



**İKİ FARKLI LİPİD METABOLİZMASI
İNDİKATÖRÜNE KCNQ GENİNİN YOK
EDİLMESİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gökhan BİLGİN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Fatih AKDEMİR

Doktora Tezi-2020

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

**İKİ FARKLI LİPİD METABOLİZMASI İNDİKATÖRÜNE
KCNQ GENİNİN YOK EDİLMESİNİN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gökhan BİLGİN

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Fatih AKDEMİR**

**ERZURUM
2020**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Metabolizma ve Hastalıkları	4
2.2. Transkripsiyon Faktörleri	8
2.2.1. SREBP (Sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler).....	11
2.2.2. ChREBP (Karbonhidrat Duyarlı Element Bağlayıcı Proteinler)	16
2.3. KCNQ.....	18
2.4. <i>Drosophila Melanogaster</i> Model Organizması	21
2.5. GAL4 - UAS sistemi.....	30
2.6. RNA interferansı (RNAi).....	32
3. MATERYAL VE METOT.....	34
3.1. Sineklerin Laboratuvar Ortamında Yetiştirilmeleri	34
3.2. Laboratuvar Çalışması için Gerekli Ekipman.....	35
3.3. Dişi Virgin (Bakire) Sinek Toplanması	37
3.4. <i>Drosophila Melanogaster</i> Çaprazlamaları.....	37
3.5. Kan Glikoz Ölçümü	39
3.6. Mikroskopik İnceleme	40

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi	41
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	53
EKLER	69
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	69
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	70
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	71

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatih Akdemir'e ve tezin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini esirgemediği değerli katkılarda bulunan tez komitesi ve sınav jürisindeki değerli hocalarıma en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, yoğun olduğum dönemler boyunca sabırla beni destekleyen eşime ve aileme teşekkür ederim.

Gökhan BİLGİN

ÖZET

İki Farklı Lipid Metabolizması İndikatörüne *KCNQ* Geninin Yok Edilmesinin

Etkisinin Araştırılması

Amaç: Hastalıkların yaygınlığı, çeşitliliği, etkilediği sistemler çok farklı olduğundan nedenler, sonuçlar açığa kavuşturulmuş ilişkilerin ne denli iç içe girmiş bir yapıda olduğu da ortaya çıkmaktadır. Örneğin hastalıklar nedenleri açısından bulaşıcı olan ve bulaşıcı olmayan hastalıklar (BOH'lar) diye ayrıldığında; etkilediği mekanizmalar bir noktada birleşerek benzeşmektedir. Aynı şekilde BOH'lar nedenleri açısından edinsel, doğuştan veya genetik nedenlerle oluşabilir. Bu çalışmada, gestasyonel diyabet, Uzun QT Sendromu gibi birçok metabolik ve nörolojik hastalıkla ilişkisi olduğu insan çalışmalarında gösterilen *KCNQ* gen ailesinin SREBP ve ChREBP gibi enerji metabolizması belirteçleri üzerine olan etkisinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Ayrıca organizmalarda *KCNQ* geni inaktif durumdayken kan şekeri seviyesi ölçülerek; *KCNQ* geninin glikoz metabolizmasına etkisini, dolayısıyla da diyabetle olan ilişkisinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda kullanılan *Drosophila melanogaster* model genetik organizmasında *KCNQ* geni RNAi yöntemi kullanılarak yok edilmiş, daha sonra da UAS-GAL4 sistemi kullanarak metabolik yolların belirteçleri olan SREBP ve ChREBP faktörlerinin durumu incelenmiştir. Ayrıca Tip2 diyabetle ilişkisi olduğu insan çalışmalarında bildirilen *KCNQ* geninin RNAi ile yağ dokusunda yok edildiğinde glikoz düzeylerine olan etkisine bakılması için kan şekeri ölçüm yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Organizmalarda *KCNQ* geni yok edildiğinde kan şekeri seviyelerinde anlamlı ölçüde artış olduğu ve *KCNQ* geninin ifadesinin engellenmesinin SREBP yolağında aktivasyonu azalttığı görüldü. Ayrıca *KCNQ* geni RNAi kullanılarak yok edildiği diğer bir çaprazlamada Sug-GAL4/UAS-GFP habercisinin fazla etkilenmediği gözlemlendi.

