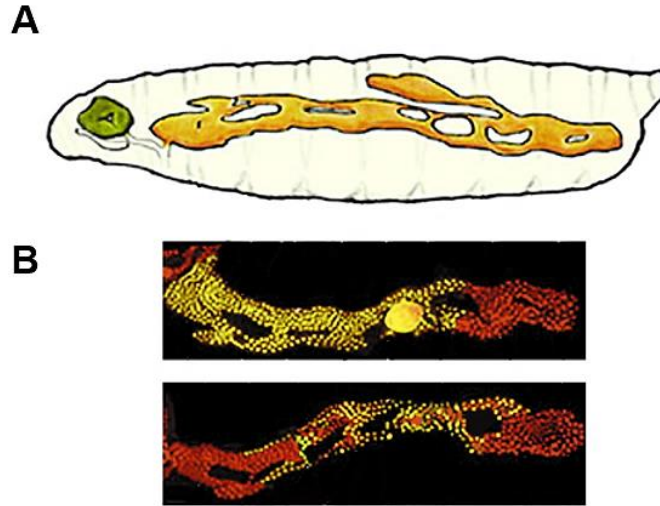


Şekil 2.13 *Drosophila* gelişim süreci ve ekdison titreleri (Niwa ve Niwa 2014)

2.10 *Drosophila* Fat Body

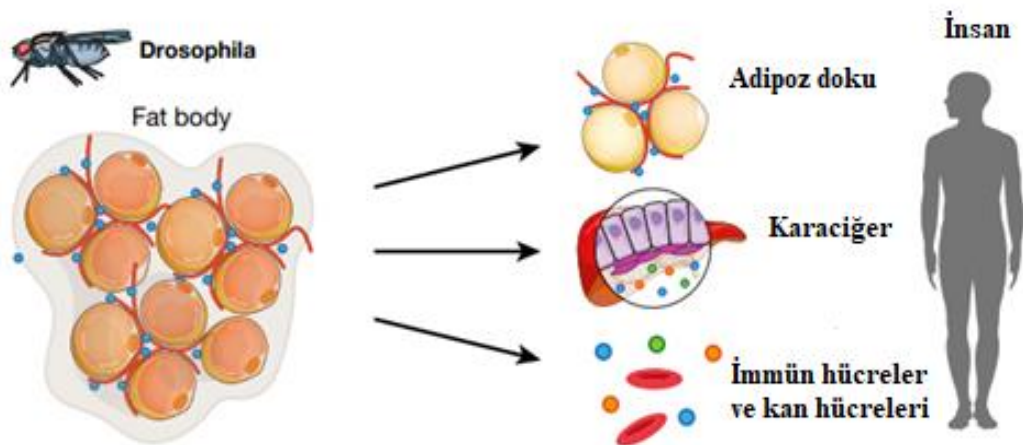
Metabolik ve bağışıklık yanıt sistemleri arasındaki yakın ilişki evrimsel temellere dayanmaktadır. Yüksek organizmalardaki temel metabolik ve bağışıklık fonksiyonlarını kontrol eden işlevsel birimleri oluşturan adipoz doku ve karaciğer ortak atasal yapıdan evrimleşmiştir (Şekil 2.14). Bu yapı yağ depolayan, hematopoietik ve bağışıklık sistemlerini birlikte bulunduran memeli adipoz doku ve karaciğerine analog olan fat body olarak bilinmektedir (Sondergaard 1993, G. S. Hotamışlıgil 2006).

Fat body, abdomen bölgeden toraks ve baş bölgesine kadar uzanan larval vücut boşluğuna yayılarak bağırsak ve üreme organlarını çevreleyerek doğrudan hemolenf ile temas halinde olan bir organdır. Fat body 2200 hücreden oluşur ve larval gelişim süresince sayısı sabit kalır ancak larval dönemin sonlarında pupa evresine geçişte otofaji ile yeniden yapılanma sürecine girerek boyutu küçülür (Xi 2015).



Şekil 2.14 *Drosophila* larval fat body A) Şematik gösterim B) Fat body doku görüntüsü, sarı noktasal yapı erkek gonadına karşılık gelir (Marchetti, 2003)

Fat body, metabolik bir merkez olarak enerji metabolizması, gelişim süreçlerinin düzenlenmesi, immünolojik süreçler, üreme ve besin sensörü ile ilişkili fonksiyonlara sahip dinamik ve multifonksiyonel bir organdır. *Drosophila* fat body, memeli adipoz dokusunda olduğu gibi lipid depolama ve mobilizasyonu için özelleşmiş adiposit hücrelerine sahiptir ve bu adipositler lipid damlacıkları olarak adlandırılan evrensel organellerden oluşmaktadır. Enerji ihtiyacının olduğu metamorfoz, açlık, gelişim ve üreme süreçlerinde enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla karbonhidrat ve yağ kaynakları trigliserite dönüştürülerek lipid damlacıkları organelinde depolanır (Arrese ve Soulages 2010, Kuhnlein 2012).



Şekil 2.15 *Drosophila* fat body immün, metabolik ve hematopoietik sistemleri içerir

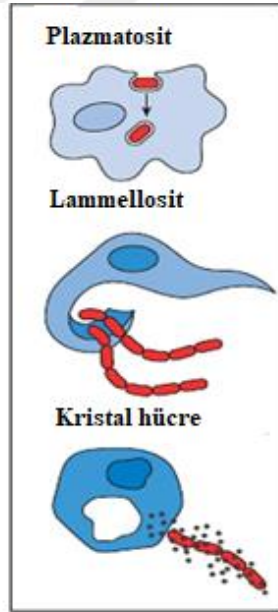
İnsanlarda bulunan metabolik fonksiyonların çoğu *Drosophila* organizmasında bulunmaktadır. *Drosophila* dolaşımındaki şeker seviyelerini korumaya yönelik fazla enerjinin depolanması ve mobilizasyonu ile ilgili metabolik süreçleri fat body aracılığı ile gerçekleştirir. Karbonhidrat metabolizmasına baktığımızda, şekerin fazlası glukojen ve trehaloz olarak fat body organında depolanmaktadır. İnsanda pankreatik α ve β hücrelerine eşdeğer olan hücreler aracılığı ile karbonhidrat homeostazı korunur. İnsülin benzeri peptidler karbonhidrat metabolizmasından sorumlu anahtar regülatördür ve memeli insülini ile homologtur. Sineklerin beyinde medyan nörosekretuar denilen bölgede bulunan insülin üreten hücreler (IPCs) pankreas β hücrelerin fonksiyonel homologudur (Rulifson vd. 2002) Ayrıca hemolenfte bulunan adipokinetik hormonu (Akh) depo yağlarının fat body organında lipid damlacıklarından mobilizasyonunu sağlar. Akh yolağı fonksiyonel olarak memeli glukagon yolağı ile homologtur ve enerjiye ihtiyaç duyulan açlık durumunda devrede olan lipokatabolik yolak için oldukça önemlidir (Musselman ve Kuhnlein 2018). Yüzük dokusunda bulunan korpus kardiyum (CC) Akh' nin salgılandığı bölgedir ve memeli pankreasının α hücrelerine denk gelir. Akh fonksiyonunun durdurulmasına yönelik CC bölgesinin genetik ablasyonu hipoglisemiye neden olurken, IPCs ablasyonu hemolenfteki (dolaşım sıvısı) threaloz konsantrasyonunun artışı ve hiperglisemi ile sonuçlanarak hayvanların diyabet özellikler sergilemesine neden olmuştur (Baker ve Thummel 2007).

İnsanda adipoz dokuda üretilen TNF molekülünün ortologu Eiger, diyet stresi (aşırı besleme veya yüksek şekerli diyet) durumunda fat body tarafından üretilir. Memelilerde olduğu gibi diyet stresi (aşırı beslenme) ile Eiger reseptörü olarak bilinen Wengen ve TLR aktivasyonu, JNK ve MyD88 yolakları aracılığı ile fat body dokusundaki Dilp etkisini durdurur ve insülin direnci meydana gelir. *Drosophila* fat body metabolik ve bağışıklık sinyali arasındaki bağlantının güçlü bir şekilde ortaya koyulabildiği bir dokudur (Hotamışlıgil 2017).

2.11 *Drosophila* Makrofajları

D. melanogaster, memeli kan hücrelerine eşdeğer olan hemolenf adı verilen ilkel, ancak etkili dolaşım sistemi ile filogenetik olarak korunmuş çeşitli hücresel ve moleküler

mekanizmaları kullanarak immün yanıtı ve enflamasyon sürecini kontrol eder. *Drosophila* dolaşım sistemi hücreleri larva ve erişkin dönemde fonksiyon gösteren üç çeşit hücre tipine farklılaşır: plazmatositler, kristal hücreler ve lamelloitler. Plazmatositler, memeli monositlerinin / makrofajlarının fonksiyonel eşdeğerleridir ve fagositik aktivite gösterir. Küçük ve yuvarlak şekle sahip olan, dolaşımdaki hemositlerin çoğunu temsil eder (% 95) plazmatositler yabancı patojenleri ve ölü dokuları fagosit eder. Lamellositler, büyük ve yassı (~% 2,5) hücreler olup fagositozlanamayacak kadar büyük yabancı cisimleri çok katmanlı hücresel kılıf yapısı oluşturarak etrafını sararak kapsülleme işlemi ile ortadan kaldırırlar (Vlisidou ve Wood 2015). Kristal hücreler, embriyoda ve larvada dolaşımda bulunan büyük hücrelerdir. Olgun kristal hücreler, büyük miktarda kristalize formda pro-fenoloksidaz (proPO) üretirler. Kristal benzeri içeriklerinden dolayı kristal hücreler olarak adlandırıldılar. Aktive olduklarında bu içerikleri hemolenfe salarak melanizasyon kaskadını başlatırlar (Ribeiro, C. & Brehelin, M.2006). Hemositler, heterojen hücre popülasyonları olarak hemolenf içerisinde bulunur ve enflamasyon durumunda aktive olmaya hazırdırlar (Defaye vd. 2009).



Şekil 2.16 *Drosophila* hemosit morfolojilerinin şematik gösterimi (Rizki ve Rizki 1959)

2.12 *Drosophila* Obez Model Yaklaşımları

Drosophila ile yapılan keşifler, obezite ile ilişkili hormonlar, organlar, dokular, sistemler, lipogenez ve lipolizi düzenleyen metabolik yolların evrimsel olarak korunduğunu göstermiştir (Musselman ve Kuhnlein 2018). İnsanda aşırı beslenmeye bağlı olarak gelişen obezite ile ilişkili hiperglisemi, kısalan ömür uzunluğu ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi komplikasyonların *Drosophila*'da da aynı şekilde gerçekleştiği bilinmektedir (Xi 2015, Parra-Peralbo vd. 2021).

İnsan obezitesini taklit edebilecek obez *Drosophila* modelinin oluşturulmasında genetik yatkınlık ve çevresel faktörlere dayanan iki çeşit yaklaşım vardır. Bunlardan ilki, enerji dengesi ve beslenme metabolizması ile ilgili genlerin manüplasyonu ile elde edilen obezite modelleridir. Bir diğer yaklaşım ise sinek besinlerine yüksek oranda şeker veya yağ ilave ederek diyet kompozisyonunun değiştirilmesidir (Smith vd. 2014). *Drosophila* obez model araştırmalarında genellikle erişkin ve üçüncü larval evredeki sineklerin fat body organları ile çalışılmaktadır (Musselman ve Kuhnlein 2018).

Drosophila genetik araçlar sayesinde hedeflenen genin fonksiyonunun inaktivasyonu, mutasyonu veya aşırı ifadesi sağlanarak genetik modeller oluşturulması açısından oldukça elverişlidir. Örneğin; memeli adipoz trigliserit lipaz ile homolog bir enzim olan ve enerji ihtiyacı halinde lipolizi uyarmakla görevli olan brummer lipaz enzimini kodlayan genin susturulması ile besinler depolanmaya devam ederken, trigliserid mobilizasyonunun gerçekleştirilememesi sonucunda obez sinek modeli elde edilmiştir (Gronke vd. 2005, Xi 2015).

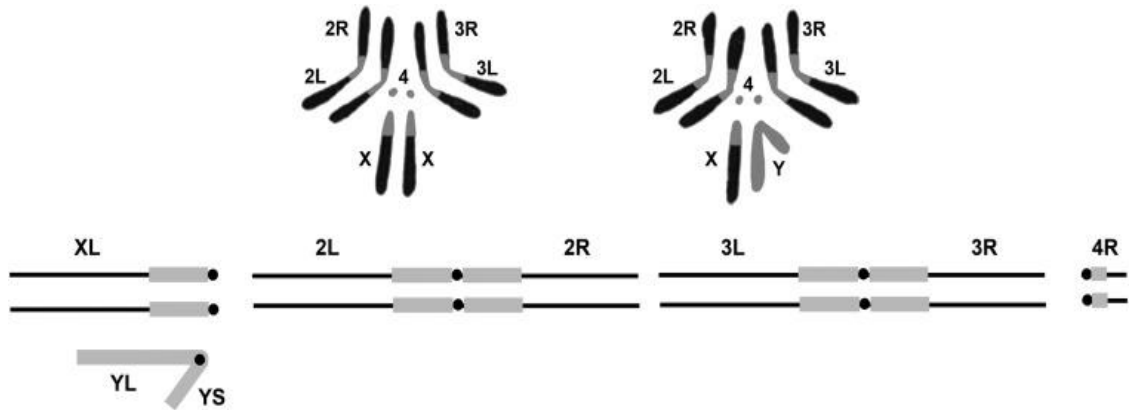
Araştırmacılar Batı tarzı obezojenik diyetle benzer beslenme ortamı oluşturarak obez model sinekler elde edebilmektedirler. Bunun için rutin beslenme kompozisyonuna %30 civarında hindistan cevizi yağı ilave edilmesi ile elde edilen obez fenotiplerde kardiyak disfonksiyonları, insülin/glukoz homeostazında dengesizlikler gibi insanda gelişen komplikasyonların aynı şekilde görüldüğü ortaya koyulmuştur (Birse vd. 2010, Smith vd. 2014). Çeşitli araştırma grupları tarafından yapılan çalışmalar, yüksek şekerli diyet ile

beslenen *Drosophila*’ da hiperglisemi, insülin direnci, kardiyovasküler komplikasyonlar ile birlikte T2DM hastalığının görüldüğünü ortaya koymuştur (Musselman vd. 2013).

Daha birçok çalışma *Drosophila*’ nın metabolizma ve özellikle obezite ile ilgili araştırmalarda kullanılabilecek çok güçlü ve faydalı bir model olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

2.13 *Drosophila* Genetiği

D. melanogaster, 4 çift kromozoma sahip olup, bu kromozomların ilk çifti eşey kromozomu ve diğer üç çift ise otozom kromozomlar olarak bilinmektedir. Eşey kromozomları akrosentrik X kromozomundan ve neredeyse tamamen heterokromatinden oluşan submetasentrik Y kromozomundan oluşmaktadır. İki adet X kromozomu dişi olarak, X ve Y kromozomlarının birlikte bulunması ise erkek birey olarak tanımlanır. Bunların dışındaki kromozom 2 ve 3 büyük metasentrik otozomlardır (Şekil 2.17). Kromozom 4 çok küçük noktasal bir otozomdur bu nedenle genetik müdahaleler için çok elverişli değildir (Hales vd. 2015).



Şekil 2.17 *D. melanogaster* dişi ve erkek kromozomları (Kaufman 2017)

Bir genetik model organizma ile çalışabilmek için gelişmiş genetik teknolojilerin kullanılmasıyla deneysel genetik manipülasyonları ve mutasyonları taşıyan kararlı soy stoklarının oluşturulması ve istenen genotip hatları oluşturmak amacıyla uygun stokları

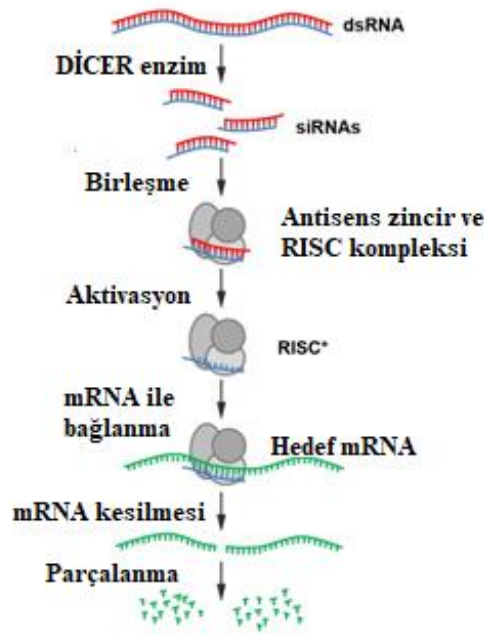
birbirleri arasında çaprazlamak gerekmektedir. On binlerce farklı genetik özelliğe sahip *Drosophila* stok hatları, Viyana *Drosophila* Kaynak Merkezi (VDRC), Bloomington *Drosophila* Stok Merkezi (BDSC), Ulusal Genetik Enstitüsü (NIG-Fly) ve Kyoto Stok Merkezi'nden temin edilebilmektedir (Greenspan 1997).

2.14 *Drosophila* Genetiğinde Kullanılan Genetik Yöntemler

2.14.1 RNA interferans (RNAi) tekniği

Drosophila ile ilgili çalışmalarda başarılı bir şekilde uygulanan RNAi yöntemi heyecan verici bir keşif olarak nitelendirilmektedir. RNAi mekanizması ile hücreye giren uygun çift zincirli RNA'nın (dsRNA) endojenik komplementeri olan mRNA dizisinin parçalanmasına yol açarak hedef genin transkripsiyonu susturulmaktadır (Fire vd. 1998).

RNAi mekanizmasının gerçekleştirilmesinde DICER (Ribonükleaz III cinsi enzim) ve RISC (RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksi) olarak adlandırılan iki enzim çok önemlidir. RNAi mekanizmasının ilk basamağında dsRNA, DICER endonükleaz enzimi aracılığı ile 21-23 nükleotidli siRNA fragmentlerine ayrılır. İkinci basamakta ise siRNA fragmentleri, yapısında endonükleaz, exonükleaz ve helikaz enzimlerini bulunduran RISC kompleksi ile bir araya gelerek hedef mRNA bölgesinde dejenerasyona neden olur (Şekil 2.18). Sonuç olarak ilgilenilen genin transkripsiyon aşamasında etkisizleştirilmesi ile genin ürünü olan proteinin sentezi azalmış olur (Elbashir vd. 2001, Akashi vd. 2004).



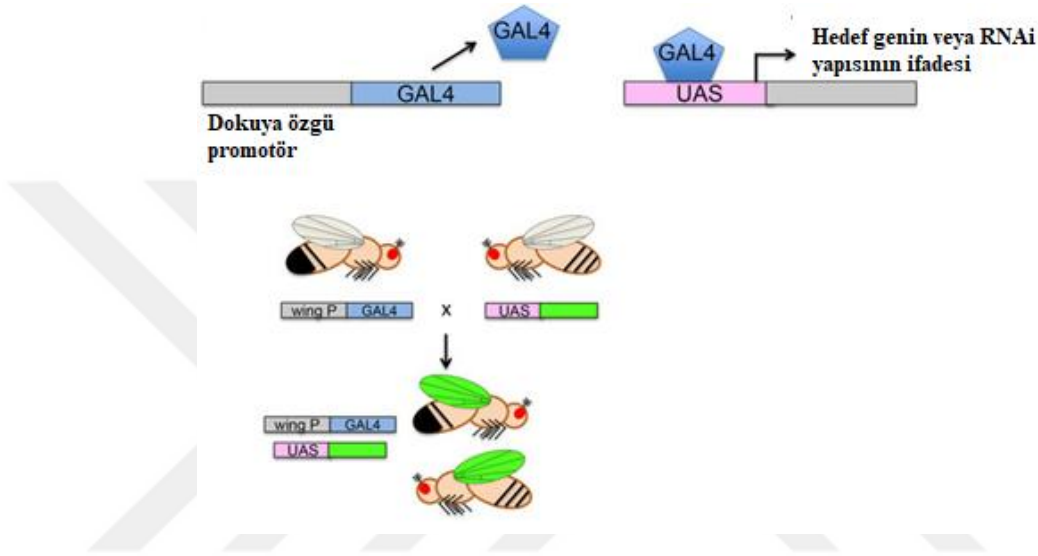
Şekil 2.18 RNAi mekanizmasının şematik gösterimi (Petrova vd. 2013)

2.14.2 GAL4-UAS sistemi

Andrea Brand ve Norbert Brand tarafından 1993 yılında tasarlanan güçlü bir genetik teknik ile tüm *Drosophila* dünyasında bir devrim yaşanmıştır. Gal4-UAS ikili sistemi, istenilen doku veya hücrede hedeflenen genin ifadesinin seçici aktivasyonuna izin vererek yönlendirilebildiği genetik bir araç olarak transgenik sinek hatlarının elde edilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Brand ve Perrimon 1993). Gal4 *Saccharomyces cerevisiae* mayasında bulunan bir proteindir fakat bu protein *Drosophila*' da endojen olarak bulunmadığı için metabolik süreçler ile etkileşim göstermemektedir (Bird ve Whisstock 2011).

Bu sistem yönlendirici (driver) hattı Gal4 ve UAS (yukarı akış aktive edici sekans) yanıtlayıcı hattı olmak üzere iki parçadan oluşur. Gal4 hedeflenen genin ifadesini sağlayan bir transkripsiyon aktivatörüdür. Yönlendirici (driver) Gal4 hattı Gal4 proteinini kodlayan Gal4 geni ve sadece hedeflenen dokuda Gal4 ifadesini oluşturacak dokuya özgü promotor bölgeyi içerir. Yanıtlayıcı (responder) hatlar ise araştırılmak istenen genin kodlama dizisini içeren gen bölgesini veya RNAi yapısını ve hemen yanında bulunan

UAS bölgesini içerir. Gal4 proteini UAS ile bağlandığında aktive olarak UAS bölgesinde bulunan hedeflenen genin transkripsiyonunu veya RNAi yapısında genin ektisizleştirilmesini sağlar (Şekil 2.19) (Elliott ve Brand 2008). Çok sayıda olası kombinasyon oluşturabilecek bu iki parça ayrı sinek hatlarında bulunur ve sineklerin çaprazlanması ile bir araya getirilerek birbirine bağlanır. Böylece Gal4-UAS sistemine sahip olan bireyler elde edilir (Allocca 2018).