Sonuç: *KCNQ* geninin RNAi ile fonksiyonunun engellenmesi metabolizma parametrelerini etkilemektedir, hiperglisemiye sebep olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: CHREBP, Diyabet, *Drosophila*, *KCNQ* Gen ailesi, SREBP

ABSTRACT

Investigation of The Effect of Destruction of *KCNQ* Gene in Two Different Lipid Metabolism Indicators

Aim: Since the prevalence of diseases, their variety and the systems they affect are quite different, as the causes and results are revealed, how intertwined structures the relationships have is also revealed. For example, when diseases are divided into infectious and non-infectious diseases (NCDs) in terms of causes, the mechanisms they affect converge at one point and resemble each other. Likewise, NCDs can occur due to acquired, congenital or genetic reasons. In this study, it was aimed to measure the effect of *KCNQ* gene family, which is shown in human studies that it is associated with many metabolic and neurological diseases such as gestational diabetes and Long QT Syndrome, on energy metabolism indicators such as SREBP and ChREBP. Furthermore, it was aimed to reveal the impact of the *KCNQ* gene on glucose metabolism, and therefore its relationship with diabetes by measuring blood glucose level when *KCNQ* gene is in an inactive position in organisms.

Material and Method: *KCNQ* gene was destroyed in the model genetic organism *Drosophila melanogaster* used in the study by RNA method. Then, the status of SREBP and ChREBP factors, which are metabolic pathway indicators, were analyzed by using the UAS-GAL4 system. The method of blood glucose measurement was used to analyze the effect on the glucose levels when *KCNQ* gene, which is reported to be associated with Type2 diabetes in human studies, is destroyed in adipose tissue with RNA.

Results: It was observed that there was a meaningful increase in blood glucose level when the *KCNQ* gene was destroyed in organisms, and that there was a decrease in the activation of the SREBP pathway when the expression of the *KCNQ* gene was prevented. Also, it was observed that the runner of Sug-GAL4/UAS-GFP was not affected much in a crossover in which the *KCNQ* gene was destroyed by using RNA.

Conclusion: Prevention of the function of the *KCNQ* gene by RNA affects the metabolism parameters and causes hyperglycemia.

Key Words: CHREBP, Diabetes, *Drosophila*, *KCNQ* Gen family, SREBP

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BOH	:	Bulaşıcı Olmayan Hastalık
ChREBP	:	Karbonhidrata duyarlı element bağlayıcı protein
GFP	:	Yeşil Floresan Protein
GWAS	:	Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları
KCNQ	:	Voltaj Kapılı Potasyum Kanalları
LXR	:	Karaciğer X reseptörü
RNAi	:	RNA interferans
SREBP	:	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Proteinler
siRNA	:	Küçük müdahaleci RNA
UAS	:	Yukarı akış aktivasyon dizisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Küresel Tüm Ölümün ve Bulaşıcı Olmayan Hastalıklardan Ölümün Dağılımı (30-70 Yaş, 2012).	5
Şekil 2.2. Türkiye’deki Tüm Ölümün ve Bulaşıcı Olmayan Hastalıklardan Ölümün Dağılımı.	6
Şekil 2.3. Lipogenez Düzenlenmesi	9
Şekil 2.4. Lipojenik Enzim Gen Transkripsiyonu Düzenlenmesinde ChREBP ve SREBP Rollerini.	10
Şekil 2.5. Hepatik Lipogenezin Düzenlenmesi	11
Şekil 2.6. SREBP Yolağı.....	12
Şekil 2.7. SREBP’lerin Düzenlenmesi	14
Şekil 2.8. SREBP Yolağı.....	15
Şekil 2.9. Memelilerde ve Sineklerde SREBP Yolağının Geri Bildirim İnhibisyonu....	16
Şekil 2.10. ChREBP / Mondo-Mlx Şematik Gösterimi.....	17
Şekil 2.11. ChREBP Yolağı.	18
Şekil 2.12. <i>Drosophila</i> Yaşam Evreleri.....	22
Şekil 2.13. <i>Drosophila Melanogaster</i> ’ in Yaşam Döngüsü.....	23
Şekil 2.14. Larvada Metabolik Organlar	25
Şekil 2.15. <i>Drosophila Melanogaster</i> Yetişkin Sinek.....	25
Şekil 2.16. <i>Drosophila Melanogaster</i> ’de cinsiyetlerin fenotipik görünümü.....	28
Şekil 2.17. <i>Drosophila melanogaster</i> ’de kromozomal yapı.....	29
Şekil 2.18. <i>Drosophila Melanogaster</i> ’de GAL4/UAS Sistemi.	31
Şekil 2.19. SREBP-GAL4,UAS-GFP Habercisi	32
Şekil 2.20. RNA İnterferansı	32

Şekil 3.1. Sinekler İçin Kültür Tüpü.....	34
Şekil 3.2. Zeiss v12 Stereo Floresan Mikroskobu	36
Şekil 3.3. Monokromatik Plate Reader (BioTek Plate Reader).....	36
Şekil 3.4. Bayıltma Düzeneği	41
Şekil 4.1. Dcg-GAL4 Hattının UAS-GFP ve UAS-RFP (Nükleer) Hatlarıyla Çaprazlanması.....	42
Şekil 4.2. <i>KCNQ</i> Geninin Yağ Dokusunda RNAi ile Yok Edilerek Kan Şekerinin Ölçülmesi.	43
Şekil 4.3. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Ortalama Şeker Seviyesi Grafiği.....	44
Şekil 4.4. <i>KCNQ</i> Geninin RNAi ile Yok Edilmesinin SREBP Yolağına Etkisi	44
Şekil 4.5. <i>KCNQ</i> Geninin RNAi ile Yok Edilmesinin Sug-GAL4, UAS-GFP Habercisine Etkisi.	46
Şekil 4.6. <i>Ras</i> Onkojeninin, Sug-GAL4, UAS-GFP Habercisinin Ekspresyonuna Etkisi.	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 3.1. Çaprazlamada Kullanılan *Drosophila* Stokları..... 38

Tablo 4.1. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Ortalama Şeker Seviyesi..... 43



1. GİRİŞ

Metabolizma canlılığın devamı için gerekli yapım ve yıkım reaksiyonları olup, metabolizma işleyişi çeşitli kontrol mekanizmaları ile sağlanır. Karbonhidrat, lipit, protein metabolizması kontrol mekanizmalarında oluşacak problemler neticesinde farklı metabolitlerin birikimi olmakta ve bu durum kliniğe çeşitli hastalıklar olarak yansımaktadır. Günümüzde beslenme tutumlarının değişmesi, eğitim ve gelir düzeylerinin artması, koruyucu sağlık hizmetleri (aşılama gibi) ve toplum sağlığı açısından alınan tedbirlerin yaygınlaşması ile beklenen yaşam süresi artmıştır. Hastalıklar, bulaşıcı olan hastalıklar ve bulaşıcı olmayan hastalıklar (BOH'lar) olarak ikiye ayrılabilir. Toplumda yaşlı nüfusun artması, yaşlı nüfusta gözlenen BOH'ların toplumda gözlenen hastalıklar arasında artışına neden olmuştur.¹ Yine 2012 yılında meydana gelen ölümlerde kalp ve damar hastalıkları, kanser, kronik hava yolu hastalıkları gibi BOH'ların payı büyüktür. Bu ölümlerin üçte biri düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmüştür.² Ülkemiz geliştirmekte olan ülkelere benzer şekilde genç nüfusa sahiptir. Ülkemizde ölüm sebepleri bakımından gelişmiş toplumlardakine benzer şekilde BOH'lar önemli paya sahiptir. Bu durum kontrol altına alınmadığı takdirde, 10 yıl sonra BOH'lara bağlı olarak iş göremezlik ve ölüm oranlarının yüksek ölçüde seyredeceği düşünülmektedir. BOH'lar ülkemizin sağlık kaynaklarının önemli bir kısmını tüketmektedir.¹ Ölüm istatistiklerinde 30-70 yaş ölümlerin %87'si BOH kaynaklıdır, ülkemizde BOH kaynaklı erken ölüm (70 yaş altı) ihtimalinin %18 olması endişe vericidir.³ Ülkemizdeki tuz tüketim düzeyi Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) önerdiği düzeyin üç katı olmasının sonucu olarak toplumun yaklaşık dörtte birinde hipertansiyon görülmektedir.^{4, 5} Türkiye'de obezite, tütün tüketimi, tuz tüketimi gibi BOH risk faktörlerinin çok yüksek düzeylerde olmasından; BOH'ların sosyoekonomik yükünün daha da artacağı öngörülebilir. Benzer şekilde

Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da ⁶ ölümlerin en yaygın nedeni kalp-damar hastalıkları olup, bu hastalıklar ABD'de her yıl 860.000'den fazla insanın ölümüne neden olmaktadır. Yine ABD'de 80 milyon kişinin kalp-damar hastalıklardan mustarip olduğu tahmin edilmektedir. ⁷ Bu hastalıkların ilişkili olduğu diyabet, iltihaplanma, yüksek kolesterol, hipertansiyon, obezite, fiziksel hareketsizlik veya sigara içmek gibi durumlar da düşünülecek olursa etkileri daha büyük olmaktadır. Günümüzde hastalıkların tanı ve tedavisinde modern yaklaşımlarda büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Ancak yine de hastalıkların genetik nedenlerini anlama ve buna paralel bir şekilde tedavi yöntemleri geliştirme konusunda katedilmesi gereken çok mesafe vardır. Hal böyleyken olumsuz durumları önlemede alınacak tedbirler açısından BOH'lara sebep olan risklerin, nedenlerin metabolizmadaki karşılığının aydınlatılmasına dair her veri, ülke geleceğini planlama açısından da önem arz etmektedir.

Son yıllarda Moleküler Genetik alanındaki ilerlemeler sayesinde, hastalıklara neden olan mutasyonların tespitinin yapılabilmesiyle gene özgü tedavi gündem olmuştur. ⁸ Günümüzde *Drosophila Melanogaster*'in model organizma olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen çalışmalar Evölasyon, Moleküler Biyoloji, Popülasyon Genetiği, Genetik Toksikoloji, Nörobiyoloji gibi birçok alanda dikkat çeken gelişmelere imkân vermiştir. ⁹ *Drosophila*, nörodejenerasyon ve hatta nörotoksikoloji dâhil çok çeşitli hastalığın moleküler ve hücrel mekanizmalarını açığa çıkarmak ve ilişkili süreçlerin veya yolların genetik bileşenlerini taramak için sıklıkla kullanılmaktadır. ¹⁰⁻¹³ *Drosophila melanogaster*'de gen ifadeleri engellendiğinde, muhtemelen bu baskılama sonucunda metabolik aksaklıklar ve hatta hastalıklar oluşacaktır. Bu şekilde indüklenmiş bir organizma modeli üzerinde tedavi için hem var olan hem de iyileştirici etkisi olabileceği düşünülen yeni kimyasal ajanlar denenebilir. *KCNQ* geninin klinikte sık karşılaşılan diyabet ve kalp hastalıklarının yanı sıra selim ailesel yenidoğan konvulziyonları (BFNC),