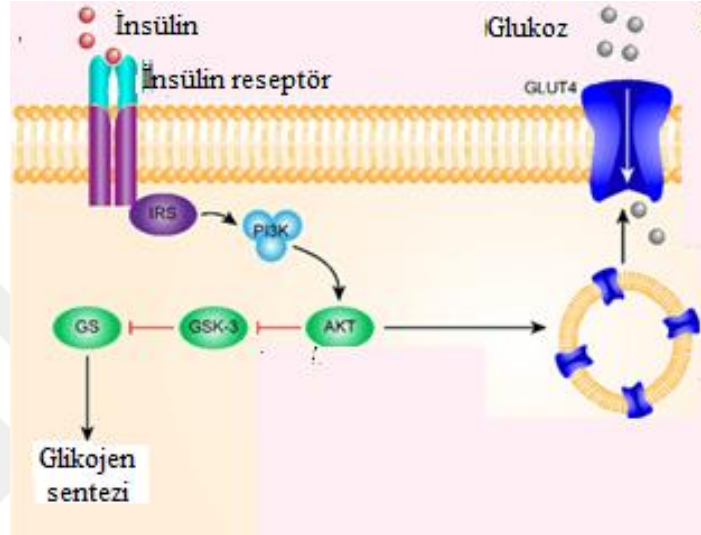


Şekil 2.19 GAL4-UAS sistemi (Hales vd. 2015)

2.15 Obezitede İnsülin Sinyal Yolu

İnsülin, pankreasın langerhans adacıklarında bulunan β -hücreleri tarafından sentezlenen anabolik peptid bir hormondur. İnsülin, metabolik fonksiyonları düzenleyen pleiotropik bir role sahiptir ve başlıca fonksiyonlarından biri kanda bulunan yüksek glukoz konsantrasyon düzeylerine yanıt oluşturmaktır. İnsülin besin alımından sonra yükselen kan glukoz düzeylerine yanıt olarak beta hücrelerinden salınır. İnsülin, hücre membranında bulunan heterotetramerik yapıdaki tirozin kinaz grubu olan insülin reseptörüne bağlanarak, insülin sinyalini adaptör protein olan IRS-1 aracılığı ile hücre içine aktarır ve böylece çok dallı bir yolak boyunca sinyal kaskadı başlatılır (Zatterale vd. 2019). IRS-1 fosforilasyonu PI3K ve AKT (Protein Kinaz B) aktivasyonunu başlatarak GLUT4 kanalının membrana hareketi glukozun hücre içine alımı gerçekleştirilir (Şekil 2.20). Ayrıca aktive edilen AKT glukojen sentez kinaz 3 (GSK3) fosforilasyonunu

gerçekleştirir. GSK3, sürekli olarak aktif olan ve sürekli glukojen sentaz (GS) fosforilasyonu yapan bir enzimdir. GS'nin fosforilasyonu glukojen sentezini inibe eder. GSK3'nın AKT tarafından fosforilasyonu GSK3'ün inhibisyonuna ve dolayısıyla GS aktivasyonuna sebep olarak glukojen sentezini artırır. Böylece glukojen sentezi ilgili anabolik süreçler indüklenir (Şekil 2.20) (Frame ve Cohen 2001).

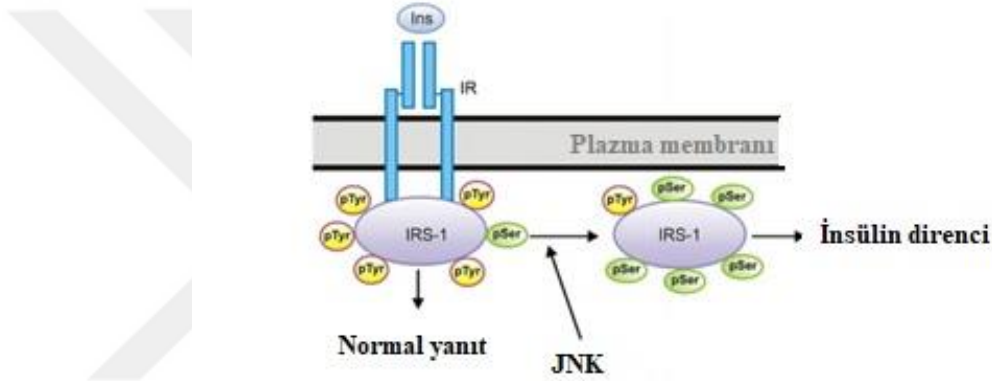


Şekil 2.20 İnsülin sinyalinin etki mekanizması

IRS-1 proteini karboksi terminalinde insülin sinyal yolağının regülasyonunu sağlayan tirozin ve serin/treonin (S/T) motiflerine sahiptir. IRS-1 molekülünün tirozin fosforilasyonu insülin sinyal yolağının aktive edilmesi ile sonuçlanır. Metabolik regülasyonun sağlanabilmesi için aktive olan insülin sinyal yolağının durdurulması da oldukça önemlidir. IRS serin/treonin motiflerinin fosforilasyonu ile insülin sinyal yolağı engellenir (Şekil 2.21). IRS serin/treonin fosforilasyonu fizyolojik negatif geri bildirim kontrol mekanizması sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Sykiotis ve Papavassiliou 2001, Zick 2001).

İnsülin sinyal sisteminin zarar gördüğü durumlarda insülin hassasiyeti olan başlıca dokularda (adipoz doku, karaciğer, iskelet kası) insülin yanıtın oluşturulamaması veya insülin duyarlılığının azalması sonucunda insülin direnci gelişir. Bu durumda insülin aracılığı ile hücre içine glukoz alımı gerçekleştirilemez ve glukoz metabolizması zayıflar. Pankreatik β -hücreleri bu durumu kompanse etmek için sürekli ve daha fazla insülin

salınımına devam eder. Bununla birlikte insülin duyarlılığının giderek daha da zayıflaması β -hücrelerinde yorgunluğa ve hiperglisemi gelişimine neden olur (Hancer vd. 2014). Obezite koşullarında insülinin etkinliğini gösterebilmesi için gerekli olan ve sinyal ağının dağılımından sorumlu olan IRS-1 molekülünün inaktivasyonu, insülin direncine neden olan en önemli mekanizmalardan biridir (Singla vd. 2010, Zatterale vd. 2019). Obez adipoz dokudaki adipositlerden ve makrofajlardan salınan TNF- α sitokininin IRS molekülünde serin/treonin fosforilasyonuna neden olduğunun gösterilmesi ile birlikte obezite ile ilişkili insülin direncinin altında yatan en önemli nedenin enflamasyon olduğu kabul edilmektedir (Hirosumi vd. 2002, Tanti ve Jager 2009).



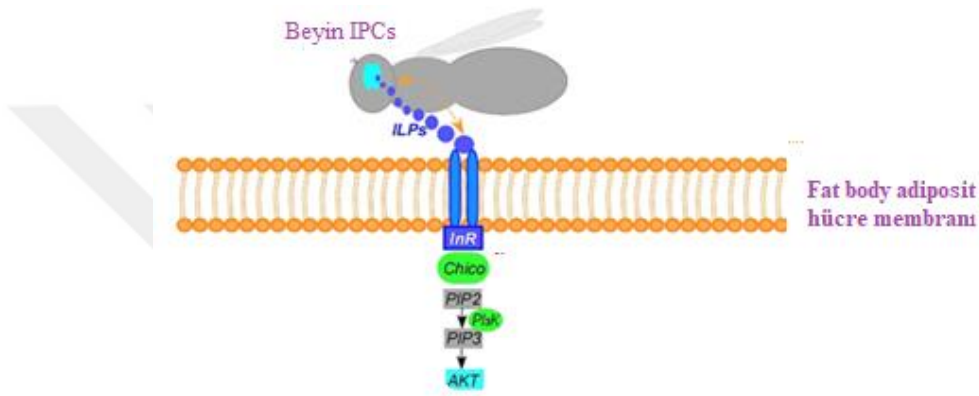
Şekil 2.21 IRS molekülünü aktive eden tirozin (pY) fosforilasyonu ve inaktive eden ser/thr (pS) fosforilasyonu (Le Roith ve Zick 2001)

2.16 *Drosophila* İnsülin Sinyal Yolağı

Drosophila ile yapılan çalışmalar insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) ve IGF reseptörünü kodlayan genlerdeki kusurların insülin sinyalizasyonunun zayıflayarak farelerdeki ile benzer şekilde gelişim kusurlarına neden olduğunu göstermiştir. İnsan ve *Drosophila* insülin sinyal yolağı büyümeyi, üremeyi, yaşam süresini, metabolizmayı kontrol eder ve nöroendokrin yollar tarafından düzenlenir. Genetik analizler *Drosophila* ve insan arasındaki insülin sinyal yolağının yapısal ve fonksiyonel olarak yüksek derecede korunduğunu göstermektedir (Garofalo 2002).

Drosophila'da korpara kardiyaka ve beyindeki insülin üreten hücreler (IPCs)'den insülin benzeri peptidler (ILPs) salgılanır ve bu peptidler insüline benzer davranış sergiler.

Tokluk durumunda beyinden ILPs salınımı gerçekleşerek hücre membranındaki α ve β alt birimine sahip olan insülin reseptörüne bağlanır. Bu bağlanma bölgesi evrimsel olarak korunmuş olup memeli insülini tarafından da aktive edilebilmektedir. İnsülin reseptörünün aktivasyonu ile IRS1-4 homologu olan CHICO aracılığı ile bir sinyal kaskadı başlatılır (Fernandez-Almonacid ve Rosen 1987, Bohni vd. 1999). CHICO tarafından aktive edilen PI3K, PIP2 molekülünün fosforillenmesi ile PIP3 formuna dönüşümünü katalizler. Artan PIP3 seviyeleri ile AKT aktivasyonu gerçekleştirilir (Şekil 2.22)



Şekil 2.22 *Drosophila* insülin benzeri peptidlerin (ILPs) CHICO aracılı sinyal iletimi (Toprak 2020)

Drosophila glukoz metabolizmasını düzenleyen ILPs, memeli insülini ile sekans, yapısal ve işlevsel benzerliklere sahiptir. Böylece ILPs üretimi açlık durumunda azalırken, tokluk süreçlerinde artış gösterir. *Drosophila* organizmasının yüksek şekerli diyetle maruz kalması sonucunda azalmış insülin yanıtı oluşturması ve insanda tip2 diyabet patofizyolojisine benzer bir durum sergilemesi, insülin direnci ve obezite çalışmalarında sineklerin model olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Musselman vd. 2011).

2.17 TNF- α Sinyal İletim Yolağı

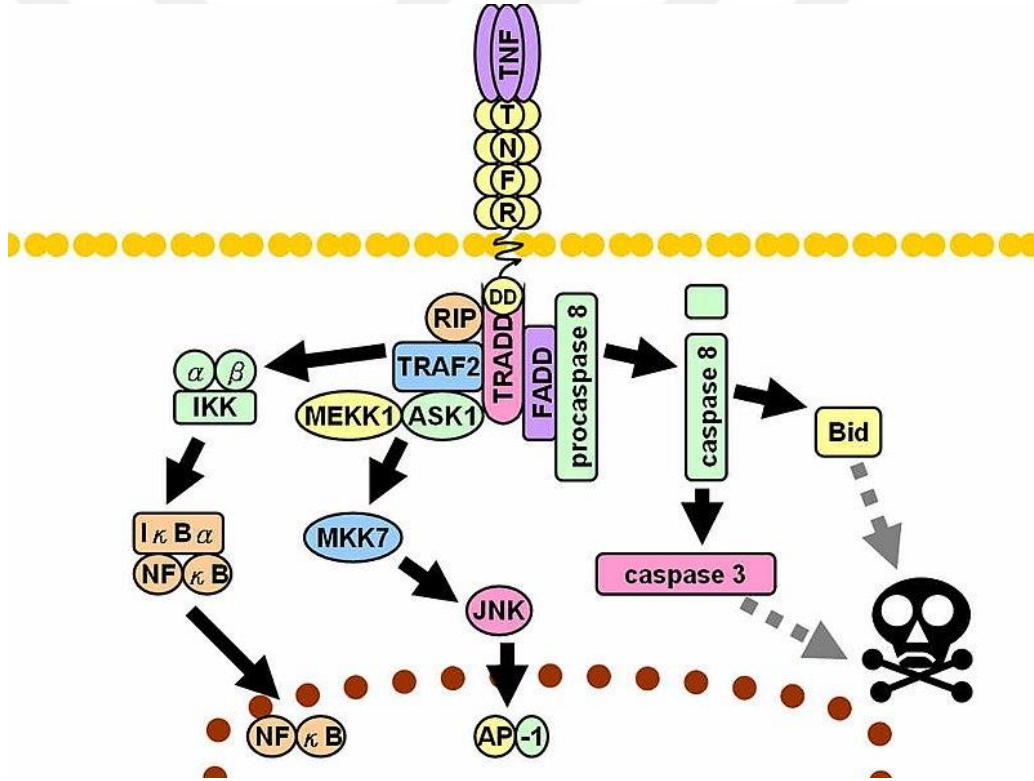
Endotoksin enjekte edilen deney hayvanlarının tümörlerinde hemorajik nekroza neden olduğu için Tümör Nekrozis Faktör (TNF) olarak adlandırılan bu sitokin süper ailesinin en çok çalışılan üyesi TNF- α olarak bilinmektedir. TNF- α , fizyolojik olarak normal

süreçte enflamatuar yanıt ile ilgili sürecin başlatılması ve enflamasyonun çözülmesinden sorumlu olan en önemli düzenleyicidir (Sedger vd. 2014). TNF- α , bağışıklık hücrelerinin fizyolojik fonksiyonlarında, hücre proliferasyonunda ve programlanmış hücre ölümünde önemli fonksiyonlara sahiptir. Özellikle makrofajlar, mikroglia, Langerhans hücreleri ve Kupffer hücreleri gibi monosit kökenli hücreler TNF- α ifadesine sahiptir. Bu nedenlerden dolayı TNF seviyelerinde meydana gelebilecek düzensizliklerin, romatoid artrit, ateroskleroz ve nörolojik hastalıklar dâhil olmak üzere kronik otoimmün ve immün yetmezlik hastalıkları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Parameswaran ve Patial, 2010). Adipoz dokudan üretilen ilk adipokin olarak keşfedilen TNF- α 'nın obez adipoz dokuda artışı obezitenin enflamatuar kökeni ve metabolik patolojilerin nedeni olarak kabul edilmektedir. TNF- α enflamasyon sürecindeki bilinen en erken başlatıcı olarak diğer sitokinleri, enflamatuar sinyal yollarını ve hücreleri uyararak enflamasyon sürecinin uzamasına neden olabilmektedir. Sitokin üreten hücreler ile sitokin ile aktive olan bağışıklık hücreleri arasında oluşan döngü kronik enflamasyonun mekanik nedeni olarak kabul edilmektedir (Sedger vd. 2014).

TNF- α biyolojik etkinliğini farklı hücre içi sitoplazmik bölgelere sahip olan TNFR1 ve TNFR2 olmak üzere iki farklı reseptör üzerinden gerçekleştirir. TNF- α 'nın TNFR1 ile ligand kompleksi oluşturması sonucunda TRADD adaptör proteini üzerinden kaspaz-8 sinyal yolağı aktive edilerek apoptoz indüklenmektedir. Ayrıca TRADD proteini üzerindeki farklı bir bölge üzerinden ise immün sistem için oldukça önemli olan NF- κ B sinyal yolağı aktive edilebilmektedir. Buna ek olarak MKK3 aracılığı ile p38 (MAPK) sinyal yolağının da TRADD üzerinden aktive edildiği bilinmektedir.

Bir diğer reseptör olan TNFR2 ile TNF- α 'nın oluşturduğu ligand kompleksine bağlanan TRAF1/2 (TNF-Reseptör ile ilişkili Faktör) adaptör proteini üzerinden IKK α /IKK β (IKK β yolağı) kompleksi aktive edilmektedir. Bu aktivasyon sonucunda fosforilasyona uğrayan I κ B α / β proteinleri parçalanarak NF- κ B sinyal yolağını açarlar. Aktive olan TRAF2 aynı zamanda CIAP2 üzerinden MEKK1/7 yolu üzerinden obezite ile ilişkili olan ve insüline duyarlı olan dokularda insülin direncinden sorumlu olan en önemli izoform olan JNK1 sinyal yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır. Özellikle kronik enflamasyon ve insülin direnci ile karakterize edilen proenflamatuar makrofaj

infiltrasyonunda JNK aktivasyonu kritik öneme sahiptir (Karin ve Gallagher 2005, Solinas ve Becattini 2017). JNK yolağı, IRS-1 molekülünü fosforile ederek IRS-1 inaktivasyonuna neden olmaktadır. Böylece inaktif durumdaki IRS-1 ile PI3K etkileşim gösteremeyerek, glukozun hücre içine alımı engellenmektedir. Bu durum, insülin sinyalizasyonunun ortadan kalkması ile meydana gelen insülin direnci mekanizmasını oluşturmaktadır (Boura-Halfon ve Zick 2009, Feng vd. 2020). TNF sinyali aracılığı ile çoğaltılan IKK β /NF- κ B ve JNK/AP-1 merkezi inflamasyon sinyal yolakları, TNF sitokininin kendisi de olmak üzere çeşitli proenflamatuar sitokinlerin artışına neden olarak inflamasyonun daha fazla kronikleşmesine ve insülin direncinin şiddetlenmesine neden olmaktadır (Hotamışlıgil 2017, Feng vd. 2020).



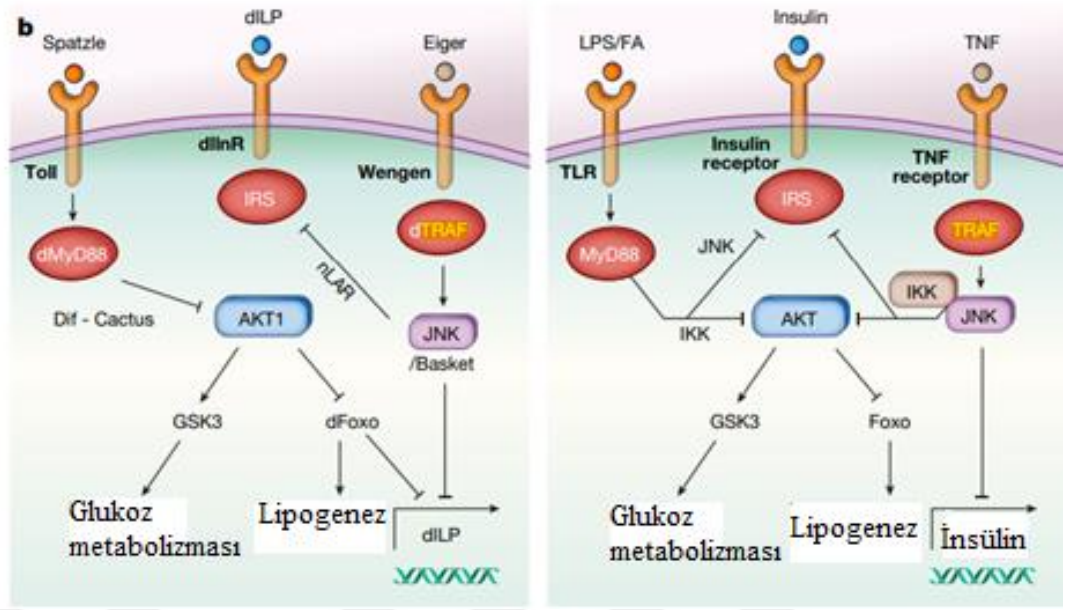
Şekil 2.23 TNF- α sinyal iletim yolağı

2.18 *Drosophila* TNF-a Sinyal İletim Yolağı

Memeli proinflammatuar sitokin olan TNF- α 'nın, *Drosophila* ortologunun *Eiger* (*egr*) olduğu bilinmektedir. Ektopik *egr* ifadesinin *Drosophila*'da küçük göz fenotipine sebep

olduğunun gösterilmesi ile hücre ölümü yolağının aracısı olarak ilk kez tanımlanmıştır (Igaki vd. 2002). Sonrasında yapılan çalışmalar, *eiger-L* ve *eiger-S* olarak adlandırılan iki farklı eiger izoformunun olduğunu gösterse de bu iki ligandın fonksiyonel ve ifade bakımından birbirinden farklı olmadığını göstermektedir (Kauppila vd. 2003, Igaki ve Miura 2014). Çoğunlukla fat body hücrelerinden sentezlenen eiger, insülin üreten hücrelerden Dilps salınımını kontrol edebilen metabolik bir hormon olarak tanıtılmaktadır. TNF- α sinyalinin akış aşağı yollarından biri olan JNK yolağının inhibisyonu ile birlikte yüksek glisemik değerleri düzenlenebilmektedir. JNK aktivasyonunun uyarılması ise memelilerin β hücrelerinde gerçekleşen durumda olduğu gibi insülin geninin ifadesinde azalmaya neden olmaktadır. Bu durum TNF- α fonksiyonu ile ilişkilendirilebilen insülin direncini oluşturan patolojik mekanizmaların ve sinyal yollarının *Drosophila*' da korunmuş olabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır (Wang vd. 2005, Agrawal vd. 2016, Sethi ve Hotamışlıgil, 2021).