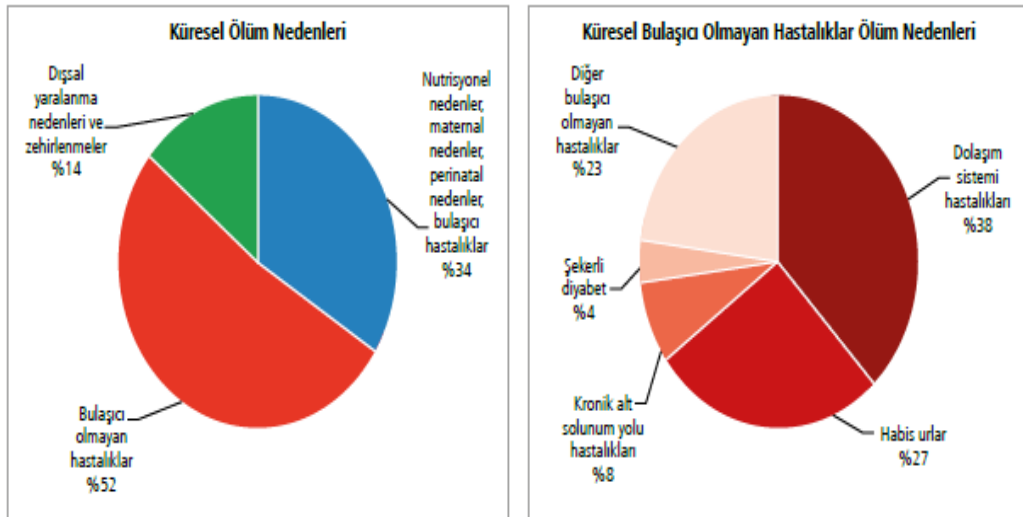
gestasyonel diyabet, Uzun QT Sendromu, Tip 2 Diyabet gibi birçok hastalıkla ilişkisi olduğu GWAS analizlerinde görülmektedir. *KCNQ* geni için sistematik bir şekilde genleri tek tek yok edip kan şekeri ve lipit metabolizmasına etkilerini bulmak için yapılması gereken genetik taramalara (fonksiyonel genomiks) literatürde rastlanmamıştır. Sistematik şekilde diyabetin; obezite, dislipidemi veya kalp hastalıkları gibi diyabetle ilişkili hastalıkların genetik belirleyicilerini keşfetmek için *in vivo* bir model sistem ideal olabilir. Böyle bir çalışma, ilgili hastalıkların patofizyolojilerine yeni bakış açıları ve tedavilerinde yeni potansiyel ilaç hedefleri sağlayabilir. Bu çalışmada *Drosophila melanogaster*'de geliştirilen bir *in vivo* model sistemi ile diyabete neden olduğu bilinen *KCNQ* geninin yağ dokuya özgü olarak susturulmasıyla, bu genin SREBP ve ChREBP'ye olan etkisinin gözlenmesi en temel amaçlardan birisidir. *Drosophila* aracılığıyla kurulan bu sistem zaman ve uygulanabilirlik açısından büyük avantaj sağlamıştır. Bu sistem aracılığıyla özellikle lipit ve karbonhidrat metabolizmasında, önemli rolleri olduğu gösterilen SREBP ve ChREBP belirteçleri üzerinden *KCNQ* geninin metabolizma ile ilişkisinin değerlendirilmesi, ayrıca *KCNQ* geni yok edildiği organizmalarda moleküler seviyede kan şekeri ölçülerek bu genin glikoz metabolizmasına etkisini, dolayısıyla diyabetle olan ilişkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metabolizma ve Hastalıkları

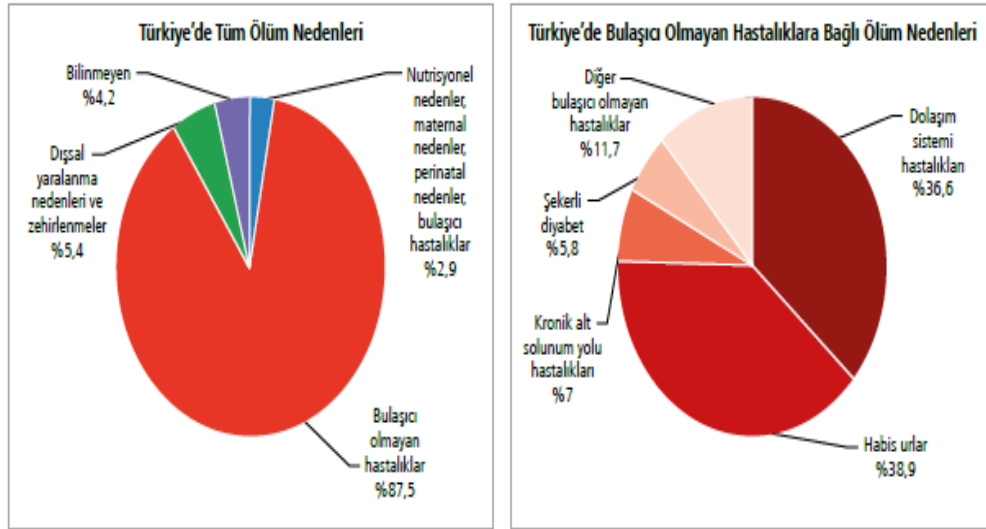
Metabolizma, en genel tarifiyle canlı yaşamının devamı için meydana gelen tüm kimyasal tepkimelerdir. Basitten karmaşığa tüm organizmalar, yaşamsal faaliyetlerin devamında gerekli organik moleküllerin sentezlenmesi için dışardan aldıkları maddeleri yapım ve yıkım reaksiyonlarında kullanırlar; bu reaksiyonlar sırasıyla anabolizma ve katabolizma olarak isimlendirilir. Bu süreçler organizmada sıkı kontrol altındadır. Kontrol mekanizmalarında veya metabolik yollarda oluşan aksaklıklar organizmada birçok ciddi probleme neden olabilir, hatta bu süreç organizmanın ölümüyle de sonuçlanabilir.¹⁴