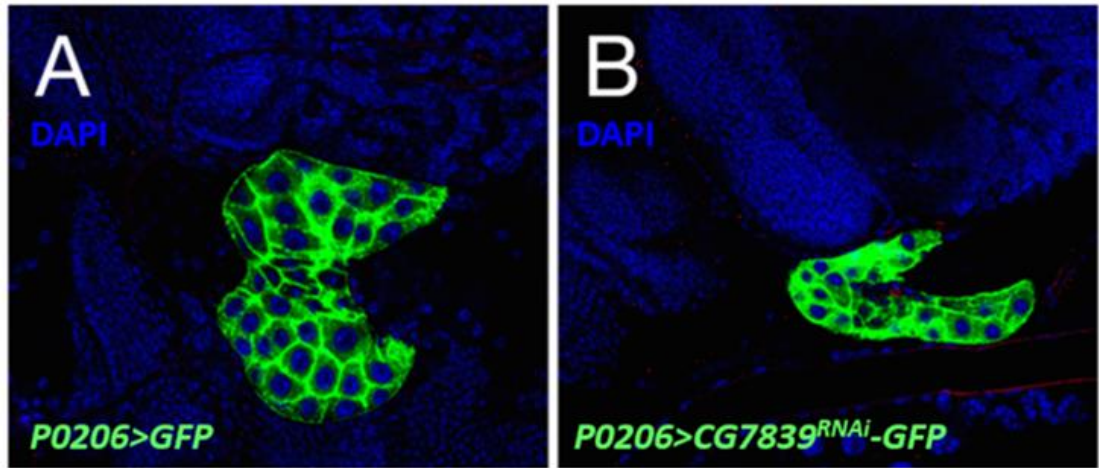
Eiger etkinliğini *wengen* (*wgn*) ve *grindelwald* (*grnd*) olarak tanımlanan iki farklı reseptör aracılığı ile gerçekleştirmektedir. *Wgn* tanımlanan ilk eiger reseptörüdür ve sinyal iletimini aktarabilecek bir sitoplazmik bölgeye sahip olmadığı için ko-reseptör olarak fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir (Kanda vd. 2002). Bir diğer reseptör olan *grnd* TNF reseptörlerinde olduğu gibi hücre dışı bölgeye ve TRAF2 ile etkileşime girebilen sitoplazmik hücre içi bölgeye sahip olan transmembran proteindir (Andersen vd. 2015). Eiger, metabolik süreçlere aracılık eden insülin sinyal yolağının kontrolünü *grnd* reseptörü aracılığı ile gerçekleştirmektedir ve Grnd/JNK sinyal hattı üzerinden insülin sinyalini engelleyebilen bir fonksiyona sahip olduğu kabul edilmektedir (Agrawal vd. 2016).



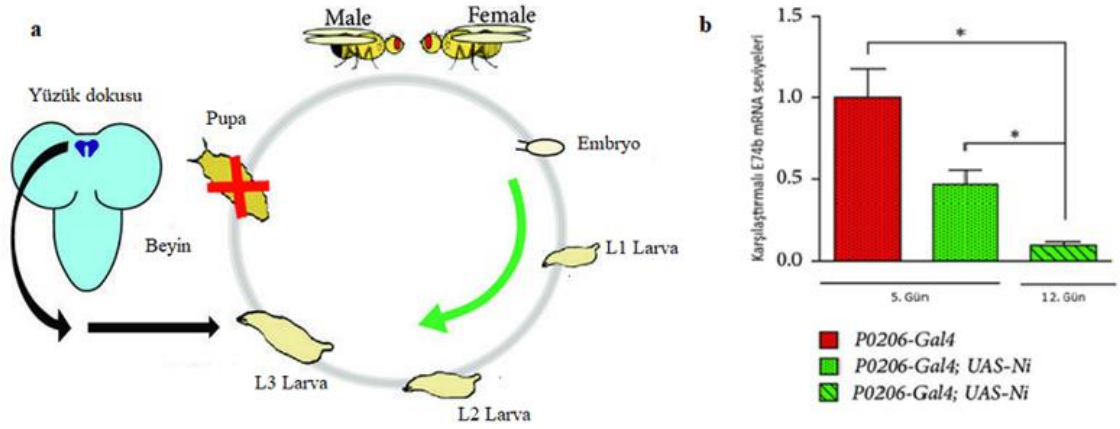
Şekil 2.24 İnsan ve *Drosophila* JNK yolağının insülin etki mekanizması (G. S. Hotamışlıgil 2017)

2.19 Obez *Drosophila* P0206>CG7839RNAi Modeli

Paola Bellosta tarafından geliştirilen P0206>CG7839^{RNAi} model *Drosophila* larvalarında, protein sentezinde ribozomal 60S alt biriminin nükleustan stoplazmaya transportundan sorumlu olan ve maya Noc1 proteininin homologunu kodlayan CG7839 geninin ifadesini RNAi tekniği ile protorasik dokuya özgü baskılanması ile ribozomal altbirimlerin birleşememesine bağlı olarak protorasik dokuda protein sentezinin engellendiği düşünülmüştür (Dlakic ve Tollervey 2004). Bizim çalışmamızda, GAL4-UAS ikili sistemi kullanılarak CG7839 gen ifadesinin RNAi tekniği ile protorasik dokuya özgü olarak baskılanması sonucunda ribozomal altbirimlerinin azalmasına bağlı olarak protorasik bezin küçüldüğü (Şekil 3.1) ve bu bezden salınan ekdison hormonunun sınırlandırıldığı (Şekil 3.2) bilinen P0206-GAL4; UAS-Ni larva modeli kullanılmıştır.



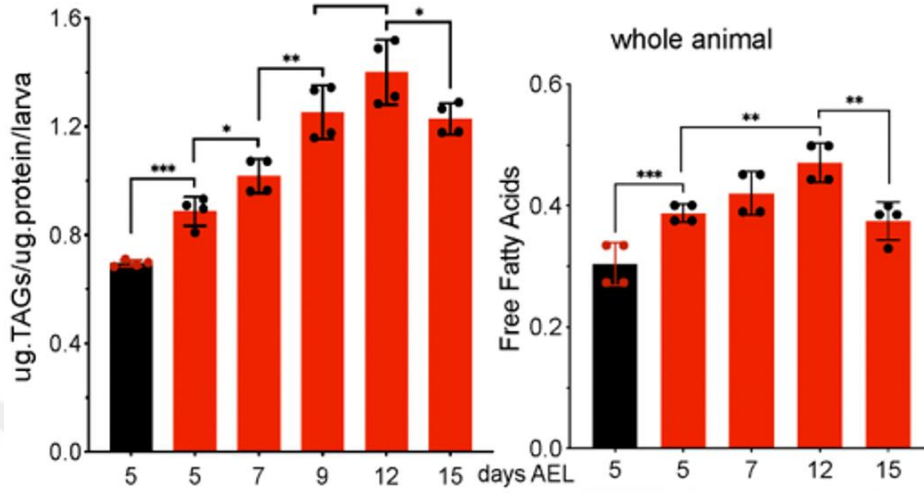
Şekil 2.25 Kontrol (A) ve P0206>CG7839RNAi larvalarından alınan protorasik bez (B) (Destefanis vd. 2022)



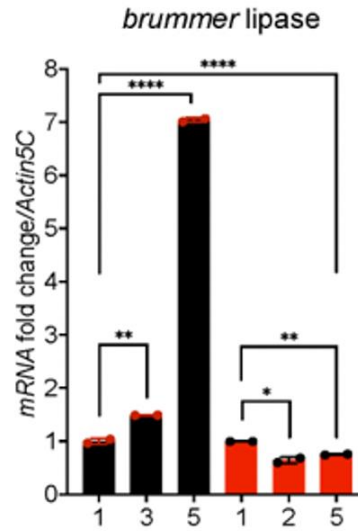
Şekil 2.26 Protorasik dokuda CG7839RNAi ifadesinin ecdison seviyeleri üzerindeki etkisi (Valenza vd. 2018)

Bellosta'nın laboratuvarında P0206>CG7839^{RNAi} larva modeli kullanılarak elde edilen önceki çalışmalarda, tüm larvada total triasilgliserol (TAG) seviyelerinin ve serbest yağ asidi miktarının zamanla arttığı (Şekil 2.27), adipoz trigliserid lipaz (ATGL) enziminin homoloğu olan brummer lipaz gen ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (Şekil 2.28). Metabolik profil ile ilgili bu çalışmalar P0206>CG7839^{RNAi} larva modelinde lipid metabolizması ile ilişkili anabolik yolların aktif olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu sonuçlar, diğer obez kemirgen hayvan modeli ve insan hastalardan elde edilen bulgularla örtüşmektedir (Hirosumi vd. 2002, Ahmadian vd. 2007, Jung ve Choi 2014).

P0206>CG7839^{RNAi} modelinin, *Drosophila* organizmasında obeziteyi incelemek için yeni bir model olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.27 Tüm larvada TAG ve serbest yağ asidi seviyeleri (Siyah grafikler kontrol grubunu ve kırmızı grafikler P0206>CG7839^{RNAi} obez larva modelini temsil etmektedir) (Mirzoyan vd. 2023)



Şekil 2.28 brummer lipaz gen ifadesi seviyeleri (Siyah grafikler kontrol grubunu ve kırmızı grafikler P0206>CG7839^{RNAi} obez larva modelini temsil etmektedir) (Mirzoyan vd. 2023)

Obezite ile birlikte adipoz dokuda artan lipid birikiminin meydana gelmesi sonucunda adipoz dokuda makrofaj infiltrasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Daha önce Bellosta'nın laboratuvarında yapılan çalışmalar, P0206>CG7839^{RNAi} larva modelinde artan lipid seviyelerine bağlı olarak hemositlerin adipoz doku ile aynı fonksiyona sahip olan fat body dokusunda biriktiğini göstermiştir. P0206>CG7839^{RNAi} modelinde (12. gün) beyin ve bağırsak dokusunda hemosit birikimi yoktur. Bu durum fat body hücrelerinde özel bir sinyalin (eiger) aktive edildiğini göstermektedir



3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan; agar ZN5 B&V firmasından, şeker kamışı melası Naturitas firmasından, Schneider diseksiyon medium GIBCO firmasından, Vectashield Antifade kapatma solüsyonu, DAPI VectorLab firmasından, DABCO-Mowiol kapatma solüsyonu Carl Roth GmbH firmasından, fosfat tampon çözeltisi (PBS), Hoechst boyama kiti 33258, Nil-Kırmızısı boyama kiti, Paraformaldehit (PFA), BSA- Applichem firmasından, nipagin, propiyonik Asit Fischer firmasından, Alexa Fluor 488 Phalloidin boyama kiti, anti-Tavşan Alexa555 sekonder antikor, etanol, metanol Merck, firmasından temin edilmiştir.

Rutin sinek kültürü için suluboya fırçası, soğuk ışık kaynağı Euromex firmasından, *Drosophila* kültür flakları, plastik şişeler Biologix firmasından, ince forsepsler Dumont firmasından temin edilmiştir.

Tez çalışmasında; Görüntülerin alınması ve diseksiyon işleminin gerçekleştirilmesi için konfokal mikroskop (Axio Imager 2 Zeiss), 3D doku mikroskobu, TCS-SP5 ve TCS-SP8 (Leica), stereo (diseksiyon) mikroskop (Zeiss), sineklerin hareketsiz kalmasını sağlayan CO₂ anestezi ekipmanı (The FlyStuff) kullanılmıştır. Kullanılan diğer önemli cihazlar orbital çalkalayıcı (Bellco), besin dağıtım aparatı (Droso-Filler), hassas terazi (Sartorius), analitik terazi, otoklav (PBI), biyogüvenlik kabini (Esco), buhar ceketli pişirme cihazı (Groen), BOD inkübatör (Invictus), buz makinesi (Scotsman), dijital kurutma ve ısıtma banyosu (BenchMark), zaman, hız ve sıcaklık kontrollü santrifüj (Eppendorf), çalkalayıcı (Universal table), vorteks (Heiolph), kullanılmıştır.

Bu tez çalışması Trento Üniversitesi Hücresel ve Bütünleştirici Biyoloji Merkezi'nin (CIBIO) metabolizma laboratuvarı biriminde Paola Bellosa' nın koordinatörlüğündeki ve bu merkezde bulunan cihazlar ile gerçekleştirilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Çaprazlamada kullanılan *Drosophila* hatları

Deneylerimizde kullandığımız sinek hatlarının özellikleri ve temin edildikleri kaynaklar çizelgede belirtilmiştir (Çizelge 3.1). Ayrıca elde edilen *D. melanogaster* genotipleri ve bu genotiplerin oluşturulmasında kullanılan sinek hatları çizelge 3.2’ de gösterilmiştir (Çizelge 3.2). Deneylerimizdeki çaprazlama deneyleri 3 aşamadan oluşmaktadır. Obez fenotipe sahip olan larvaları oluşturmak için yapılan ilk çaprazlama sonucunda *PO206-GAL4,UAS-CG7839^{RNAi}* (Ni) genotipine sahip larvalar elde edilmiştir. Sonrasında hemositlerin işaretlenebilmesini sağlayan Hml-RFP (HmlΔ-DsRed) genotipe ve obez genetik iskelete sahip olan sinekler çaprazlanarak enflamasyonun analizi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada gerçekleştirilen kompleks çaprazlamada ise hemositleri işaretlenmiş obez genotipe sahip olan sinekler, *eiger/TNFα* sinyal yolağının durdurulmasını sağlayabilecek *egr¹*, *egr^{1AG}*, *grnd^{-/+}* mutant sinek hatları ile sırası ile çaprazlanmıştır. Bu kompleks çaprazlamayı gerçekleştirebilmek için ise her bir mutant sinek hattının hemositleri işaretlenmiş obez genotip iskeletini oluşturabilmek için ise rekombinant sinek hatları oluşturulmuştur. PO206-GAL4 olarak adlandırılan kontrol grubu ile yapılan deneyler için yaşam döngülerinin 5. gününde elde edilen veriler kullanılmıştır. Obez fenotipe sahip olan *PO206-GAL4,UAS-Ni* grubu için yaşam döngülerinin 5. ve 12. gününde elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Obez mutant sinek deney grupları için ise yaşam döngülerinin 12. günündeki sonuçlar kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Sinek hatları, ifade özellikleri ve kaynakları

Sinek Hatları	İfade Özelliği	Kaynak
PO206-GAL4	Sürücü-Sadece Protorasik doku	Colombani vd. 2005
UAS-CG7839 ^{RNAi}	Yanıtlayıcı- CG7839 geninin RNAi ifadesi	Bloomington <i>Drosophila</i> Stok merkezi (BL 25992)
Hml-RFP/CyO	Sadece hemositler için RFP raportörüne sahip transgenik sinek hattı	BRÜCKNER LAB, Katja Brückner (Kaliforniya Üniversitesi, San Francisco)

Çizelge 3.1 Sinek hatları, ifade özellikleri ve kaynakları

Sinek Hatları	İfade Özelliği	Kaynak
<i>egr</i> ¹	Eiger mutant sinek hattı	Hediye, Bruno Lemaitre
<i>egr</i> ^{1AG}	Eiger mutant sinek hattı	Hediye, Hugo Stocker
<i>grnd</i> ^{-/+}	Eiger reseptörü mutan sinek hattı	Hediye, Bruno Lemaitre

Çizelge 3.2 D. melanogaster genotipleri ve kullanılan sinek hatları

Hedeflenen Genotip	Kullanılan sinek hatları
<i>P0206-GAL4</i> (Kontrol)	➤ $\frac{+}{+}; \frac{P0206-GAL4}{+}; \frac{+}{+}$
<i>P0206-GAL4; UAS-Ni</i> (Obez model)	➤ $\frac{+}{+}; \frac{P0206-GAL4}{+}; \frac{+}{+}$ ➤ $\frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{+}$
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4</i> (Hemosit kontrol)	➤ $\frac{+}{+}; \frac{P0206-GAL4}{+}; \frac{+}{+}$ ➤ $\frac{+}{+}; \frac{Hml-RFP}{Cyo}; \frac{+}{+}$
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4; UAS-Ni</i> (Hemosit rapörter obez model)	➤ $\frac{+}{+}; \frac{P0206-GAL4}{+}; \frac{+}{+}$ ➤ $\frac{+}{+}; \frac{Hml-RFP}{Cyo}; \frac{+}{+}$ ➤ $\frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{+}$
Rekombinant sinek hattı (Mutant sinek hatları için hazırlanan rekombinant altyapısı)	➤ $\frac{+}{+}; \frac{P0206-GAL4, Hml-RFP}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6B}$
<i>egr</i> ¹ / <i>Hml-RFP/P0206-GAL4; UAS-Ni</i>	➤ $\frac{+}{+}; \frac{egr1}{egr1}; \frac{+}{+}$ ➤ $\frac{+}{+}; \frac{+}{+}; \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{UAS-CG7839^{RNAi}}$ ➤ $\frac{+}{+}; \frac{P0206-GAL4, Hml-RFP}{Cyo}; \frac{MKRS}{TM6B}$

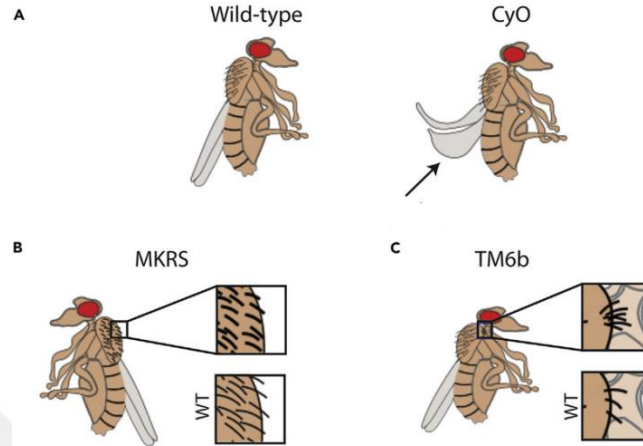
Çizelge 3.2 D. melanogaster genotipleri ve kullanılan sinek hatları (devam)

Hedeflenen Genotip	Kullanılan sinek hatları
<i>egr^{1AG}/Hml-RFP/PO206-GAL4; UAS-Ni</i>	➤ $\frac{+}{+}, \frac{egr1AG}{+}, \frac{+}{+}$ ➤ $\frac{+}{+}, \frac{+}{+}, \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{UAS-CG7839^{RNAi}}$ ➤ $\frac{+}{+}, \frac{PO206-GAL4, Hml-RFP}{CyO}, \frac{MKRS}{TM6B}$
<i>Grnd^{+/+}/Hml-RFP/PO206-GAL4; UAS-Ni</i>	➤ $\frac{+}{+}, \frac{grnd}{grnd}, \frac{+}{+}$ ➤ $\frac{+}{+}, \frac{+}{+}, \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{UAS-CG7839^{RNAi}}$ ➤ $\frac{+}{+}, \frac{PO206-GAL4, Hml-RFP}{CyO}, \frac{MKRS}{TM6B}$

Protorasik dokuya özgü olarak CG7839 geninin baskılandığı sinek soylarını elde edebilmek için çaprazlamalar gerçekleştirilmiştir. Bu çaprazlamalarda PO206-GAL4, UAS-CG7839^{RNAi} ve Hml-RFP/CyO (HmlΔ-DsRed) sinek hatları kullanılmıştır. Çaprazlama için RNA interferans yöntemi kullanılarak CG7839 geninin baskılandığı sinek hattının kodu: UAS-CG7839^{RNAi} olarak tanımlanmıştır. Deneylerimizde RNAi tekniği ile CG7839 geninin baskılandığını ifade etmek için bazı yerlerde CG7839^{RNAi} kısaltması olarak “-Ni-” kısaltması kullanılmıştır (CG7839 geni maya Noc1 proteininin homologunu kodlar). Protorasik dokuda normal CG7839 ifadesine sahip olan sinek hattının kodu: PO206-GAL4 olarak tanımlanmış olup deneylerimizde kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hml-RFP/CyO olarak tanımlanan sinek hattında sadece hemositlerde ifade edilebilen hemolektin promotörü bulunur ve kırmızı floresan protein (RFP) raportörü aracılığı ile hemositler işaretlenebilmektedir.

Sinek hatlarının çoğu rekombinasyon sürecini önleyerek mutant sinek stoklarının kararlı bir şekilde saklanabilmesini ve çaprazlamalarda atasallardan gelen genotipin korunmasını sağlayan dengeleyici (balancer) kromozomlara sahiptir. Bu dengeleyici kromozomlar bazı fenotipik belirteçlere sahiptir. Deneylerimizde kullandığımız sinek hatlarında CyO,

MKRS, TM6b dengeleyici kromozomları, erişkin sineklerde sırası ile kıvrıkcık kanat yapısı, notum bölgesinde daha kısa, kalın kıllar ve humeral bölgede daha yoğun ilave kıllara sahip olması ile ayırt edilmektedir.



Şekil 3.1 Dengeleyici ve belirteçlerden kıvrıkcık kanat (CyO) (A), sert kıl yapısı (MKRS) (B), daha yoğun kıl miktarı (TM6b) (C) (Coutiño vd. 2021)



Şekil 3.2 CyO dengeleyici kromozomuna sahip kıvrıkcık kanatlı sinek (FlyBase 2023)

3.2.2 Sinek besiyerinin hazırlanması

Düz tabanlı plastik tüplerin içerisinde bulunan besiyerinde *D. melanogaster* stokları muhafaza edilmiştir. Sinek besiyerinin hazırlanması için ısıtıcı 95 °C sıcaklığa ayarlanarak ısıtıcı içine 1 litre su ilave edilmiştir. Su ısınmaya başladığında çizelgede belirtilen miktarlarda agar, mısır unu, beyaz şeker ve bira mayası (Çizelge 3.3) suya ilave

edilerek karışım 50 dakika boyunca pişirilmiştir. Bu süre tamamlandıktan sonra şeker kamışı melası ilave edilerek besiyerinin pişirilmesine 10 dakika daha devam edilmiştir. Isıtıcı kapatılarak besiyeri 65-70°C' ye kadar soğuduğunda 1 gr nipagin ve 10ml propiyonik asit besiyerine eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri besin dağıtım aparatı aracılığı ile tüplere veya plastik şişelere aktarılıp kapakları sırasıyla steril pamuk veya köpük kapak ile kapatılmıştır. İçinde besiyeri bulunan tüpler veya plastik şişeler oda sıcaklığında bir gece boyunca besiyerinin katılaşması için bekletilmiştir.