Hastalıklar, bulaşıcı olanlar ve bulaşıcı olmayan hastalıklar (BOH) olarak ikiye ayrılabilir. Beslenme tutumlarının değişmesi, eğitim ve gelir düzeylerinin artması, koruyucu sağlık hizmetleri (aşılama gibi) ve toplum sağlığı açısından alınan tedbirlerin yaygınlaşması ile beklenen yaşam süresi artmıştır. Bu durum yaşlı nüfusun artmasına; dolayısıyla yaşlı nüfusta gözlenen BOH'ların da toplumda gözlenen hastalıklar arasında artışına neden olmuştur.¹⁵ 2012 yılında Dünya'da meydana gelen 56 milyon ölümün 38 milyonu kanser, kalp ve damar hastalıkları, kronik hava yolu hastalıkları gibi BOH'lara bağlı olarak gerçekleşmiştir. Bu ölümlerin 28 milyonu (üçte biri) düşük ve orta gelirli ülkelerde olmuştur. 2012'deki BOH'lara bağlı 38 milyon ölümden, % 40'tan fazlası 70 yaşın altındaki insanları etkilemiştir; 70 yaş altı erken ölümlerin çoğunun önlenabilir olduğunun da göz önüne alınması gerekir.² BOH'lara bağlı ölümlerin nedenleri arasında diyabet (% 4), kronik hava yolu hastalıkları (astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarının) (% 10.7), kanserler (% 21,7), kalp ve damar hastalıkları (% 46,2) yer alırken bu dört ana bulaşıcı olmayan hastalık, BOH'lara bağlı ölümlerin % 82'sinden sorumludur^{15, 16} (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Küresel Tüm Ölümelerin ve Bulaşıcı Olmayan Hastalıklardan Ölümelerin Dağılımı (30-70 Yaş, 2012).

Ülkemiz gelişmekte olan ülkelerdeki nüfusa benzer şekilde genç nüfus yapısındadır. Yine gelişmiş toplumlardaki gibi BOH'lar ölüm sebebi olarak ön plana çıkmaktadır. Ülkemizde günden güne yaşlı nüfusa sahip bireylerin artmasıyla BOH'ların da atması ve bu duruma bağlı olarak genel popülasyonda iş göremezlik ve ölüm oranlarının da yükselmesi beklenmektedir. BOH'ların ülke sağlık kaynaklarının önemli bir kısmını tükettiği de bilinmektedir.¹ Şekil 2.2'de görüldüğü üzere Türkiye'de 30-70 yaş ölümünün %87'si BOH kaynaklı olduğunu gösteren çalışmalarda BOH'lara bağlı erken ölüm (70 yaş altı) ihtimalinin %18 olması yani yaklaşık her beş yetişkinden birinin erken ölmekte olduğu verisi dikkat çekicidir^{17, 18} (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Türkiye'deki Tüm Ölüm Nedenleri ve Bulaıcı Olmayan Hastalıklardan Ölüm Nedenleri Dağılımı.

Ülkemizde günlük tuz tüketim düzeyi Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) önerdiği düzeyin üç katı olduğundan, toplumun yaklaşık dörtte birinde hipertansiyonun olduğu tahmin edilmektedir.⁴ Toplumumuzda tütün ürünlerinin kullanımının yüksek olması ve yetişkin bireylerdeki obezite problemi (%29) birçok hastalığın gelişiminde rol oynayan başka etmenlerdir.¹⁹ Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde giderek artan ve yaşam kalitesini bozan obezite, kardiyovasküler hastalıklar, tip 2 diyabet (T2DM) ve özellikle de hormona özgü kanserlerde anlamlı artışa neden olmaktadır. Yağ deposu olarak bilinen adipoz dokunun, enerji depo fonksiyonu yanında önemli bir metabolik ve endokrin organ olduğu da bilinmektedir. Adipozit serbest yağ asitlerini alıp; trigliserit şeklinde depolayarak lipid metabolizması üzerine katkının yanında, enerji gerektiğinde lipolize ek olarak endokrin, immün sistem, angiogenez ve hemostazda da etkili bir dokudur.²⁰ Özellikle diyabet bağlı dislipidemide, yüksek plazma trigliseriti ve kolesterolün uzun süreli dolaşımı, kardiyovasküler hastalık için risk faktörleridir.²¹ Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması II (TURDEP II) sonuçlarına göre, son 12 yılda diyabet sıklığı ciddi miktarda artarak %13.7'ye ulaşmıştır.²² Kronik hiperglisemi, nöropati, retinopati,

nefropati gelişimi, kardiyovasküler hastalıklar, mikrovasküler ve makrovasküler bozukluklar ve alt ekstremitte amputasyonları gibi komplikasyonlarıyla birçok sistemik bozukluğun oluşumunu tetikleyen Tip 2 Diabetes Mellitus, prevalansındaki çarpıcı artış nedeniyle ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Tip 2 diyabetin klinikteki zorluğu, hastalığın temelinde yatan çevresel ve genetik faktörlerin çeşitliliğinden ve bu faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Aday gen yaklaşımı ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) sonucunda Tip 2 diyabet ile ilişkili olarak tanımlanan yaklaşık 70 yatkınlık geni varlığı tespit edilmiştir.²³ 2009 yılında Avrupa kökenli bireylerde yapılan 10 GWAS'ın değerlendirildiği bir meta-analiz de yapılmıştır (toplam 36610 bireyde).²⁴ İlk GWA çalışmalarında Avrupa kökenli bireyler konu edilmiştir. Asya kökenli bireylerin hastalığa yatkınlık oluşturan gen ve varyantlarının popülasyon temelli ilişki analizlerinde Avrupa kökenli bireylere göre önemli derecede farklılık göstermesinden sonra, Tip 2 diyabetin yaygın olduğu Asya ülkelerinde de genom boyu ilişki analizlerinin yapılmasına başlanmıştır. Doğu Asyalılarda gerçekleştirilen ilk GWA çalışmasının raporunda yeni bir lokus, *KCNQ1* (potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 1), tip 2 diyabetle kuvvetle ilişkilendirilmiştir.²⁵ BOH'ların risk faktörleri ve birliktelik gösterdikleri hastalıklar da göz önüne alındığında, metabolik bozukluklar veya hastalıklar klinikte sık karşılaşılan tablolardır. Protein, karbonhidrat ve yağ asitlerinin sentezi ya da yıkımı veya aralarındaki dengenin bozulduğu metabolik hastalıklar, doğuştan olan ve genetik hastalıklar sonucu oluşan rahatsızlıklar da dâhil edildiğinde geniş bir alanı kapsamaktadır. Tek tek düşünüldüğünde nadir oldukları görülen metabolik hastalıklar, çok çeşitli sayıda metabolik hastalık olduğu göz önüne alındığında önemli bir hastalık grubunu oluştururlar.