Çizelge 3.3 Sinek besiyerinin içeriği

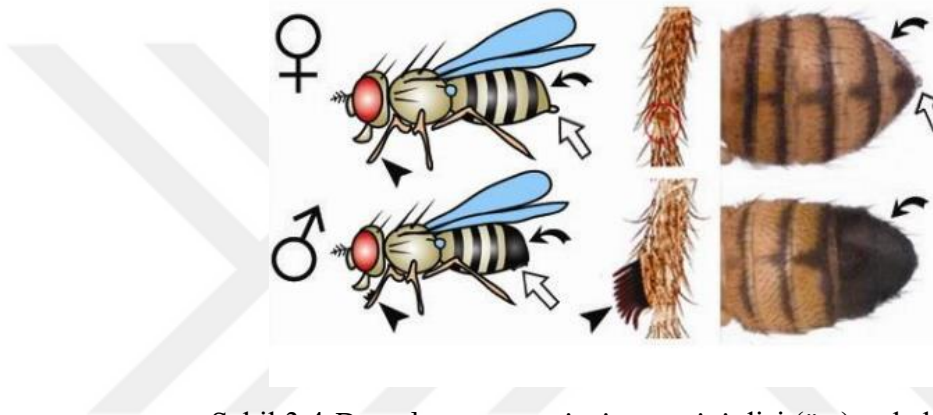
Madde	Miktar
Su	1 L
Agar	10g/L
Mısır unu	75g/L
Beyaz şeker	50g/L
Bira mayası	2 kutu yaş maya (1 kutu yaş maya 25 gr) + 30g/L kuru maya
Şeker kamışı melası	30ml/L
Propiyonik Asit(Fischer)	10ml/Lğ
Nipagin (Methyl 4-hydroxybenzoate)	10ml/L



Şekil 3.3 Sinek besiyerinin hazırlanışı

3.2.3 Sineklerin cinsiyet ayrımının yapılması

Çaprazlama deneylerinde kullanılacak uygun genotipe sahip dişi ve erkek bireyler sinek stoklarından seçilerek çiftleşme için tek bir şişeye aktarıldı. Çaprazlamada kullanılan dişi ve erkek bireylerin toplanması için stereo mikroskop altındaki istasyon düzeneği kullanılarak cinsiyet teşhisi yapılmıştır. Dişi ve erkek bireyler vücut yapılarındaki morfolojik farklılık ile ayırt edilmiştir. Erkek bireylerde abdomenin posteriyor kısmı koyu renklidir ve ön bacaklarda tarak benzeri yapılar bulunmaktadır (Şekil 3.2.3).



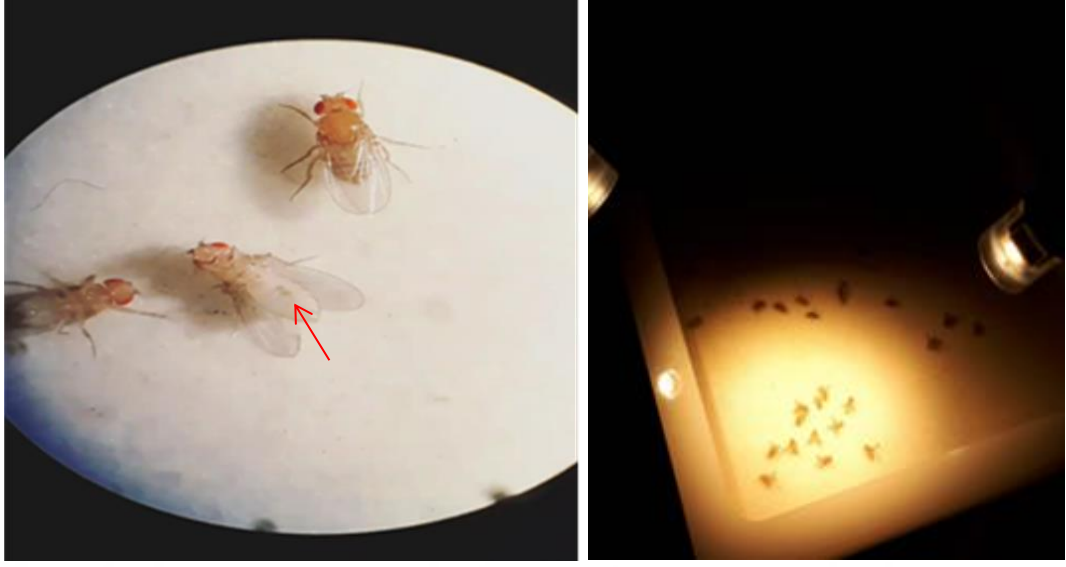
Şekil 3.4 *D. melanogaster* cinsiyet tayini dişi (üst), erkek (alt)

Cinsiyet teşhisi yapabilmek için sinekleri kontrol etmeden önce sineklerin uçup kaçmaması ve daha kolay incelenebilmeleri için anestezi işlemi uygulanmıştır. Bu anestezinin gerçekleştirilebilmesi için kontrol edilecek sinekler mikroskop numune plakasına yerleştirilen, CO₂ dağıtan gözenekli pedlerin üzerine aktarılarak hareketsiz kalmaları sağlanmıştır (Şekil 3.3). Böylece erkek sinekler ve bakire dişi sinekler teşhis edilmiştir ve deneylerde kullanılmak üzere toplanarak taze besiyeri içeren tüplere aktarılmıştır. Kullanılmayan sinekler içerisinde etanol bulunan ve morg olarak adlandırılan şişeye atılmıştır.



Şekil 3.5 *D. melanogaster* çalışma istasyonu ve anestezi pedi

Toplanan dişi sinekler, daha önce çiftleşmemiş, cinsel olgunluğa erişmemiş bakire dişi sineklerden seçilmiştir. Bu dişi sinekler 10 saat boyunca bakire olarak kaldıkları için her sabah rutin olarak laboratuvarında bakire sineklerin toplanması gerçekleştirilmiştir. Bunun için bakire dişi sineğe dönüşecek olan pupaların bulunduğu stok şişeleri gece boyunca düşük sıcaklıklarda (ideal olarak 18°C'nin altında) tutulmuştur. Bakire sinekleri teşhis edebilmek için anatomik yapıları nazik bir şekilde ince suluboya fırçası aracılığı ile mikroskopta incelenmiştir. Vücut renkleri soluk olan ve abdominal bölgelerinde mekonyum olarak adlandırılan koyu bir leke tespit edilen ortalama 10 adet bakire dişi sinek seçilerek yeni besiyeri içeren tüpe aktarılmıştır (Şekil 3.4). Bakire dişi sinekler çaprazlamada kullanılmadan önce daha önce çiftleşmediklerinin teyit edilmesi için tüplerde 3 gün boyunca bekletilmiştir. Beklemeden sonra larva gözlenmeyen tüplerdeki bakire dişi sinekler deneyler için kullanılmıştır.



Şekil 3.6 a) Bakire dişi sineklerdeki mekonyum yapısı b) bakire sineklerin toplanması

3.2.4 Sinek kültürü

Sinek kültürü için, içerisinde yaklaşık 10 ml besiyeri bulunan plastik şişelerde (2.5 cm genişliğinde ve 9.5 cm uzunluğunda) *D. melanogaster* stokları muhafaza edilmiştir. Sinek stokları 15 günde bir yeni besiyerlerine aktarılarak tüplerdeki kalabalık ve bakteriyel kontaminasyon engellenerek sinek stoklarının devamlılığı sağlanmıştır. Rutin günlük kontroller yapılarak besiyerlerinin durumu ve sinekler düzenli olarak kontrol edilmiştir. Kontrol ve uygulama gruplarının oluşturulması için sinek stoklarından kullanılan sinek hatları seçilmiştir. Uygulama grupları için bir çaprazlama şeması tasarlanmıştır. Deneyler için teşhis edilerek toplanan erkek ve bakire dişi sinekler çiftleşmeleri için çaprazlanma şişelerine aktararak kontrollü nem ortamı sağlayan inkübatörde 25 °C’ de muhafaza edilmiştir. Çiftleşme için bakire dişilerin erkeklerle oranı 3/1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Çaprazlanan atasalların bulunduğu plastik şişeler her 3 günde bir değiştirilerek besiyerinin üzerine bırakılan yumurtalar kontrol edilmiştir. Atasalların bıraktığı yumurtalar 25 °C sıcaklıkta 10 günlük yaşam döngülerini tamamlamıştır. Gerekli olduğu durumlarda 18 °C’ de saklanarak yaşam döngüleri 20 güne kadar uzatılabilmektedir. Bırakılan yumurtadan gelişen bakire dişi ve erkek soylar toplanarak istenilen özellikte soyların elde edilmesi için ikinci çaprazlamada kullanılmak üzere diğer hatlarla tekrar çaprazlanmıştır. Bazı deney grupları için ikinci çaprazlama yapılmamıştır. Bu çaprazlar

sonucunda istenilen genotipe sahip soylardan elde edilen larvalar üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kontrol grubu için çaprazlama kurulmamış olup doğrudan PO206-GAL4 stoğundaki atasallardan elde edilen larvalar kullanılmıştır.

3.2.5 Çaprazlama ile deney gruplarının oluşturulması

Çaprazlama sonucunda istenilen dokuda hedeflenen genetik ifadesinin gerçekleştirilebilmesi için GAL4-UAS ikili sistemi kullanılmıştır.

➤ *PO206-GAL4 grubu*

Protorasik doku PO206 olarak tanımlanmıştır ve protorasik dokuda normal CG7839 gen ifadesine sahip olan PO206-GAL4 kodlu sinek hattı deneylerde kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu kontrol grubunu oluşturmak için PO206-GAL4 stoğundaki atasallardan elde edilen larvalar kullanılmıştır. Böylece $\frac{+}{+}; \frac{PO206-GAL4}{PO206-GAL4}; \frac{+}{+}$ genotipine sahip larvalar elde edilmiştir.

➤ *PO206-GAL4; UAS-Ni grubu*

Protorasik dokuda CG7839 gen ifadesi baskılanmış model elde edebilmek için protorasik dokuya özgü transkripsiyon aktivatörü olan PO206-GAL4 sürücü hattı ve CG7839^{RNAi} gen ifadesini düzenleyen UAS-CG7839^{RNAi} cevap hattı taşıyan sinekler çaprazlanmıştır. Bu çaprazlama sonucunda $\frac{+}{+}; \frac{PO206-GAL4}{+}; \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{+}$ genotipine sahip larvalar elde edilmiştir.

➤ *Hml-RFP/P0206-Gal4 grubu*

Hemosit ifadesine yönelik kontrol grubu oluşturulması amacı ile Hml-RFP/CyO (HmlΔ-DsRed) transgenik genotipindeki erkek sinekler ile PO206-GAL4 genotipindeki bakire dişi sinekler çaprazlanmıştır. Böylece $\frac{+}{+}; \frac{PO206-GAL4}{Hml-RFP}; \frac{+}{+}$ genotipine sahip larvalar elde edilmiştir.

➤ *Hml-RFP/P0206-Gal4; UAS-Ni grubu*

P0206-Gal4; UAS-Ni sinek soylarında hemosit ifadesinin oluşturulması amacı ile Hml-RFP/CyO (HmlΔ-DsRed) transgenik genotipindeki dişi sinekler ile UAS-CG7839^{RNAi}

genotipine sahip erkek çaprazlanmıştır. Bu çaprazlamadan elde edilen $\frac{+}{+}; \frac{Hml-RFP}{Cyo}$; $\frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{+}$ genotipine sahip erkekler ile PO206-GAL4 genotipindeki bakire dişi sinekler çaprazlanmıştır. Bu ikinci çaprazlama sonucunda $\frac{+}{+}; \frac{PO206-GAL4}{Hml-RFP}; \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{+}$ genotipine sahip larvalar elde edilmiştir.

3.2.6 Rekombinant ve mutant sinek hatlarının oluşturulması

P0206>CG7839^{RNAi} genetik altyapısına sahip olan mutant sinek hatlarının analiz edilebilmesi için öncelikle ikinci kromozomda P0206-Gal4 ve Hml-RFP genlerini birlikte taşıyan rekombinant sinek hattı oluşturulmuştur. Bu rekombinant sinek hatları ile öncelikli olarak $\frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{UAS-CG7839^{RNAi}}$ hatları çaprazlanarak RFP ile işaretlenmiş, yaşam döngülerinin 6. gününde pupa dönemine girmeyen obez larvalar tespit edilmiştir. Sonrasında elde edilen rekombinant hatlar ile mutant hatlar arasında ters çaprazlama gerçekleştirilmiştir. Bu çaprazlama deneyleri, mutant sinek hatlarındaki fagositik hücre (makrofaj) sayımını gerçekleştirmek için kurulmuştur.

➤ *egr¹/Hml-RFP/PO206-GAL4;UAS-Ni* grubu

TNF-α ile hemosit infiltrasyonunu arasındaki ilişkiyi gösterebilmek amacı ile TNF-α'nın *D. melanogaster* ortolog geni olarak tanımlanan *eiger* (*egr¹*) mutasyonu taşıyan hemosit ifadesine sahip P0206-Gal4; UAS-Ni sinek hatları elde edilmiştir. Bu hatları elde etmek için oluşturulan rekombinant hat ve *egr¹;UAS-Ni* sinekler çaprazlanmıştır. Böylece $\frac{+}{+}; \frac{PO206-GAL4, Hml-RFP}{egr1}; \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{+}$ genotipine sahip larvalar elde edilmiştir.

➤ *egr^{1AG}/Hml-RFP/PO206-GAL4;UAS-Ni* grubu

TNF-α ile hemosit infiltrasyonunu arasındaki ilişkiyi gösterebilmek amacı ile TNF-α'nın *D. melanogaster* ortolog geni olarak tanımlanan *eiger^{1AG}* (*egr^{1AG}*) mutasyonu taşıyan hemosit ifadesine sahip P0206-Gal4; UAS-Ni sinek hatları elde edilmiştir. Bu hatları elde etmek için oluşturulan rekombinant hat kullanılarak ve *egr^{1AG};UAS-Ni* sinekler

çaprazlanmıştır. Böylece $\frac{+}{+}; \frac{PO206-GAL4, Hml-RFP}{egr1AG}; \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{+}$ genotipine sahip larvalar elde edilmiştir.

➤ *grnd*^{+/+}/*Hml-RFP/PO206-GAL4; UAS-Ni*

TNF- α sinyal yolağı ile hemosit infiltrasyonunu arasındaki ilişkiyi gösterebilmek için transmembran proteini kodlayan bir gen olan tümör nekroz faktörü reseptörü ile homolog olan *grnd* mutasyonu taşıyan ve hemosit ifadesine sahip *PO206-Gal4; UAS-Ni* sinek hatları elde edilmiştir. Bu hatları elde etmek için oluşturulan rekombinant hat kullanılarak ve *grnd*^{+/+};UAS-Ni sinekler çaprazlanmıştır. Böylece $\frac{+}{+}; \frac{PO206-GAL4, Hml-RFP}{grnd-/+}; \frac{UAS-CG7839^{RNAi}}{+}$ genotipine sahip larvalar elde edilmiştir.

3.3 *Drosophila* Larval Boyut ve Ağırlık Analizi

Belirtilen günlerdeki *PO206-GAL4* (5. gün), *PO206-GAL4; UAS-Ni* (5. gün ve 12. gün) genotipe sahip grupların her birinden 20 adet larva analitik terazi ile tartılmıştır. Bu 3 farklı gruptan alınan larva örnekleri fotoğraflanmıştır.

3.4 *Drosophila* Larval Fat Body Analizi

Fat body kesitleri TCS-SP5 Leica model konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir. Fat body hücrelerinin boyut analizi ve adiposit hemositlerinin kantitatif analizi ImageJ yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 *Drosophila* larval fat body diseksiyonu ve floresan boyama teknikleri

Deney gruplarından *PO206-GAL4*, *PO206-GAL4; UAS-Ni* genotipine sahip larvalar kültür ortamlarından alınarak fat body diseksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu deney gruplarındaki larvalar özellikle üçüncü instar larval (L3) dönemin sonuna tekabül eden yaşam döngülerinin 5. gününde disekte edilmiştir. Ayrıca *PO206-GAL4; UAS-Ni* deney grubundaki larvaların yaşam döngülerinin 12. gününde de fat body diseksiyonları

gerçekleştirilmiştir. Her bir deney grubunun belirtilen günlerdeki fat body diseksiyonu için 20 adet larva kullanılmıştır. Diseksiyon yöntemi ve sonrasında disekte edilen fat body dokularına uygulanan floresan boyama tekniği için aşağıda belirtilen işlemler sırası ile takip edilmiştir.

1. Deneyde kullanılan larvaların bulunduğu kültür ortamına bir miktar su eklenerek larvaların cam petrilere aktarılması sağlanmıştır.
2. Her deney grubu için diseksiyon amacı ile 20 adet larva toplanmıştır.
3. Toplanan larvalar buzun üzerine yerleştirilmiş pH 7.4 olan PBS çözeltisi içeren plakaya alınmıştır ve plaka stereo mikroskop altına diseksiyon işlemi için yerleştirilmiştir.
4. Laval fat body diseksiyonu için öncelikle forsepsler ile larvanın en sonundaki posterior kısmı çekilerek kopartılmıştır. Sonrasında ağız bölgesi forseps ile sabitlenirken diğer forseps ile larvanın kutikula kısmı ters yüz edilerek sıyırılmıştır. Larvanın fat body organı zarar görmeden diğer kısımlardan ayrılıp alınarak diseksiyon tamamlanmıştır. Bu şekilde her deney grubundan 20 adet larval fat body hızlı bir şekilde disekte edilmiştir.
5. Disekte edilen fat body kısımları % 4 PFA solüsyonu içeren Eppendorf tüpüne aktarılmıştır ve rotator cihazına yerleştirilerek +4 °C ve karanlıkta 20 dakika fikse edilmiştir.
6. Fat body dokuları PBS çözeltisi ile 5 dakika boyunca yıkanmıştır ve bu yıkama 3 kez tekrarlanmıştır.
7. Dokular % 0,2 Triton X-100 PBS çözeltisi ile muamele edilmiştir ve sonrasında PBS ile yıkanmıştır. Bu işlem bir sonraki adımda uygulanan floresans boyaların etkinliğini artırmak için gerçekleştirilmiştir.
8. Disekte edilen fat body dokusunu görüntüleyebilmek için adiposit hücre membranları 1:100 Alexa Fluor 488 Phalloidin ve nükleusları final konsatrasyonu 1 µg/mL olan Hoechst 33258 ile boyanmıştır.
9. Adiposit hücrelerinin lipid içeriğinin görüntülenebilmesi için fat body dokuları 0.01mM Nil Kırmızısı Solüsyonu ile 30 dk boyunca inkübe edilmiştir.
10. Fat body dokuları DABCO-Mowiol kapatma solüsyonu kullanılarak lamlara yerleştirilmiştir ve lamelin kenarları tırnak cilası ile sabitlenmiştir.

11. Fat body kesitlerinden fat body hücreleri ve lipid içerikleri konfokal mikroskop aracılığı ile görüntülenmiştir ve immünohistokimyasal boyamaların görüntüleri ImageJ yazılımı kullanılarak kantitatif analiz ile fat body hücrelerinin boyutları hesaplanmıştır.

3.4.2 Larval fat body hemositlerin kantitatif analizi

Deney gruplarından *Hml-RFP/P0206-Gal4*, *Hml-RFP/P0206-Gal4; UAS-Ni* genotipine sahip larvalar kültür ortamlarından alınarak fat body diseksiyonları gerçekleştirilmiştir. Diseksiyonlar *Hml-RFP/P0206-Gal4* genotipine sahip larvaların yaşam döngülerinin 5. gününde, *Hml-RFP/P0206-Gal4; UAS-Ni* genotipine sahip larvaların yaşam döngülerinin 5. gününde ve 12. gününde yapılmıştır. Her bir deney grubunun belirtilen günlerdeki fat body diseksiyonu için 20 adet larva kullanılmıştır. Disekte edilen larval fat body hücrelerinin nükleusları DAPI ile boyanmıştır. Konfokal mikroskop aracılığı ile *in vivo* olarak işaretlenen plazmatositler görüntülenmiştir ve ImageJ yazılımı kullanılarak işaretli plazmatositlerin kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir.

Larval fat body hemosit analizi için oluşturulan deney gruplarındaki sinek soylarında hemosit hücre popülasyonunun %95'inden fazlasını oluşturan plazmatositlerin *in vivo* olarak işaretlenebilmesini sağlayan *Hml-RFP* transgeni kullanılmıştır (Makhijani vd. 2011). Buna göre hemositlere özgü olarak ifade edilen bir protein olan hemolektinin promotör bölgesi ile *RFP* geni birleştiğinde hemositlerin varlığında kırmızı floresan ışımlar oluşarak *Drosophila* makrofajı olarak bilinen plazmatositler işaretlenmiştir.

3.4.3 Larval fat body hemosit infiltrasyon analizi

Deney gruplarından *PO206-GAL4; UAS-Ni* genotipine sahip olan larvaların yaşam döngülerinin 12. gününde fat body diseksiyonu gerçekleştirilmiştir. Fat body dokuları % 4 PFA ile 40 dakika fikse edildikten sonra, % 0,3' lük Triton X-100 PBS çözeltisinde +4 °C 20 dk boyunca permeabilizasyonu sağlanmıştır. Sonrasında fat body dokuları %0.04 Tween içeren PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Fat body dokuları yıkama işleminden sonra

Vectashield solüsyonu içerisinde bulunan DAPI ile birlikte lama yerleştirilerek kapatılmıştır ve Leica-TCSSP5 konfokal mikroskop kullanılarak floresan görüntüler elde edilmiştir.

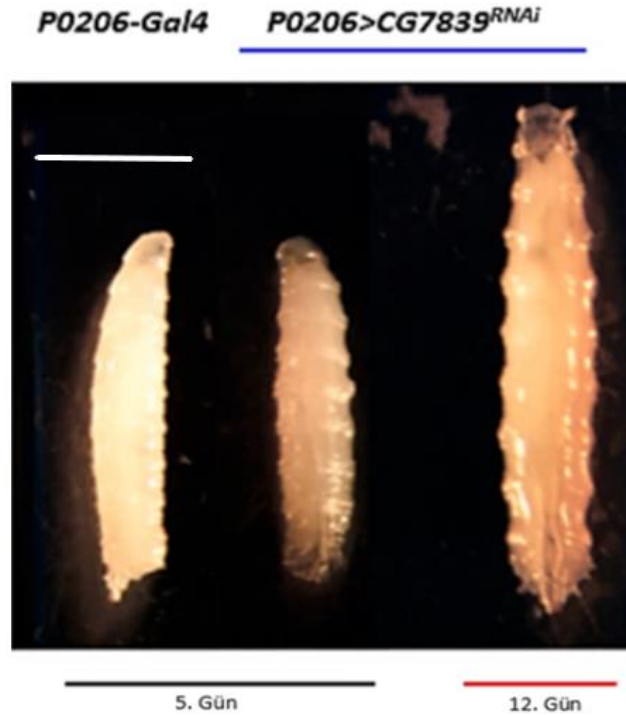
3.5 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmelerde GraphPad Prism programı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, tekrarlanan en az üç deneyin ortalama $\pm$ standart sapması şeklinde ifade edilmiştir. Deney grupları arasındaki karşılaştırmaların istatistiksel anlamlılık düzeyi çift kuyruklu Student-t testine göre değerlendirilmiştir ve farklılıklar p değeri 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***) ve 0.0001' den (****) küçük olduğu düzeyde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

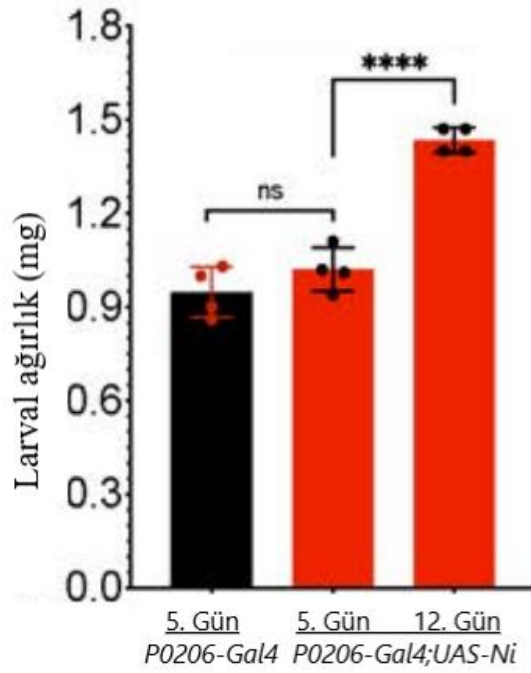
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Drosophila* Larval Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Protorasik dokuda CG7839^{RNAi} (Ni) ifadesinin *PO206-GAL4*; *UAS-Ni* larva modelinde ecdison hormonunu önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu larva modeli, erişkinliğe ulaşabilmek için gerekli olan ecdison pikini oluşturamayarak, üçüncül instar larval dönemde kalmıştır. Böylece metamorfoz ile puparasyona geçiş engellenerek, hayvanın sürekli beslendiği larval dönemde kalması ile fat body dokusunda yağ ve şeker depo ederek büyümeye devam edeceği beklenmiştir. *PO206-Gal4*; *UAS-Ni* larva modelinde yaşam döngülerinin 12. gününde pupa dönemine girmeyerek sürekli beslendikleri üçüncül larval dönemde kaldıkları kontrol grubuna kıyasla büyümeye devam ettikleri Şekil 4.1’ de ve bu larvalarda meydana gelen ağırlık artışı Şekil 4.2’ de gösterilmiştir. *PO206-GAL4*; *UAS-Ni* larva modelinin üçüncül larval dönemlerinin üç haftaya kadar uzadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1 *P0206-Gal4* (5. gün), *P0206-Gal4*; *UAS-Ni* (5. ve 12. gün) larva boyutları, ölçek çubuğu 1mm uzunluğundadır

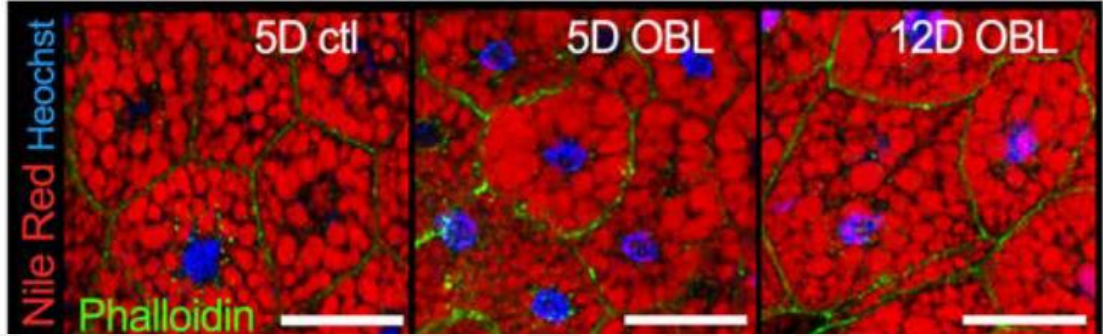


Şekil 4.2 *P0206-Gal4* (5. gün) ve *P0206-Gal4;UAS-Ni* (5. ve 12. gün) larval ağırlıkları

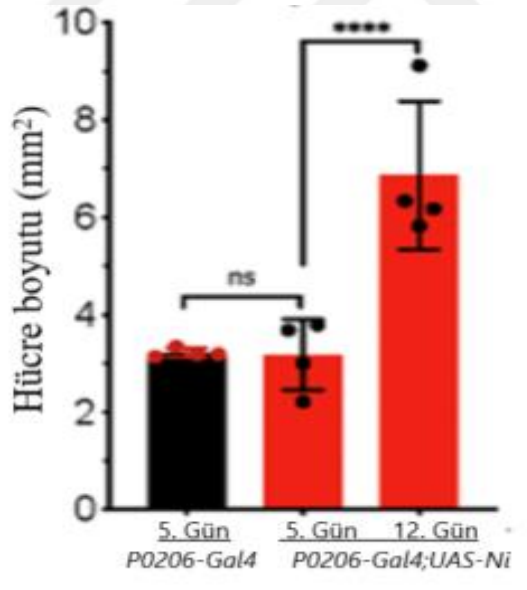
4.2 *Drosophila* Larval Fat Body Histopatolojik Değerlendirilmesi

Adipoz doku, memelilerde lipogenez ile yağların sentezlendiği lipid deposu olarak ve enerji ihtiyacı halinde depolanmış lipidlerin lipoliz ile mobilizasyonu için evrimleşmiş bir dokudur. *Drosophila* fat body adipoz dokuya eşdeğer bir doku olduğu için ecdison hormonunun inhibe edilerek obez fenotipe sahip larvaların elde edilmesinden sonra obezite ile birlikte fat body dokusunda meydana gelmesi beklenen süreçler araştırılmıştır (Musselman ve Kuhnlein 2018). *P0206-Gal4* ve *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modellerinin yaşam döngülerinin 5. gününde, *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinin ayrıca yaşam döngüsünün 12. gününde fat body dokusu floresan boyalar kullanılarak incelenmiştir. Öncelikle fat body hücrelerini kaplayan lipid damlacıklarındaki yağ Nil Kırmızısı boyası ile boyanarak görüntülenmiştir. Yaşam döngülerinin 12. gününde olan *P0206-Gal4;UAS-Ni* obez fenotipe sahip larvaların fat body dokusunda, yaşam döngülerinin 5. gününde olan *P0206-Gal4;UAS-Ni* ve *P0206-GAL4* larvalara kıyasla fat body hücrelerinin lipid damlacıklarının boyutunda artış olduğu ve hipertrofik adipoz doku profili sergilediği floresan boyama tekniği ile gösterilmiştir (Şekil 4.3). Bunu doğrulamak için gerçekleştirilen hücre boyut ölçümleri sonucunda yaşam döngülerinin 12. gününde olan

P0206-Gal4;UAS-Ni larval fat body hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla 2 kat artış olduğu ortaya koyulmuştur (Şekil 4.4). Bu bulgular fat body dokusunda artan lipid birikimi ile birlikte genişleyen hücrelerin dokuda hipertrofi meydana getirdiğini göstermiştir.



Şekil 4.3 Fat body hücreleri ve hücrelerin lipid damlacıkları içeriği (40×). Ölçek çubuğu 50 µm uzunluğundadır



Şekil 4.4 Fat body histolojik hücre boyut analizi

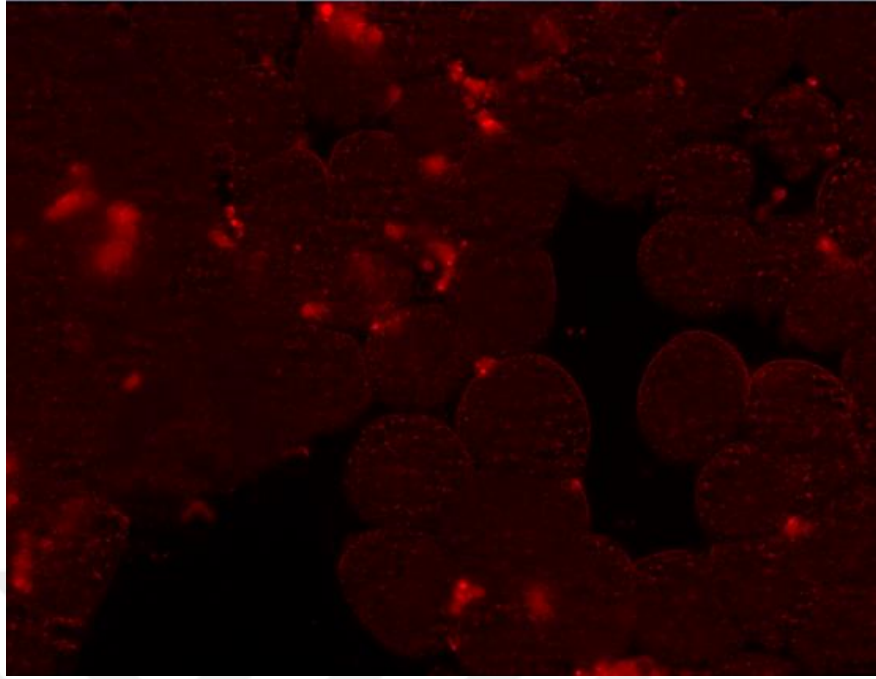
4.3 *Drosophila* Fat Body Hemositlerinin Kantitatif Analizi

İnsanlarda obezite ile birlikte görülen adipoz doku hipertrofisi sonucunda adipositler fonksiyonlarını kaybeder ve adipoz dokuda metabolik hasara neden olan bazı değişiklikler meydana gelir. Bunların en önemlisi adipoz doku makrofaj (ADM)

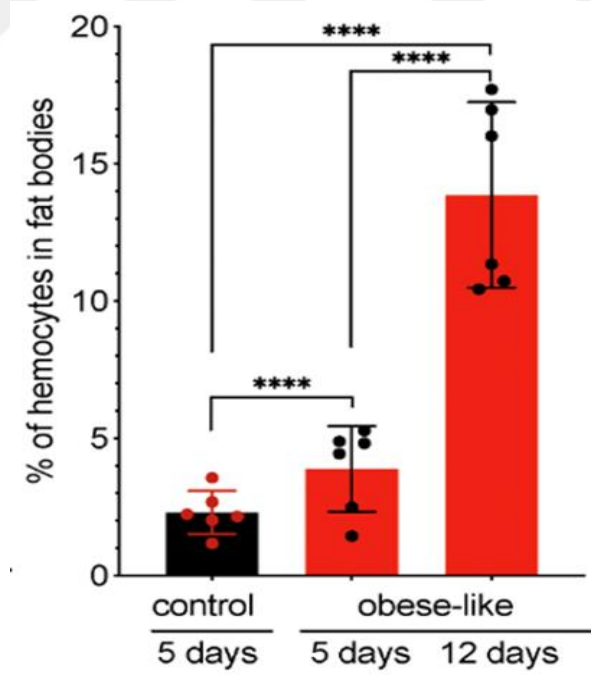
infiltrasyonu olarak bilinen makrofajların adipoz dokuya göç ederek birikmesidir. *Drosophila P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinin yaşamlarının 12. gününde fat body hipertrofisi olduğunun belirlenmesinden sonra fat body dokusunda immün hücre infiltrasyon sürecinin meydana gelip gelmediği araştırılmıştır.

Kontrol grubu ve obez larvalarda infiltrasyonu test edebilmek için plazmatositlerin *in vivo* olarak işaretlenmesine izin veren *Hml-RFP/P0206-Gal4* ve *Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni* yaşam döngülerinin 5. gününde, *Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinin ayrıca yaşam döngüsünün 12. gününde elde edilen fat body kesitleri görüntülenmiştir. Her bir kesit için kırmızı noktasal floresan ışımaların olduğu bölgeler (Şekil 4.5) tespit edilerek hemositlerin miktarı hesaplandığında yaşam döngülerinin 5. gününde olan *Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinde, *Hml-RFP/P0206-Gal4* kontrol grubu ile kıyaslandığında hemosit miktarı daha yüksek bulunarak infiltrasyonunun başladığı görülmüştür (5.2%, $p<0.05$). Ayrıca yaşamlarının 12. gününde olan *Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinde hemosit infiltrasyonunda önemli ölçüde artış olduğu gösterilmiştir (17%, $p<0.00001$) (Şekil 4.6).

İnsanda obezitede adipoz doku hipertrofisi sonucunda meydana gelen ve patolojik obezitenin en önemli hücresel süreçlerinden biri olan makrofaj infiltrasyonunun, *Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinde fat body hemosit infiltrasyonunu şeklinde tezahür ettiği bu bulgular ile birlikte gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni larva modelinin yaşamlarının 12. gününde fat body hemositlerinin immüno Floresan analizi (10×)

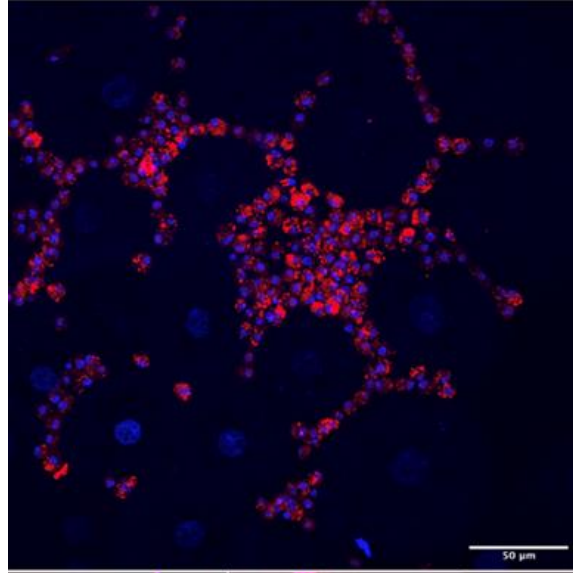


Şekil 4.6 Fat body dokusunda bulunan hemositlerin oranları

4.4 İmmunohistokimya Bulguları

Obezitenin ilerlemesi ile adipositlerin boyutu kritik eşik değerinin üzerine çıktığında adipoz dokunun yapısının bozulması ile adiposit ölümü meydana gelir. Makrofajlar ölü ve hasarlı adipositlerin etrafını sararak taç benzeri yapılar (CLS) meydana getirir. Hemosit infiltrasyonunun önemli ölçüde artış gösterdiği *P0206-Gal4;UAS-Ni* (yaşamlarının 12. gününde) larva modelinde fat body dokularından alınan örneklerde CLS yapılarının oluşumuna yönelik analiz yapılmıştır *P0206-Gal4;UAS-Ni* (12. gün) larva modelinin fat body dokusundaki hücreleri çevreleyen hemosit kümelerinin olduğu ve bunların taç benzeri yapılar meydana getirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

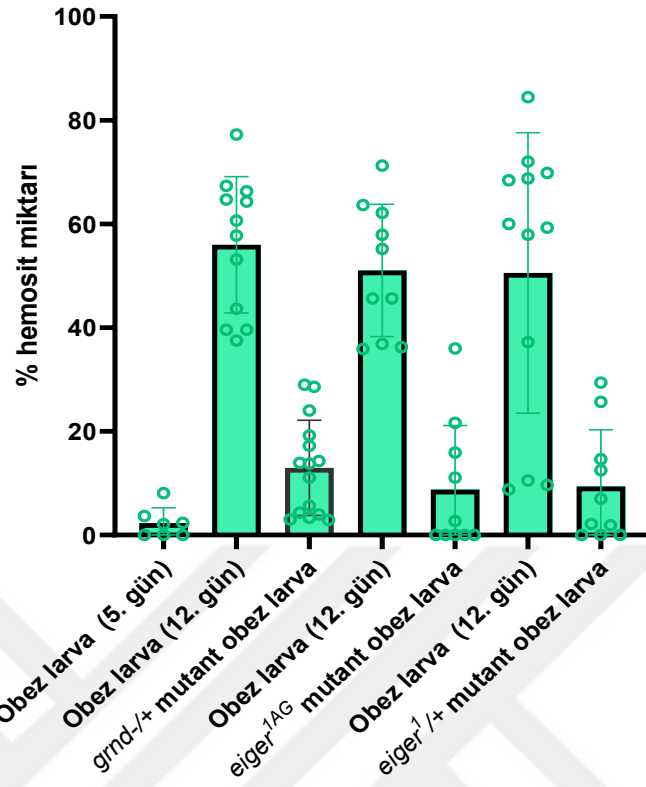
İnsanlarda görülen ileri derece obezite ve obezite ile ilişkili hastalıkların oluşmasından sorumlu olan düşük dereceli kronik enflamasyonun en önemli karakteristik özelliği olan CLS yapıları, çalışmamızda kullandığımız *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinin fat body dokusunda insanlarda olduğu gibi aynı şekilde görüntülenmiştir. Bu bulgular *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinde obezite ile indüklenen kronik enflamasyonun varlığını ortaya koymuştur.



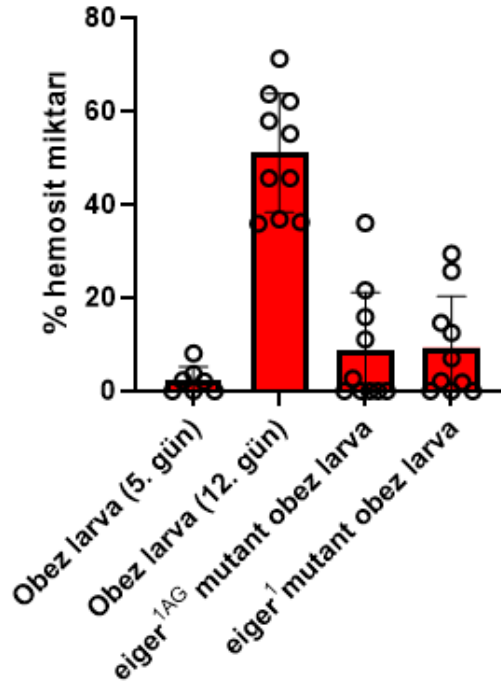
Şekil 4.7 *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinde fat body dokusunda Hoechst boyama ile nükleusların ve Hml-Ds-RFP ile etiketlenmiş hemositlerin konfokal görüntüleri (20×)

4.5 TNF- α /eiger sinyali ile hemosit arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

İnsanlarda obezite ile birlikte adiposit homeostazisinin bozulması sonucunda adipoz dokuda artan proenflamatuar sitokinler ve adiposit ölümü, adipoz dokuda makrofaj birikimine neden olduğu bilinmektedir. Omurgalılarda, adipoz dokuda ve özellikle makrofajlarda yüksek seviyelerde ifade edilen TNF, adipoz doku makrofaj infiltrasyonunda ve buna bağlı gelişen kronik enflamasyonda merkezi rol oynamaktadır. *D. melanogaster* organizmasında TNF- α sinyalinin fat body dokusunda hemosit birikimi ile ilişkisini incelemek ve P0206-GAL4;UAS-Ni modelini daha iyi karakterize etmek amacı ile TNF sinyalini baskılamaya yönelik *Drosophila* TNF- α molekülünün homologu olan *egr¹* mutant sinek hattı, *egr^{1AG}* mutant sinek hattı ve *Drosophila* TNF reseptörü olan *grindelwald* mutantına sahip sinek hattı kullanılmıştır. Bu deneylerden elde edilen sonuçlar, TNF sinyaline yönelik kullanılan *egr¹*, *egr^{1AG}* ve *grindelwald* mutant sinek hatlarında fat body hemosit miktarının dramatik bir şekilde azaldığını göstermiştir (Şekil 4.8). Kodra ve arkadaşları, *egr¹* mutasyonuna sahip olan sinek hattında ek olarak hemositlerde NimrodC1 fagositoz reseptörü mutasyonu bulunduğu bildirmiştir ve bu nedenle *egr¹* mutantı kullanılarak elde edilen araştırma sonuçlarının yeniden değerlendirilmesini önermiştir (Kodra vd. 2020). Bu doğrultuda deneylerimizde kullandığımız *egr¹* ve NimrodC1 mutasyonu taşımayan *egr^{1AG}* mutantlarının fat body dokusunda hemosit miktarlarının aynı seviyelerde azaldığı ve benzer etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (Şekil 4.9). Bu elde ettiğimiz sonuçlar, *egr¹* mutantlarında bulunmayan NimrodC1 reseptörünün bizim odaklandığımız çalışma üzerinde işlevsel bir etkinliğe sahip olmadığını göstermesi bakımından oldukça önemlidir.



Şekil 4.8 Fat body hücrelerinde TNF/eiger sinyalinin hemosit birikimi ile ilişkisi



Şekil 4.9 *egr*¹ ve *egr*^{1AG} mutasyonlarının hemosit infiltrasyonu üzerindeki etkisi

Çizelge 4.1 Kontrol grupları arasında hemosit migrasyonunun karşılaştırılması

Genotip		Genotip	p değeri
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (5. gün)	ve	<i>Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (12. gün)	****
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (5. gün)	ve	<i>egr^l/Hml-RFP/P0206-GAL4;UAS-Ni</i> (12. gün)	ns
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (5. gün)	ve	<i>egr^{1AG}/Hml-RFP/P0206-GAL4;UAS-Ni</i> (12. gün)	ns
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (5. gün)	ve	<i>grnd^{+/+}/Hml-RFP/P0206-GAL4;UAS-Ni</i> (12. gün)	**
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (12. gün)	ve	<i>egr^l/Hml-RFP/P0206-GAL4;UAS-Ni</i> (12. gün)	***
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (12. gün)	ve	<i>egr^{1AG}/Hml-RFP/P0206-GAL4;UAS-Ni</i> (12. gün)	****
<i>Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni</i> (12. gün)	ve	<i>grnd^{+/+}/Hml-RFP/P0206-GAL4;UAS-Ni</i> (12. Gün)	****

Toplanan verilerde *Hml-RFP/P0206-Gal4* (5. gün) larvalarında hemosit miktarının obez *Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni* (5. gün) larva modelinde de benzer şekilde toplam hücrelerin yaklaşık % 1' ini oluşturmaktadır. Buna karşın obez *Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni* (12. gün) larvalarında % 51 civarında artan hemosit miktarı, TNF/eiger sinyal yolağı ile ilişkili olan mutasyonlar aracılığı ile önemli ölçüde baskılanmıştır. Sonuç olarak verilerimiz, TNF sinyal yolağının makrofaj infiltrasyon mekanizmasından sorumlu olduğunu ve insanlarda obez adipoz dokuda meydana gelen benzer bir mekanizma ile *Drosophila*' da hemositlerin fat body hücrelerine toplandığı göstermiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya Obezite Federasyonu tarafından kronik, tekrarlayan, ilerleyen bir hastalık olarak tanımlanan obezite dünya genelinde pandemik sınırlara ulaşmıştır. Obezite; başta tip 2 diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar, hipertansiyon, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması, metabolik sendrom, Alzheimer, bazı kanser türleri, eklem rahatsızlıkları ve osteoartrit gibi hastalıkların tetiklenmesinde risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte dünya genelinde ölüm oranlarını artıran, yaşam süresini ortalama 20 yıl kadar kısaltan, hayat kalitesini düşüren ve sakatlıklara neden olan bir sağlık yükü olarak bireyleri ve toplumları tehdit etmektedir. Ayrıca işsizlik, sosyal dezavantajlar ve düşük sosyo-ekonomik üretkenlik gibi nedenlerle küresel ekonomiyi zarara uğratması obezitenin diğer önemli sonuçlarından biridir (Hruby vd. 2016, Bluher 2019).

Toplumların sanayileşmesi ile birlikte enerji içeriği yüksek gıdalara kolay ulaşım ve sedanter yaşam tarzı nedeniyle obezite prevalansı sürekli artmaktadır. Ayrıca besinlerin ambalajlarından gelen, örneğin su damacanelerinde kullanılan bisfenol ve perfloroalkil gibi kimyasalların da lipid metabolizmasını bozarak obeziteye neden olduğu bilinmektedir (Wen vd. 2022). Obezitede çevresel faktörlerin ve genetik yatkınlığın kompleks etkileşimleri sonucunda vücutta artan enerji yükü nedeni ile ağırlık artışı meydana gelmektedir. WHO tarafından “sağlık için risk oluşturan anormal veya aşırı yağ birikimi” olarak tanımlanan obezitede bireysel riskler bakımından büyük bir varyasyon olduğu ve bu hastalığın tek başına toplam adipoz doku kütlesi ile açıklanamayacağı ile ilgili yaygın görüşler bulunmaktadır (Bluher 2019, WHO 2021). Aşırı kaloringin depolandığı bölgenin değerlendirilmesinin, metabolik riskler bakımından daha geçerli bir belirleyici olduğu düşünülmektedir (Frank vd. 2019). Patolojik obezite, fazla enerjinin lipotoksisite ile ilişkili olan yağ birikimi sonucunda meydana gelmektedir. Abdominal adipoz dokuda özellikle visseral bölgede yağ birikiminin oluşması kardiyovasküler ve metabolik hastalıklar bakımından oldukça yüksek bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Vücut kompozisyonunun değerlendirilmesinde, obezite ile ilişkili meydana gelebilecek risklerin önlenmesi bakımından BKİ, bel çevresi ölçümü ve manyetik rezonans görüntüleme tekniklerinin birlikte kullanılması önerilmektedir (Goossens 2017). Bununla birlikte obezitenin altında yatan biyolojik mekanizmaları ve

patofizyolojik süreçleri yansıtılmasında biyobelirteçleri kullanmak daha detaylandırılmış teşhis ve tedavi olanağı sağlama potansiyeli taşımaktadır. Obezitenin eksenini oluşturan insülin sinyali ve düşük dereceli kronik inflamasyon ile ilgili bazı biyobelirteçler (CRP, insülin, C-peptid vs.) tanımlanmış olsa da klinik uygulamaların olgunlaşmasına ve daha fazla biyobelirteç araştırmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Nimptsch vd. 2019).

Obezitenin başlangıcında meydana gelen adiposit boyutundaki artış doğru teşhis ve tedavi ile geri döndürülebilen bir durumdur ancak önlem alınmadığı takdirde adiposit boyut artışı ilerleyerek, komorbiditelerinin de eşlik ettiği obezite ile sonuçlanmaktadır (De Lorenzo vd. 2020). Obeziteye yönelik tedavilerde yaşam tarzı değişiklikleri, farmakoterapi ve bariyatrik cerrahi yaklaşımları uygulanmaktadır. Yaşam tarzı değişiklikleri oldukça etkili sonuç vermesine rağmen kilo vermeye yönelik uygulanan yaklaşımların sürdürülebilirliğini sağlamanın zor olabileceği bildirilmektedir (Nam vd. 2015). Bireylerin genetik yatkınlıklar ile birlikte küresel olarak sürekli obezogenik çevreye maruz kalmaları nedeniyle günümüzde obeziteyi bireysel bir başarısızlık olarak görmek yanlış yaklaşımları da beraberinde getiren bir yanılgı olabilmektedir. Ayrıca obezitenin tedavisinde hedeflenen kilo vermeye yönelik yaklaşımların, daha yüksek bir vücut ağırlığını ve kilo alımını savunan güçlü evrimsel kökenli mekanizmalar karşısında güçsüz kaldığı düşünülmektedir (Blüher 2019, Wen vd. 2022). Günümüzde obezitede kullanılan kilo kaybına yönelik ilaçların önemli yan etkileri, bağımlılık oluşturmaları ve tolerans geliştirmeleri nedeni ile henüz kabul edilen ideal bir ilaç henüz bulunmamaktadır. Bariyatrik cerrahi, gastrik kelepçe gibi müdahaleler ise yaygın kullanımı sınırlandırabilen bazı riskler taşımaktadır (Jackson vd 2015). Sonuç olarak, obezite, kontrol edilemeyen aşırı beslenme davranışının neden olduğu estetik bir problemenden öte multifaktöriyel kombinasyonlardan oluşan bir hastalık olarak kabul edilmektedir ve tedavi yaklaşımlarının obezitenin sonuçlarının engellenmesine yönelik olması bu hastalık ile mücadeleyi etkisiz kılmaktadır. Bu nedenle obezitenin nedenleri ile ilişkili moleküler süreçlere odaklanmak, obezite tedavisine yönelik kullanılacak etkili ve güvenilir yaklaşımların yapı taşını oluşturmaktadır.

Tüm dünyada diyabet vakalarının %44' ü, kalp hastalığının %23'ü ve bazı kanserlerin %7-41'i obezite ile ilişkilendirilmektedir. Bu durum adipoz dokunun enerji rezervuarı

olmasının yanında, endokrin ve immün bir organ olarak tüm sistemin doku ve hücre fonksiyonlarını etkileyebilen topluca adipokin olarak adlandırılan sitokinleri, hormonları, peptidleri ve eksozomları salgılamasından kaynaklanmaktadır (Gomez-Hernandez vd. 2016). İlk adiposit türevi sitokin olarak leptinin adipoz dokudan salındığının keşfedilmesinden bu yana adipoz doku metabolik homeostazı düzenleyen merkezi metabolik organ olarak kabul edilmektedir (Zhang vd. 1994). Bu nedenle tüm sistemik metabolizmayı etkileyen ve adipoz doku ile ilişkili en önemli hastalığın obezite olduğu düşünüldüğünde, obeziteye neden olan mekanizmaların detaylandırılmasında adipoz dokuda meydana gelen süreçlere odaklanılmaktadır (Hotamışlıgil 2002).

Sepsis hastalığının infeksiyöz aşamasında insülin direnci ile birlikte görülmesi, immün sistemin metabolizma ile ilişkili olduğunu gösteren ilk işaret olarak kabul edilmektedir (Wictherman vd 1979). Hotamışlıgil ve arkadaşları, obez adipoz dokudan enflamatuar sitokin olan TNF- α molekülünün salındığını, bu molekülün insülin direncinden sorumlu olduğunu ve genetik müdahaleler ile TNF- α molekülünün düzenlenmesi sonucunda insülin direncinin düzeltilebildiğini ilk kez gösterdiklerinden beri obezite ve metabolik hastalıkların araştırılmasında yeni bir çalışma alanına (immünometabolizma) öncülük etmektedirler (Hotamışlıgil vd 1993, Hotamışlıgil vd 1995). Bu çalışmalar obezitenin enflamatuar bir hastalık olduğunu, immün ve metabolik yolların birleşerek hücresel ve sistemik zararlara yol açtığını ilk kez kanıtlan kaynaklar olarak literatürde yer almaktadır.

Adipoz doku sahip olduğu plastisite sayesinde fazla enerjiyi trigliserit olarak depolama yeteneğine sahiptir ancak kronik aşırı beslenmeye karşı sınırlı genişleme kapasitesine sahip olan adiposit boyutları yetersiz kaldığında, adipoz dokuda önemli ölçüde değişiklikler meydana gelmektedir. Farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalar, obezite sürecinde yeniden şekillenen adipoz dokunun hücresel bileşiminin proenflamatuar makrofajlara dönüştüğünü göstermektedir. Bunun sonucunda enfeksiyondan bağımsız olarak metabolik uyarı ile aktive olan steril enflamasyon (metaflamasyon) sadece adipoz dokuya özgü olarak gelişmektedir (Choe vd. 2016, Longo vd. 2019).

Patolojik adipoz dokuda bulunan hasarlı hücrelerden salınan proenflamatuar sitokin ve kemokin gibi sinyaller, enflamatuar özelliğe sahip olan makrofajların adipoz dokuda

çoğalarak birikimine (infiltrasyon) neden olmaktadır (Hotamışlıgil vd. 1995). Kronik enflamasyon ile ilişkilendirilen bu süreçte dirençli bir şekilde aktive olan ve aşırı proenflamatuvar sitokin üreten makrofajlar adipoz dokunun işlevini bozmaktadır (Stuart P. Weisberg vd. 2003, Chavakis vd. 2023). Adipositlerin ve makrofajların parakrin bir şekilde etkileşime girmesi ile adipoz dokudan salınan yüksek TNF- α seviyeleri, temel anabolik yol olan insülin sinyal mekanizmasının bozulmasına ve lipolizin indüklemesine neden olmaktadır (Agrawal vd. 2016). Ayrıca adipoz dokuda artan lipotoksisite ile birlikte ROS seviyelerinin aşırı yükseldiği bilinmektedir. Aşırı ROS artışı, lokal olarak adipoz dokuda makrofaj infiltrasyonunu uyarmasının yanında karaciğer, kas ve kalp gibi diğer dokulara zarar vermektedir, DNA ve protein hasarı oluşturarak kanser riskini artırmaktadır. Tüm bu sinerjik etkiler ile kümülatif bir şekilde uyarılan enflamasyonun kısır bir döngüde kalarak oldukça zararlı bir duruma gelmesi, sadece obezite ile sınırlı kalmayan yaşamsal riskler taşıyan diğer hastalıkların patogenezi oluşturmaktadır (Furukawa vd. 2004, Gregor ve Hotamışlıgil 2011). Makrofajların adipoz dokuda birikimine neden olan mekanizmaların anlaşılmasının, makrofajların aktivitelerini düzenlemek ve metabolik hastalıkların tedavisi için yeni stratejilerin geliştirmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle adipoz doku fonksiyonunun iyileştirilmesi ve kronik enflamasyonun düzenlenmesi amacıyla metabolik sağlığın kilit noktasını oluşturan adipoz doku makrofaj infiltrasyonu veya makrofajlardan salınan faktörler güçlü bir potansiyel hedef olarak görülmektedir. Pubmed sonuçları, bu alan ile ilgili çalışmaların son on yılda ivme kazandığını göstermektedir.

Obezitenin ve metabolik hastalıkların karmaşık süreçlerinin araştırılmasında, tüm sistemi izleme imkanı verebilecek ve fizyolojik ortamı sağlayabilecek basit ve uygun deney sisteminin oluşturulmasında *D. melanogaster* organizması oldukça faydalı bir model olarak kullanılmaktadır (Musselman ve Kuhnlein 2018). *D. melanogaster*, insanda görülen obezite ve metabolik hastalıklarla ilgili olan fonksiyonel analog doku, organ ve sistemlere sahip olup, obezite ve bununla ilişkili komplikasyonları insanlara benzer şekilde geliştirebilmektedirler. İnsanda glukoz metabolizmasını ve yağ mobilizasyonunu kontrol eden hormonlar (insülin/glukagon), biyokimyasal yollar, mitokondriyal enerji yolları, insülin reseptörü *Drosophila* ile homolog olup sekans, yapısal ve fonksiyonel benzerlik göstermektedir (Warr vd. 2018). Ayrıca *D. melanogaster*, bakım maliyetinin

düşük olması, hızlı gelişim dönemleri, yüksek kapasite ile laboratuvarında saklanma kolaylığı, genetik müdahalelerin kolaylıkla uygulanabilirliği ve çeşitlik genetik kaynakları nedeniyle kemirgenler ve memeli modellerine kıyasla avantajlı bir model olarak ilgi çekmektedir. *Drosophila* genomunun analizi, insanda bilinen tüm hastalıklarla ilgili genlerin yaklaşık %75'inin sineklerde korunduğunu göstermektedir. *Drosophila*, sahip oldukları çeşitli genetik kaynaklar sayesinde, genlerin obezite üzerindeki etkilerinin incelenmesinde in vivo test tüpü olarak kullanılan güçlü bir araçtır (Reiter vd. 2001, Trinh, I. ve Boulianne 2013).

İnsan obezitesini taklit edebilen çeşitli *Drosophila* modelleri, obezite ile ilişkili genlerin kontrolü veya yüksek karbonhidratlı/yüksek yağlı diyetlerin uygulanması ile elde edilmektedir. Bu çalışmalarda, beslenme ve obezite arasındaki ilişkilerin incelenmesi için sürekli beslenen ve metamorfoz için fat body dokusunda yağ biriktiren larvaları kullanmak oldukça elverişlidir. (Birse vd. 2010, Musselman vd. 2011, Baumbach vd. 2014). Obezite modelinde insülin direnci oluşturmak için uygulanan yöntem genellikle beslenme döneminde olan larvaların yüksek şekerli diyet ile yetiştirilmesi şeklindedir ancak bu uygulamaların bazı zorlukları bulunmaktadır. Bu diyetle maruz kalan larvalarda hiperglisemi görülmesi, yüksek şeker içeren bir öğünden sonra kan şekeri yükselen non-diyabetik insanlardaki duruma benzemektedir. Medikal insülin direnci teşhisi için açlık kan şekerinin kontrol edilmesi gerekmektedir ve bunun sürekli beslenmek zorunda olan larvalar döneminde test edilmesi oldukça zordur. Ayrıca *Drosophila* meyve sineği için en çekici besin olan muzun doğal besini olduğu düşünüldüğünde yüksek şekerli diyet müdahalelerinin şeker konsantrasyonunun çok iyi ayarlanması gerektiğine dikkat çekilmektedir (Graham ve Pick 2017). Musselman ve arkadaşları (2011), yüksek şekerli diyet uygulaması ile insülin direnci ve obezite özelliklerini gösteren *Drosophila* modeli geliştirmişlerdir ve sonrasında (2013) bu modeli kullanarak yüksek şekerli diyetin lipid metabolizması üzerindeki etkilerini araştırmışlardır (Musselman vd 2013). Bu çalışma diyet, obezite ve insülin direnci arasındaki bağlantının evrimsel olarak korunduğunu ve *Drosophila* model organizmasının obezite araştırmalarını başarılı bir şekilde temsil edebildiğini gösteren önemli bir kaynak olarak literatürde yer almaktadır. Bugüne kadar yapılan modellemelerde hiperinsülinemi ve hiperglisemi, diyet ile indüklenen metabolik

bozukluklarla ilişkili kalp hastalıkları ve lipid metabolizması ile ilgili çalışmalara odaklanılmıştır (Birse vd. 2010).

Bu tez çalışmasında, obezitenin altında yatan mekanizmaların daha derinleştirilebilmesi için *Drosophila melanogaster* *P0206-GAL4; UAS-Ni* modeli kullanılmıştır. Bellosta'nın laboratuvarında geliştirilen *P0206-Gal4;UAS-Ni* modelinde CG7839 geni (*Drosophila* NOC1) sadece protorasik dokuya özgü olarak GAL4-UAS ikili gen düzenleme sistemi aracılığı ile sınırlandırılmıştır. Destefanis ve arkadaşları, *Drosophila*' da CG7839 geninin ribozomal RNA olgunlaşması ve doğru bir canlı gelişimi için gerekli olduğunu göstermişlerdir (Destefanis vd. 2022). Bu şekilde CG7839 geninin protorasik dokuya özgü olarak sınırlandırılması, bu dokunun küçülmesine ve buradan salgılanan metamorfoz için gerekli olan ecdison hormonunun inhibisyonuna neden olmuştur. Bunun sonucunda “doğal olarak” hiperfaji döneminde olan hayvanlar pupa evresine geçmeleri gereken dönemde larval evrede kalarak yaşamaya ve beslenmeye devam etmişlerdir. Bellosta'nın laboratuvarında yapılan ön çalışmalar, *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinde TAG ve hemolenfteki glukoz seviyelerinin obez kemirgen modeli ve insanlarda olduğu gibi zamanla arttığını göstermiştir. Bu durumda obezite çalışmalarında yeni bir model olarak *P0206-Gal4;UAS-Ni* modelinin kullanılması önerilebilir.

Çalışmamızda kullandığımız *P0206-Gal4;UAS-Ni* modelini diğer modellerden ayırt eden en önemli özelliklerden biri, standart *Drosophila* besin içeriğini değiştirmeden ve obezite ile ilgili genlere müdahale etmeden larval dönemin uzatılması ile hayvanın sürekli ve aşırı beslenme davranışı sergilemesi sonucunda obez fenotipe sahip olabilmeleridir. Böylece yüksek şekerli veya yüksek yağlı diyetlerin, obeziteden bağımsız olarak yol açtığı kalp, nefrotik ve bağırsak hasarı, fat body sinyal yollarının yeniden programlanması ve hiperozmolarite gibi fizyolojik etkilerine maruz kalmadan, Bloomington *Drosophila* stok merkezinin uzun yıllardır kullandığı tarife göre hazırlanmış, sineklerin doğal besinlerine en yakın içerik ile yetiştirilen larvalarda sadece obeziteye bağlı gelişen süreçlerin müdahalesiz bir şekilde izlenmesine izin verebilir. Diğer modellere kıyasla, bu obez fenotip larvaların sürekli beslenmenin devam ettiği larval dönemlerinin üç haftaya kadar uzaması ile obezitenin uzun süren kronik süreçleri ile ilgili mekanizmaların incelenebilecek olması sahip olduğu diğer avantajdır.

Çalışmamızda kullandığımız *Drosophila* organizması metabolik ve immün sistem arasındaki ilişkinin evrimsel kökenini temsil eden ve memeli adipoz dokusu, karaciğer ve bağışıklık sistemini bir arada bulunduran fat body dokusuna sahip olduğu için yukarıda bahsettiğimiz obezite ile birlikte adipoz dokuda meydana gelen süreçleri anlayabilmemiz bakımından avantajlı bir platform sunmuştur (Parra-Peralbo vd. 2021). *P0206-GAL4; UAS- Ni* modelinde obezitenin sonuçlarından ziyade doğrudan obezite patolojisinin en erken nedenini oluşturan enflamasyon sürecine odaklanılmıştır. İnsanda kronik enflamasyonun ve metabolik hastalıkların temel nedeni olarak görülen adipoz doku makrofaj infiltrasyon mekanizması *Drosophila* modeli üzerinde mevcut çalışma ile ilk kez gösterilmiştir.

Çaprazlama ile elde edilen *P0206-Gal4;UAS-Ni* obez larva modeli, yaşam döngülerinin 12. gününde olmasına rağmen puparasyon dönemine girmemiştir ve vücut büyüklüklerinde kontrol larvalarına kıyasla yaklaşık 1.5 kat artış meydana gelmiştir. Bu larvaların normal hızda geliştikleri, üç haftaya kadar larval dönemde kalarak sürekli beslenmeye devam ettikleri gözlenmiştir. Normal şartlarda *Drosophila* üçüncül larval döneminin son evrelerine denk gelen yaşam döngüsünün yaklaşık 5. gününde ekdison piki oluşturarak larval dönemden puparasyon dönemine geçiş yapar (Quinn vd. 2012). Bu modelde sınırlı ekdison ile puparasyona geçiş yapamayan larvalarda meydana gelen ağırlık artışı olarak da ifade edilebilen boyut artışının fat body dokusunda triaçilgliserol birikimine bağlı olduğu düşünülmüştür. Bunu doğrulamak amacı ile larvaların fat body dokuları incelenmiştir.

Obez fenotipe sahip larvalardan diseksiyon yöntemi ile topladığımız fat body doku örneklerinde floresan görüntüler aracılığı ile ele edilen histomorfolojik analizlere göre *PO206-GAL4* kontrol grubundaki fat body hücrelerinin, 12. gündeki *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modeline kıyasla daha sıkı paketlenmiş olduğunu ve sağlıklı adipoz dokunun özelliği olan hegzagonal morfolojiye sahip olduğu gösterilmiştir (Sun vd. 2011). *P0206-Gal4;UAS-Ni* (12. gün) larva modelinin fat body dokusunda yuvarlak morfolojiye benzeyen amorf yapıya sahip hücrelerin bulunması patolojik lipid birikimine işaret etmiştir. Fat body hücrelerinin konfokal floresan görüntülerinin kantitatif ölçümü ile hücre boyutları hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz veriler *P0206-Gal4;UAS-Ni* (12. gün) larva

modelinin hücre boyutunda kontrol larva grubuna kıyasla yaklaşık 2.5 kat kadar artış meydana geldiğini göstermiştir. Sonuç olarak *P0206-Gal4;UAS-Ni* (12. gün) larva modelinde vücut büyüklüğünde görülen artış ile birlikte fat body dokusundaki lipid damlacıklarında ve fat body hücrelerinin boyutlarında kritik artış meydana gelmiştir. Ayrıca Bellosta'nın laboratuvarında yapılan ön çalışmaların lipidomik analizlerine göre, *P0206-Gal4;UAS-Ni* larvalarında de novo lipogenez ile ilişkili genlerin ifadelerinin ve toplam TAG seviyelerinin yüksek olması fat body hücrelerindeki boyut artışını destekleyen sonuçlardır. İnsanda obezitenin patofizyolojik belirleyicisi olarak görülen ve metabolik hastalıklar ile pozitif korelasyon oluşturan adiposit hipertrofinin aynı şekilde *P0206-Gal4;UAS-Ni* larvalarda sergilendiği gösterilmiştir (Laforest vd. 2015, Stenkula ve Erlanson-Albertsson 2018). Adipoz doku hipertrofisi kronik inflamasyon ve insülin direncini oluşturan süreçlere neden olduğu bilinmektedir. Adipositlerde lipid birikiminin lipotoksisteye karşı koruyucu olduğu görüşü yaygındır ancak adipositlerin depo kapasitesini aştığı durumda enflamatuvar ortama bağlı olarak metabolik hasar gelişmektedir. Bunun en önemli indikatörü adipoz doku makrofaj infiltrasyonudur.

İnsanda adipoz dokuda kronik enflamasyonun histolojik ayırt edici özelliği olan ve metabolik hasarın nedeni olan makrofaj infiltrasyonunun *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinde gerçekleşip gerçekleşmediği *in vivo* olarak test edilmiştir. *Hml-RFP/P0206-Gal4* kontrol grubuna kıyasla *Hml-RFP/P0206-Gal4;UAS-Ni* fat body hemosit miktarı 5. günde %5.2 ve 12. günde %17 oranında artmıştır. Patolojik yağ birikiminin olmadığı sağlıklı fare ve insan adipoz dokusunda toplam hücre miktarının %5 kadarının makrofaj popülasyonundan oluşmaktadır (Weisberg vd. 2003). *Hml-RFP/P0206-Gal4* kontrol larvalarında tespit edilen %5 oranındaki makrofaj miktarı, sağlıklı *Drosophila* fat body dokusunda yerel olarak bulunan makrofajlar ile ilgilidir. Ayrıca ön çalışmalarda, *P0206-CG7839^{RNAi}* larva modelinin beyin ve bağırsak dokusu incelenmiştir ancak bu dokularda hemositlere rastlanmamıştır. Bu sonuçlar ile adipoz dokuya özgü olan makrofaj infiltrasyon fenomeninin *Drosophila*' da aynı şekilde gerçekleştiğini ve zamanla şiddetlendiğini göstermiş olup, insanda adipoz doku makrofaj (ATM) infiltrasyonu ile ilişkili sinyallerin fat body ve hemositler arasında korunduğuna işaret etmesi bakımından oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Reiter vd. 2001).

İlerlemiş obezite ile birlikte adipoz dokuda progresif makrofaj infiltrasyonu görülür ve bu makrofajlar birleşerek çok çekirdekli devasa hücreleri oluştururlar. Cinti ve arkadaşlarının histolojik tanımlaması ile mikroskopta “taç benzeri yapılar” (CLSs) olarak görülen bu birleşik makrofaj hücreleri adipoz dokuda bulunan ölü adiposit hücrelerini ve lipid kalıntılarını etkili bir şekilde temizleyebilmektedirler. İmmunohistokimyasal değerlendirme sonucunda *P0206-Gal4;UAS-Ni* (yaşamlarının 12. gününde) larva modelinde, fat body hücreleri etrafında toplanan hemositlerin CLS yapıları meydana getirdiği görüntülenmiştir. CLS yapıları kronik enflamasyonun karakteristik bir özelliği olup, obezitenin patolojik özelliği olan insülin direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Cinti vd. 2005).

Sağlıklı ve hastalıklı metabolizma üzerinde kritik fonksiyona sahip olan TNF- α sitokininin insülin sinyalinin bozulmasına neden olan hücre içi sinyal ağlarına aracılık ettiği ve makrofajların adiposit hücrelerin etrafında birikmesine neden olduğu bilinmektedir (Hotamışlıgil vd. 1994, Parameswaran ve Patial 2010). Adipositler etrafında biriken makrofajların yoğun bir şekilde TNF- α salınımı gerçekleştirerek insülin sinyalinin giderek azalmasına neden oldukları mekanizma obezite ve obezite ile ilişkili hastalıkların kaynağını oluşturmaktadır (Li vd. 2023). Bu nedenle anti-TNF stratejiler ile metabolik enflamasyonu düzenlenmenin terapötik bir hedef olarak etkili olabileceği düşünülmüştür (Sethi ve Hotamışlıgil, 2021).

Yapılan çalışmalar, TNF sinyal yolağının proksimal ve distal öğelerinin tümünün meyve sineğinde korunduğunu, TNF aktivasyonunun insülin üretimini JNK yolağı üzerinden inhibe ettiğini göstermektedir (Agrawal vd. 2016, Sethi ve Hotamışlıgil, 2021). Ancak *Drosophila* modelinde obezite ile indüklenen kronik enflamasyonun, TNF sinyal mekanizması ile ilişkisinin tanımlandığı bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında fat body dokusunda hemosit infiltrasyonundan TNF sinyalinin sorumlu olup olmadığının tanımlanması için *Drosophila* TNF- α olarak bilinen Eiger molekülünün *egr¹*, *egr^{1AG}* ve bu sitokinin reseptörü olan *grnd* mutasyonunu taşıyan sinek hatları *P0206-Gal4;UAS-Ni* genetik altyapısı üzerinden oluşturularak TNF sinyal yolağı aşağı akış yönünde engellenmiştir (Igaki vd. 2002, Andersen vd. 2005). Elde ettiğimiz veriler obezite koşullarında eiger ligandını baskılayanın fat body dokusunda hemosit

infiltrasyonunu dramatik bir şekilde azalttığını göstermiştir. Sonuç olarak, insülin direncinin nedeni olarak kabul edilen, kronik enflamasyonu oluşturan makrofaj infiltrasyonundan TNF sinyalinin sorumlu olduğu *P0206-Gal4;UAS-Ni* modelinde gösterilmiştir. Ayrıca *grnd* mutant sinek hattından elde edilen sonuçlara göre, TNF sinyali tarafından grindelwald reseptörü aracılığı ile aktive edilen JNK sinyal yolağının *Drosophila*' da hemosit infiltrasyonu ile olan ilişkisi tanımlanmıştır.

Drosophila eiger fonksiyonunun engellenmesine yönelik *egr1* ve *egr3* mutant sinek hatları hücre ölümü, büyüme ve gelişme, immün çalışmalarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Igaki vd. 2002). Kodra ve arkadaşları tarafından sunulan çalışmada ölü hücrelerin fagositozundan sorumlu olan NimC1 ifadesinin *Drosophila* plazmatositlerinde yüksek seviyelerde olduğu ancak *egr1* mutant larval hemositlerinin bu ifadeye sahip olmadıkları gösterilmiştir. Bu durumda *egr1* mutasyonu olan larvalarda fagositoz eksikliğine bağlı olarak ölü hücre birikimi meydana geldiğini, *egr1* mutant hattının kullanıldığı çok sayıda hücre ölümü ve immün çalışmaların yeniden değerlendirilmesinin önemli olduğunu bildirmiştir. NimC1 mutasyonunun *egr1* mutant hattından silinerek NimC1 fonksiyonunun geri kazandırıldığı *egr1^{ΔG}* (Kodra vd. 2020) ve *egr1* mutant hatları ile gerçekleştirilen çalışmamızın sonuçlarında her iki *egr1* ve *egr1^{ΔG}* mutasyonlarının hemosit infiltrasyonunu aynı oranda azaltması, *egr1* ve *egr1^{ΔG}* mutasyonlarının hemosit infiltrasyon mekanizması üzerinde aynı etkiye sahip olduklarının gösterilmesi altı çizilmesi gereken önemli bir sonuçtur. Böylece *egr1* mutant hattı ile gerçekleştirilen çalışmaların sonuçlarında NimrodC1 (NimC1) reseptörünün olası bir etkisinin bulunmadığı bu çalışma ile ilk kez gösterilmiştir. Böylece *P0206-Gal4;UAS-Ni* larva modelinde *egr1* mutasyonunun obezitenin farklı yönlerine olan etkisinin değerlendirildiği çalışmaların kabul edilebileceği ve bu çalışmalara *egr1* hattı ile devam edilebileceği ortaya koyulmuştur.

Bu çalışmadan ve diğer ön çalışmalardan elde ettiğimiz tüm veriler *P0206>CG7839^{RNAi}* larvalarının, insanda obezite ile indüklenen kronik enflamasyon ve bunun nedeni olan adipoz doku makrofaj infiltrasyon çalışmalarında bir model olarak önerilebileceğini göstermektedir. Böylece metabolik hasarın önlenmesinde adipoz doku makrofaj infiltrasyonu ile ilgili süreçleri temel yönleri ile ele alabilmek için karmaşık modellerin

zorluklarından muaf olan daha basit bir sistemin kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada obezite ile ilişkili hastalıkların bilinen en erken nedeni olan TNF sinyal yolağının (Eiger), *Drosophila* fat body dokusunda hemosit birikiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir ve fat body ile ilişkili TNF sinyali *Drosophila*' da tanımlanmıştır. Böylece bu model kullanılarak insülin direnci ile etkili bir şekilde savaşıma aday olan potansiyel terapötik hedeflerden biri olan TNF sinyalinin aracılık ettiği metabolik hasar ile ilişkili hücre içi mekanizmalar daha detaylı araştırılabileceği ve hücre homeostazının geri kazandırılmasına yönelik, gelecekte kullanılabilecek obezite ve diyabet ilaçlarına evrilebilecek anti-enflamatuar ajanların bu model üzerinde test edilebileceği düşünülmektedir.

Drosophila ile ilaç tarama araştırmaları, ilaç etkinliğinin, toksisitesinin ve potansiyel yan etkilerinin hızlı ve düşük maliyetli bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanır. İnsan obezitesini taklit edebilen obez *P0206>CG7839^{RNAi}* modelimizin genetik taramalar gerçekleştirmek veya yeni terapötik maddelerin etkinliğini ve güvenliğini test etmek için elverişli bir platform sağlayacağı düşünülmektedir. Bu model kullanılarak ilaçların vücut ağırlığı, yağ birikimi, glikoz toleransı, insülin duyarlılığı ve lipid profilleri dahil olmak üzere çeşitli metabolik parametreler, yağ dokusu metabolizması ve lipid birikimi üzerindeki etkilerinin incelenmesine olanak sağlayabilecektir.

Ön maddesi kolesterol olan steroid grubu hormonlarından *Drosophila*' da ekdison ve insanlarda testosteron/östrojen büyüme, gelişme ve olgunlaşma dönemleri ile ilişkilidir. Benzer şekilde insülin sinyal yolağının beslenme ve büyümenin düzenlenmesindeki kritik fonksiyonu insanlarda ve sineklerde evrimsel olarak korunmuştur. Ayrıca son yıllarda steroid hormonları ile ilgili yapılan çalışmalar insanlarda östrojen ve testosteronun, sineklerde ekdisonun metabolik regülasyonu sağladığı ve metabolik hastalıkların gelişiminde oldukça önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Fan vd 2019, Sebo ve Rodeheffer, 2021, Wittert ve Grossmann, 2022). Bu tez çalışmasında kullandığımız obez model larvalarda, metabolik komplikasyonların en önemli nedeni olarak kabul edilen vücut yağ dağılımının bozulması ile ilişkili en büyük risk faktörlerinden kadınlarda östrojenin veya erkeklerde testosteronun azaldığı hipogonadizm durumu özgün bir model ile taklit edilmiştir. Sonuç olarak steroid hormonu olan ekdisonunun inhibe edildiği

P0206>CG7839^{RNAi} yeni obezite modelimiz ile sineklerde hiperfajiye bağlı olarak obezite ve insülin direncinin gelişimi ile ilişkili kronik enflamasyon karakterize edilmiştir. Bu durum, sinek ve insanlar gibi evrimsel olarak uzak türlerin arasında steroid hormonlar, obezite ve metabolizma ilişkisinin altında yatan mekanizmalardaki dikkate değer benzerliklerin altını çizmektedir. Bununla birlikte steroid hormonları ve metabolik regülasyon arasındaki ilişki oldukça karmaşık olup, büyüme/olgunlaşma ve metabolik regülasyonda rol oynayan süreçlerin altında yatan mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. Bu süreçleri sinekler gibi model organizmalarda incelemek, insanlar da dahil olmak üzere daha karmaşık organizmalarda büyüme ve olgunlaşmanın altında yatan temel mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sağlayacağı bilinmektedir. Bu mekanizmaların aydınlatılması ile büyüme ve metabolik bozukluklarla ilgili potansiyel terapötik müdahaleler için hedefler belirlenebilecektir.

KAYNAKLAR

- Agrawal, N., Delanoue, R., Mauri, A., Basco, D., Pasco, M., Thorens, B. ve Leopold, P. 2016. 'The Drosophila TNF Eiger Is an Adipokine that Acts on Insulin-Producing Cells to Mediate Nutrient Response'. *Cell Metabolism*, 23(4), 675-684.
- Akashi, H., Miyagishi, M. ve Taira, K. 2004. Suppression of Gene Expression by RNA Interference in Cultured Plant Cells. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 11(6), 359-367.
- Allocca, M., Zola, S. ve Bellosta, P. 2018. The Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*: The Making of a Model (Part I).
- Alpert, M. A., Lavie, C. J., Agrawal, H., Kumar, A. ve Kumar, S. A. 2016. Cardiac Effects of Obesity: PATHOPHYSIOLOGIC, CLINICAL, AND PROGNOSTIC CONSEQUENCES-A REVIEW. *J Cardiopulm Rehabil Prev*, 36(1), 1-11.
- Amato, M. C., Giordano, C., Galia, M., Criscimanna, A., Vitabile, S., Midiri, M., . . . AlkaMeSy Study, G. 2010. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*, 33(4), 920-922.
- Antonini-Canterin, F., Mateescu, A. D., Vriz, O., La Carrubba, S., Di Bello, V., Carerj, S., . . . Popescu, B. A. 2014. Cardiac structure and function and insulin resistance in morbidly obese patients: does superobesity play an additional role? *Cardiology*, 127(3), 144-151.
- Arrese, E. L. ve Soulages, J. L. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol*, 55, 207-225.
- Ashburner, M. 1989. *Drosophila: A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Baker, K. D. ve Thummel, C. S. 2007. Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab*, 6(4), 257-266.
- Baumbach, J., Hummel, P., Bickmeyer, I., Kowalczyk, K. M., Frank, M., Knorr, K., . . . Kuhnlein, R. P. 2014. A *Drosophila* in vivo screen identifies store-operated calcium entry as a key regulator of adiposity. *Cell Metab*, 19(2), 331-343.
- Bays, H. 2014. Central obesity as a clinical marker of adiposopathy; increased visceral adiposity as a surrogate marker for global fat dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21(5), 345-351.
- Bell, C. G., Walley, A. J. ve Froguel, P. 2005. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*, 6(3), 221-234.
- Bing, C. 2015. Is interleukin-1beta a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte*, 4(2), 149-152.
- Bird, P. I. ve Whisstock, J. C. 2011. *Methods in enzymology*. (Vol. 499). Academic Press, San Diego.

- Birse, R. T., Choi, J., Reardon, K., Rodriguez, J., Graham, S., Diop, S., . . . Oldham, S. 2010. High-fat-diet-induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila*. *Cell Metab*, 12(5), 533-544.
- Bjorntorp, P. 1991. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care*, 14(12), 1132-1143.
- Bluher, M. 2019. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*, 15(5), 288-298.
- Blüher, M. 2019. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), 288-298.
- Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B. F., . . . Hafen, E. 1999. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell*, 97(7), 865-875.
- Boura-Halfon, S. ve Zick, Y. 2009. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(4), E581-591.
- Bourgeois, C., Gorwood, J., Barrail-Tran, A., Lagathu, C., Capeau, J., Desjardins, D., . . . Lambotte, O. 2019. Specific Biological Features of Adipose Tissue, and Their Impact on HIV Persistence. *Front Microbiol*, 10, 2837.
- Brand, A. H. ve Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118, 401-415.
- Breugel, F. v. (2017). In.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820.
- Burian, E., Grundl, L., Greve, T., Junker, D., Sollmann, N., Loffler, M., . . . Baum, T. 2021. Local Bone Mineral Density, Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Measurements in Routine Multi Detector Computed Tomography-Which Parameter Predicts Incident Vertebral Fractures Best? *Diagnostics (Basel)*, 11(2).
- Burki, T. 2021. European Commission classifies obesity as a chronic disease. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 9(7).
- Cai, Z., Huang, Y. ve He, B. 2022. New Insights into Adipose Tissue Macrophages in Obesity and Insulin Resistance. *Cells*, 11(9).
- Carobbio, S., Pellegrinelli, V. ve Vidal-Puig A. 2017. Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Obesity and Lipotoxicity*. Springer, 161–196.
- Chang, L. ve Karin, M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40.
- Charriere, G., Cousin, B., Arnaud, E., Andre, M., Bacou, F., Penicaud, L. ve Casteilla, L. 2003. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*, 278(11), 9850-9855.
- Chawla, A., Nguyen, K. D. ve Goh, Y. P. 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11(11), 738-749.

- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I. ve Kim, J. B. 2016. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7, 30.
- Chooi, Y. C., Ding, C. ve Magkos, F. 2019. The epidemiology of obesity. *Metabolism*, 92, 6-10.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., . . . Obin, M. S. 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46(11), 2347-2355.
- Coelho, M., Oliveira, T. ve Fernandes, R. 2013. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*, 9(2), 191-200.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carre, C., Noselli, S. ve Leopold, P. 2005. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science*, 310, 667-670.
- Correa, L. H., Heyn, G. S. ve Magalhaes, K. G. 2019. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, 8(7).
- Coutiño, B. C., Szamek, E. ve Markus, Z. 2021. Generation and live imaging of tumors with specific genotypes in the living fly pupa. *Star Protocols*, 2(3), 100672.
- Defaye, A. 2009. Genetic Ablation of *Drosophila* Phagocytes Reveals Their Contribution to Both Development and Resistance to Bacterial Infection. *Journal of Innate Immunity*, 1(4), 322-334.
- De Lorenzo, A., Romano, L., Di Renzo, L., Di Lorenzo, N., Cennamo, G. ve Gualtieri, P. 2020. Obesity: A preventable, treatable, but relapsing disease. *Nutrition*, 71, 110615.
- de Luca, C. ve Olefsky, J. M. 2008. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*, 582(1), 97-105.
- Destefanis, F., Manara V., Santarelli, S., Zola, S., Brambilla, M., Viola, G., Maragno, P., Signoria, I., Viero, G., Pasini, M. E., Penzo M. ve Bellosta P. 2022. Reduction of nucleolar NOC1 leads to the accumulation of pre-rRNAs and induces Xrp1, affecting growth and resulting in cell competition. *J Cell Sci*, 135(23).
- Di Pino, A. ve DeFronzo, R. A. 2019. Insulin Resistance and Atherosclerosis: Implications for Insulin-Sensitizing Agents. *Endocr Rev*, 40(6), 1447-1467.
- Dlakic, M. ve Tollervy, D. 2004. The Noc proteins involved in ribosome synthesis and export contain divergent HEAT repeats. *RNA*, 10(3), 351-354.
- Efeyan, A., Comb, W. C. ve Sabatini, D. M. 2015. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature*, 517(7534), 302-310.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. ve Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2), 188-200.
- Elliott, D. ve Brand, A. 2008. The GAL4 system: A versatile system for the expression of genes. *Methods in Molecular Biology*, 420, 79-95.

- Fairbrother, U., Kidd, E., Malagamuwa, T. ve Walley, A. 2018. Genetics of Severe Obesity. *Curr Diab Rep*, 18(10), 85.
- Fan, H., Chen, S., Gao, B., Ding, S., Zhao, Q., Li, C. ve Asakawa, T. 2019. Risk analysis of systemic levels of estrogen and adipokines as well as estrogen receptors from PBMCs in childbearing and perimenopausal women with obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12, 1287-1295.
- Feng, J., Lu, S., Ou, B., Liu, Q., Dai, J., Ji, C., . . . Ma, Y. 2020. The Role of JNk Signaling Pathway in Obesity-Driven Insulin Resistance. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 13, 1399-1406.
- Fernandez-Almonacid, R. ve Rosen, O. M. 1987. Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor. *Mol Cell Biol*, 7(8), 2718-2727.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. ve Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, (6669):6806.
- FlyBase. 2023. Holtzman and Kaufman (2013) CyO. <https://flybase.org> Erişim tarihi: 16.04.2023
- Frame, S. ve Cohen, P. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J*, 359(Pt 1), 1-16.
- Frank, A. P., Santos, R. S., Palmer, B. F. ve Clegg D. J. 2019. Determinants of body fat distribution in humans may provide insight about obesity-related health risks. *Journal of Lipid Research*, 60(10), 1710-1719.
- French, S. A., Story, M. ve Jeffery, R. W. 2001. Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health*, 22, 309-335.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., . . . Shimomura, I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 114(12), 1752-1761.
- Garofalo, R. S. 2002. Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab*, 13(4), 156-162.
- Gealekman, O., Gurav, K., Chouinard, M., Straubhaar, J., Thompson, M., Malkani, S., . . . Corvera, S. 2014. Control of adipose tissue expandability in response to high fat diet by the insulin-like growth factor-binding protein-4. *J Biol Chem*, 289(26), 18327-18338.
- Giordano, A., Murano, I., Mondini, E., Perugini, J., Smorlesi, A., Severi, I., . . . Cinti, S. 2013. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res*, 54(9), 2423-2436.
- Gomes, A. C., Hoffmann, C. ve Mota, J. F. 2018. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*, 9(4), 308-325.
- Gomez-Hernandez, A., Beneit, N., Diaz-Castroverde, S. ve Escribano, O. 2016. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol*, 2016, 1216783.
- Goossens, G. H. 2017. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts*, 10(3), 207-215.

- Graham, P. ve Pick, L. 2017. *Drosophila* as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. *Curr Top Dev Biol*, 121: 397–419.
- Grant, R. W. ve Dixit, V. D. 2015. Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity* (Silver Spring), 23(3), 512-518.
- Greenspan, R. J. 1997. *The Theory and Practice of Drosophila Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Gregor, M. F. ve Hotamışlıgil, G. S. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, 29, 415-445.
- Gronke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Muller, G., . . . Kuhnlein, R. P. 2005. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab*, 1(5), 323-330.
- Grundy, S. M. 2000. Metabolic complications of obesity. *Endocrine*, 13(2), 155-165.
- Guerreiro, V. A., Carvalho, D. ve Freitas, P. 2022. Obesity, Adipose Tissue, and Inflammation Answered in Questions. *J Obes*, 2022, 2252516.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. ve Czech, M. P. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5), 367-377.
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuente, A. M. ve Roberts, D. M. 2015. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics*, 201(3), 815-842.
- Hancer, N. J., Qiu, W., Cherella, C., Li, Y., Copps, K. D. ve White, M. F. 2014. Insulin and metabolic stress stimulate multisite serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and inhibit tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 289(18), 12467-12484.
- Haudry, A., Laurent, S. ve Kapun, M. 2020. Population Genomics on the Fly: Recent Advances in *Drosophila*. *Methods Mol Biol*, 2090, 357-396.
- Hinney, A., Vogel, C. I. ve Hebebrand, J. 2010. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 19(3), 297-310.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., . . . Hotamışlıgil, G. S. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913), 333-336.
- Hotamışlıgil. 2002. Yağ Hücreleri Gelişimi ve Enerji Metabolizmasının Moleküler Kontrol Mekanizmaları. Türkiye Bilimler Akademisi Forumu.
- Hotamışlıgil, G. S. 2005. Role of Endoplasmic Reticulum Stress and c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathways in Inflammation and Origin of Obesity and Diabetes. *Diabetes*, 54:2.
- Hotamışlıgil, G. S. 1999. The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*, 245(6), 621-625.
- Hotamışlıgil, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860-867.
- Hotamışlıgil, G. S. 2017. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542(7640), 177-185.

- Hotamışlıgil, G. S. 2017. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. *Immunity*, 47, 406-420.
- Hotamışlıgil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. ve Spiegelman, B. M. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 95(5), 2409-2415.
- Hotamışlıgil, G. S., Shargilland, N. S. ve Spiegelman, B. M. 1993. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.
- Hruby, A. ve Hu, F. B. 2015. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, 33(7), 673-689.
- Hruby, A., Manson, J. E., Qi, L., Malik, V. S., Rimm, E. B., Sun, Q., . . . Hu, F. B. 2016. Determinants and Consequences of Obesity. *Am J Public Health*, 106(9), 1656-1662.
- Igaki, T. 2009. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis*, 14(8), 1021-1028.
- Jackson, V. M., Breen, D. M., Fortin, J. P., Liou, A., Kuzmiski, J. B., Loomis, A. K., Rives, M. L., Shah, B., Carpino, P. 2015. Latest approaches for the treatment of obesity. *Expert Opin Drug Discov*, 10(8):825-39.
- Jennings, B. H. 2011. *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine. *Materials Today*, 14(5), 190-195.
- Jorquera, G., Russell, J., Monsalves-Alvarez, M., Cruz, G., Valladares-Ide, D., Basualto-Alarcon, C., . . . Llanos, P. 2021. NLRP3 Inflammasome: Potential Role in Obesity Related Low-Grade Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci*, 22(6).
- Kahn, B. B. ve Cushman, S. W. 1985. Subcellular translocation of glucose transporters: role in insulin action and its perturbation in altered metabolic states. *Diabetes Metab Rev*, 1(3), 203-227.
- Kahn, S. E. 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46(1), 3-19.
- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., . . . Kadowaki, T. 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*, 281(36), 26602-26614.
- Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y, Hori M. 2004. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med*, 10:1128–1132.
- Karin, M. ve Gallagher, E. 2005. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*, 57(4-5), 283-295.
- Kaufman, T. C. 2017. A Short History and Description of *Drosophila melanogaster* Classical Genetics: Chromosome Aberrations, Forward Genetic Screens, and the Nature of Mutations. *Genetics*, 206(2), 665-689.

- Kawai, T., Autieri, M. V. ve Scalia, R. 2021. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 320(3), C375-C391.
- Kershaw, E. E. ve Flier, J. S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6), 2548-2556.
- Kohler, R. E. 1994. *Lords of the fly.* . University of Chicago Press.
- Kuhnlein, R. P. 2012. Thematic review series: Lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. Lipid droplet-based storage fat metabolism in *Drosophila*. *J Lipid Res*, 53(8), 1430-1436.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., . . . Woodgett, J. R. 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 369(6476), 156-160.
- Lachaise D, C. M.-L., David J. R., Lemeunier F., Tsacas L. & Ashburner M. . 1988. Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. . (Vol. 22), 159-225.
- Laforest, S., Labrecque, J., Michaud, A., Cianflone, K. ve Tchernof, A. 2015. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 52(6), 301-313.
- Langin, D. ve Arner, P. 2006. Importance of TNF α and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol Metab*, 17(8), 314-320.
- Larsen, G. L. ve Henson, P. M. 1983. Mediators of inflammation. *Annu Rev Immunol*, 1, 335-359.
- Le Roith, D. ve Zick, Y. 2001. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, 24(3), 588-597.
- Lebovitz, H. E. 2001. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109 Suppl 2, S135-148.
- Lessard, J. ve Tchernof, A. 2017. Depot- and obesity-related differences in adipogenesis Adipocyte hypertrophy and hyperplasia are known to facilitate lipid storage in adipose tissues by increasing adipocyte cell size and number, respectively *Clinical Lipidology*, 7(5), 587-596.
- Li, J. H., Hepworth, M. R. ve O'Sullivan, T. E. 2023. Regulation of systemic metabolism by tissue-resident immune cell circuits. *Immunity*, 56, 1168-1186.
- Lin, X. ve Li, H. 2021. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 706978.
- Lin, Z., Feng, W., Liu, Y., Ma, C., Arefan, D., Zhou, D., . . . Qu, S. 2021. Machine Learning to Identify Metabolic Subtypes of Obesity: A Multi-Center Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 713592.
- Liu, J., Li, T., Yang, D., Ma, R., Moran, T. H. ve Smith, W. W. 2012. Synphilin-1 alters metabolic homeostasis in a novel *Drosophila* obesity model. *Int J Obes (Lond)*, 36(12), 1529-1536.

- Llewellyn, C. H., Trzaskowski, M., van Jaarsveld, C. H. M., Plomin, R. ve Wardle, J. 2014. Satiety mechanisms in genetic risk of obesity. *JAMA Pediatr*, 168(4), 338-344.
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., . . . Miele, C. 2019. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci*, 20(9).
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. ve Saltiel, A. R. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 117(1), 175-184.
- Makhijani, K., Alexander, B., Tanaka, T., Rulifson, E. ve Bruckner, K. 2011. The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. *Development*, 138(24), 5379-5391.
- Marchetti, M., Fanti, L., Berloco, M. ve Pimpinelli, S. 2003. Differential expression of the *Drosophila* BX-C in polytene chromosomes in cells of larval fat bodies: a cytological approach to identifying in vivo targets of the homeotic Ubx, Abd-A and Abd-B proteins. *Development*, 130(16).
- Mariateresa Allocca, S. Z., Paola Bellosta. 2018. *Drosophila melanogaster* - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics. (Perveen, F. K. (ed)).
- Montserrat-Mesquida, M., Quetglas-Llabres, M., Capo, X., Bouzas, C., Mateos, D., Pons, A., . . . Sureda, A. 2020. Metabolic Syndrome is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State. *Antioxidants (Basel)*, 9(3).
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., . . . O'Rahilly, S. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387(6636), 903-908.
- Murillo-Maldonado, J. M. ve Riesgo-Escovar, J. R. 2017. Development and diabetes on the fly. *Mech Dev*, 144(Pt B), 150-155.
- Musselman, L. P., Fink, J. L., Narzinski, K., Ramachandran, P. V., Hathiramani, S. S., Cagan, R. L. ve Baranski, T. J. 2011. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Dis Model Mech*, 4(6), 842-849.
- Musselman, L. P., Fink, J. L., Ramachandran, P. V., Patterson, B. W., Okunade, A. L., Maier, E., . . . Baranski, T. J. 2013. Role of fat body lipogenesis in protection against the effects of caloric overload in *Drosophila*. *J Biol Chem*, 288(12), 8028-8042.
- Musselman, L. P. ve Kuhnlein, R. P. 2018. *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. *J Exp Biol*, 221(Pt Suppl 1).
- Nam, S., Redeker, N. ve Whittemore, R. 2015. Social networks and future direction for obesity research: A scoping review. *Nurs Outlook*, 63(3):299-317.
- National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in, Adults. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 106(25), 3143-3421.

- Nimptsch, K., Konigorski, S. ve Pischon, T. 2019. Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine. *Metabolism*, 92, 61-70.
- Niwa, Y. S. ve Niwa, R. 2014. Neural control of steroid hormone biosynthesis during development in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet Syst*, 89(1), 27-34.
- Nowotny, K., Jung, T., Hohn, A., Weber, D. ve Grune, T. 2015. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*, 5(1), 194-222.
- Nuttall, F. Q. 2015. Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutr Today*, 50(3), 117-128.
- Olefsky, J. M. ve Glass, C. K. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*, 72, 219-246.
- Owusu-Ansah, E. ve Banerjee, U. 2009. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, 461(7263), 537-541.
- Paley, C. A. ve Johnson, M. I. 2018. Abdominal obesity and metabolic syndrome: exercise as medicine? *BMC Sports Sci Med Rehabil*, 10, 7.
- Pandey, U. B. ve Nichols, C. D. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev*, 63(2), 411-436.
- Parameswaran, N. ve Patial, S. 2010. 'Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages.', *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. NIH Public Access, 20(2), 87-103.
- Parisi, F., Riccardo, S., Zola, S., Lora, C., Grifoni, D., Brown, L. M. and Bellosta, P. 2013. dMyc expression in the fat body affects DILP2 release and increases the expression of the fat desaturase *Desat1* resulting in organismal growth. *Developmental Biology*, 379(1).
- Parker, L., Stepto N. K., Shaw, C. S., Serpiello, F. R., Anderson, M., Hare, D. L. ve Levinger, I. 2016. Acute High-Intensity Interval Exercise-Induced Redox Signaling Is Associated with Enhanced Insulin Sensitivity in Obese Middle-Aged Men. *Front Physiol*, 7: 411.
- Parra-Peralbo, E., Talamillo, A. ve Barrio, R. 2021. Origin and Development of the Adipose Tissue, a Key Organ in Physiology and Disease. *Front Cell Dev Biol*, 9, 786129.
- Perveen, F. K. 2018. *Drosophila melanogaster* - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics. 268.
- Petersen, M. C. ve Shulman, G. I. 2018. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*, 98(4), 2133-2223.
- Petrova, R., Garcia, A. D. ve Joyner, A. L. 2013. Titration of GLI3 repressor activity by sonic hedgehog signaling is critical for maintaining multiple adult neural stem cell and astrocyte functions. *J Neurosci*, 33(44), 17490-17505.

- Quinn, L., Lin, J., Cranna, N., Lee, J. E. A., Mitchell, N. ve Steroids, R. H. 2012. Steroid Hormones in *Drosophila*: How Ecdysone Coordinates Developmental Signalling with Cell Growth and Division,. (Abduljabbar, P. H. (ed)). InTech.
- Rashid, M. N., Fuentes, F., Touchon, R. C. ve Wehner, P. S. 2003. Obesity and the Risk for Cardiovascular Disease. *Preventive Cardiology*, 6(1), 42-47.
- Razani, B., Chakravarthy, M. V. ve Semenkovich, C. F. 2008. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37(3), 603-621, viii.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. ve Bier, E. 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*, 11(6), 1114-1125.
- Revelo, X. S., Luck, H., Winer, S. ve Winer, D. A. 2014. Morphological and inflammatory changes in visceral adipose tissue during obesity. *Endocr Pathol*, 25(1), 93-101.
- Reyes-Farias, M., Fos-Domenech, J., Serra, D., Herrero, L. ve Sanchez-Infantes, D. 2021. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol*, 192, 114723.
- Riddiford, L. M. 1993. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor* 3 (3), 203-209.
- Ritchie, H. ve Roser, M. 2017. Web sitesi: <https://ourworldindata.org/obesity>.
- Rizki, M. T. ve Rizki, R. M. 1959. Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J Biophys Biochem Cytol*, 5(2), 235-240.
- Rizza, R. A. 2010. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes*, 59(11), 2697-2707.
- Roberts, C. K., Hevener, A. L. ve Barnard, R. J. 2013. Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training. *Compr Physiol*, 3(1), 1-58.
- Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y. W., Nikolopoulou, E., . . . Christian, M. 2014. Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306(8), E945-964.
- Ross, R., Neeland, I. J., Yamashita, S., Shai, I., Seidell, J., Magni, P., . . . Despres, J. P. 2020. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. *Nat Rev Endocrinol*, 16(3), 177-189.
- Roytblat, L., Rachinsky, M., Fisher, A., Greemberg, L., Shapira, Y., Douvdevani, A. ve Gelman, S. 2000. Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res*, 8(9), 673-675.
- Rulifson, E. J., Kim, S. K. ve Nusse, R. 2002. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science*, 296(5570), 1118-1120.
- Russo, L. ve Lumeng, C. N. 2018. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology*, 155(4), 407-417.

- Rutkowski, J. M., Stern, J. H. ve Scherer, P. E. 2015. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*, 208(5), 501-512.
- Saghizadeh, M., Ong, J. M., Garvey, W. T., Henry, R. R. ve Kern, P. A. 1996. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*, 97(4), 1111-1116.
- Samuel, V. T., Liu, Z. X., Qu, X., Elder, B. D., Bilz, S., Befroy, D., . . . Shulman, G. I. 2004. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, 279(31), 32345-32353.
- Schaffler, A., Scholmerich, J. ve Salzberger, B. 2007. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends Immunol*, 28(9), 393-399.
- Sebo, Z. L. ve Rodeheffer, M. S. 2021. Testosterone metabolites differentially regulate obesogenesis and fat distribution. *Molecular Metabolism*, 44, 101141.
- Semenkovich, C. F. 2006. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 116(7), 1813-1822.
- Sethi, J. K. ve Vidal-Puig, A. J. 2007. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*, 48(6), 1253-1262.
- Sethi, J. K. ve Hotamışlıgil G. S. 2021. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nature Metabolism*, 3:1302–1312. |
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H. ve Flier, J. S. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 116(11), 3015-3025.
- Shields, W. W., Thompson, K. E., Grice, G. A., Harrison, S. A. ve Coyle, W. J. 2009. The Effect of Metformin and Standard Therapy versus Standard Therapy alone in Nondiabetic Patients with Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH): A Pilot Trial. *Therap Adv Gastroenterol*, 2(3), 157-163.
- Shoelson, S. E., Lee, J. ve Goldfine, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 116(7), 1793-1801.
- Singla, P., Bardoloi, A. ve Parkash, A. A. 2010. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes*, 1(3), 76-88.
- Smith, W. W., Thomas, J., Liu, J., Li, T. ve Moran, T. H. 2014. From fat fruit fly to human obesity. *Physiol Behav*, 136, 15-21.
- Solinas, G. ve Becattini, B. 2017. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Mol Metab*, 6(2), 174-184.
- Solinas, G. ve Karin, M. 2010. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*, 24(8), 2596-2611.
- Sondergaard, L. 1993. Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends Genet*, 9(6), 193.

- Spalding, K. L., Arner, E., Westermarck, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., . . . Arner, P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196), 783-787.
- Stenkula, K. G. ve Erlanson-Albertsson, C. 2018. Adipose cell size: importance in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 315(2), R284-R295.
- Stephenson, R. ve Metcalfe, N. H. 2013. *Drosophila melanogaster*: a fly through its history and current use. *J R Coll Physicians Edinb.*, 43(1), 70-75.
- Stolarczyk, E. 2017. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol*, 37, 35-40.
- Strackowski, M., Dzienis-Strackowska, S., Stepień, A., Kowalska, I., Szelachowska, M. ve Kinalska, I. 2002. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(10), 4602-4606.
- Sun, K., Kusminski, C. M. ve Scherer, P. E. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, 121(6), 2094-2101.
- Sykiotis, G. P. ve Papavassiliou, A. G. 2001. Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1: A Novel Target for the Reversal of Insulin Resistance. *Molecular Endocrinology* 15(11), 1864–1869.
- Talamillo, A., Sanchez, J., Cantera, R., Perez, C., Martin, D., Caminero, E. ve Barrio, R. 2008. Smt3 is required for *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Development*, 135(9), 1659-1668.
- Tanaka, M. 2020. Molecular mechanism of obesity-induced adipose tissue inflammation; the role of Mincle in adipose tissue fibrosis and ectopic lipid accumulation. *Endocrine Journal*, 67 (2), 107-111The Japan Endocrine Society.
- Tanaka, M., Itoh, M., Ogawa, Y. ve Suganami, T. 2018. Molecular mechanism of obesity-induced 'metabolic' tissue remodeling. *J Diabetes Investig*, 9(2), 256-261.
- Tanti, J. F. ve Jager, J. 2009. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*, 9(6), 753-762.
- Thummel, C. S. 2001. Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev Cell*, 1(4), 453-465.
- Toprak, U. 2020. The Role of Peptide Hormones in Insect Lipid Metabolism. *Front Physiol*, 11, 434.
- Trinh, I. ve Boulianne, G., L. 2013. Modeling Obesity and Its Associated Disorders in *Drosophila*. *Physiology*, 28(2): 117–124.
- Ugur, B., Chen, K. ve Bellen, H. J. 2016. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis Model Mech*, 9(3), 235-244.

- Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M. ve Hotamışlıgil, G. S. 1998. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology*, 139(12), 4832-4838.
- Valenza A., Bonfanti C., Pasini M. C. ve Bellosta P. 2018. Anthocyanins Function as Anti-Inflammatory Agents in a Drosophila Model for Adipose Tissue Macrophage Infiltration. *Biomed Res Int*, 6413172, 9 pages.
- van den Brink, W., van Bilsen, J., Salic, K., Hoevenaars, F. P. M., Verschuren, L., Kleemann, R., . . . Wopereis, S. 2019. Current and Future Nutritional Strategies to Modulate Inflammatory Dynamics in Metabolic Disorders. *Front Nutr*, 6, 129.
- Vega, G. L. 2001. Results of Expert Meetings: Obesity and Cardiovascular Disease. Obesity, the metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Am Heart J*, 142(6), 1108-1116.
- Vlisidou, I. ve Wood, W. 2015. Drosophila blood cells and their role in immune responses. *FEBS J*, 282(8), 1368-1382.
- Wang, M.C., Bohmann, D. ve Jasper, H. 2005. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121, 115–125.
- Warr, C. G., Shaw, K. H., Azim, A., Piper, M. D. W., ve Parsons, L. M. 2018. Using Mouse and Drosophila Models to Investigate the Mechanistic Links between Diet, Obesity, Type II Diabetes, and Cancer. *Int J Mol Sci.*, 19(12): 4110.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. ve Ferrante, A. W. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796-1808.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. ve Ferrante, A. W., Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112(12), 1796-1808.
- Wellen, K. E. ve Hotamışlıgil, G. S. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1785-1788.
- Wellen, K. E. ve Hotamışlıgil, G. S. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 115(5), 1111-1119.
- Wen, X., Zhang, B., Wu, B., Xiao, H., Li, Z., Li, R., . . . Li, T. 2022. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1), 298.
- WHO. 2021. Web sitesi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Wichterman, K. A., Chaudry, I. H., Baue, A. E. 1979. Studies of Peripheral Glucose Uptake During Sepsis. *Arch Surg*, 114(6):740-745.
- Wittert, G. ve Grossmann, M. 2022. Obesity, type 2 diabetes, and testosterone in ageing men. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 23, 1233-1242.
- Wolpert, L., Arias, A. M., Tickle, C., Wolpert, T. ve Crosland, C. 2015. Principles of Development. Oxford University Press.

- Wong, J. C., O'Neill, S., Beck, B. R., Forwood, M. R. ve Khoo, S. K. 2021. Comparison of obesity and metabolic syndrome prevalence using fat mass index, body mass index and percentage body fat. *PLoS One*, 16(1), e0245436.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., . . . Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112(12), 1821-1830.
- Yongmei Xi, Y. Z. 2015. Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 06(01).
- Yung, J. H. M. ve Giacca, A. 2020. Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Obesity and Type 2 Diabetes. *Cells*, 9(3).
- Zatterale, F., Longo, M., Naderi, J., Raciti, G. A., Desiderio, A., Miele, C. ve Beguinot, F. 2019. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol*, 10, 1607.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. ve Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432.
- Zhou, D., Huang, C., Lin, Z., Zhan, S., Kong, L., Fang, C. ve Li, J. 2014. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal*, 26(2), 192-197.
- Zick, Y. 2001. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol*, 11(11), 437-441.