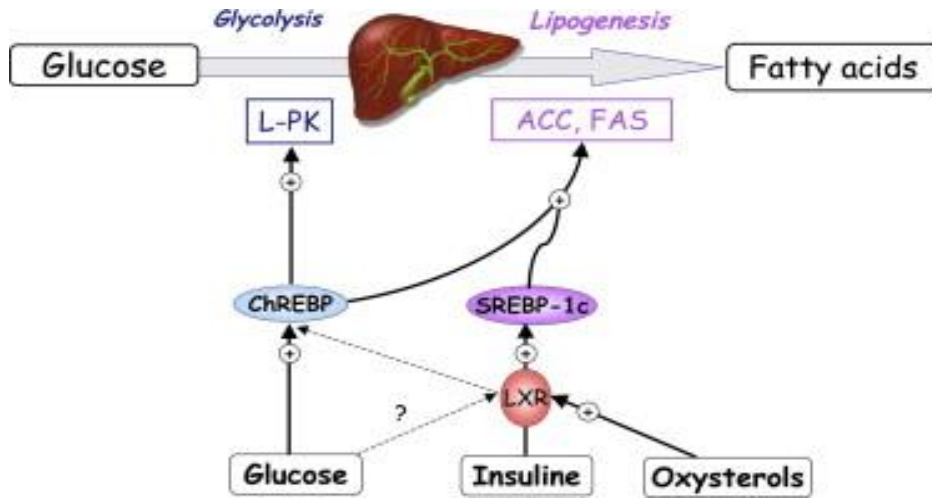
²⁶ Obezite, diyabet, osteoporoz, tiroid hastalıkları, dislipidemiler, hipertansiyon gibi sayılabilecek metabolik hastalıklar toplumda oldukça yaygındır. Bu hastalıklar

sonucunda diyaliz, vücut yaraları, ani kardiyak ölüm, sağırılık, körlük, erken yaşta tespit edilmezse zekâ gerilikleri gibi birçok sağlık problemiyle karşılaşmaktadır. Doğuştan veya edinsel süreçlerle gelişen bu hastalıklarda genetik ve dahi epigenetik faktörlerin rol oynadığını gösteren birçok çalışma literatürde mevcuttur. Kalıtsal metabolik hastalıkların büyük bir kısmı bir maddenin başka bir maddeye çevrilmesini kolaylaştıran enzimleri kodlayan tek gen hatalarından kaynaklanmaktadır. Metabolik bozuklukların çoğunda sorunlar, toksik maddelerin birikmesi ya da normal işlev için gerekli maddelerin sentezlenememesi sonucunda yeteneklerin azalmasıyla ortaya çıkmaktadır.²⁷⁻²⁹

2.2. Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri, DNA'nın belli bölgelerine bağlanıp gen ifadesinin düzenlenmesinde etkilidirler.³⁰ Bu faktörler gen ifadesinin düzenlenmesinde zaruri olduğundan her canlıda bulunur. Canlılardaki transkripsiyon faktörü sayısı veya çeşitliliği genomun büyüklüğü ve gelişmişlik düzeyiyle paraleldir.³¹ İnsan genomunda DNA'ya bağlanabilen yaklaşık 2600 protein bulunmaktadır; bu proteinlerin çoğunun transkripsiyon faktörü olduğu düşünülmektedir.³² Genelde genlerin iki tarafında birkaç farklı transkripsiyon faktörünün bağlanma yerleri bulunur ki bu genlerin düzgün ifadesi için birkaç transkripsiyon faktörünün birlikteliği gerekir. Yani insanın 2000 transkripsiyon faktörünün belirli alt kümesinin kombinasyonları insan genomundaki her genin, gelişim sırasındaki kendine has denetimini açıklamaya yeterlidir.³³ Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerindeki mutasyonların memeli evrimsel adaptasyonunda etkisi tartışılmalı bir konu olup Arbiza ve ark.³⁴ insan evriminde bağlayıcı bölge mutasyonunun önemli rolü olduğunu gösteren kanıtlar bulmuşlardır. Temel sarmal döngü sarmal proteinleri, neredeyse tüm ökaryotlarda bulunan dimer yapıda transkripsiyon faktörleridir. Bu faktörler hayvanlarda özellikle kalp gelişimi, miyogenez, nörogenez, hematopoez ve embriyonik gelişimde önemli düzenleyicilerdir³⁵

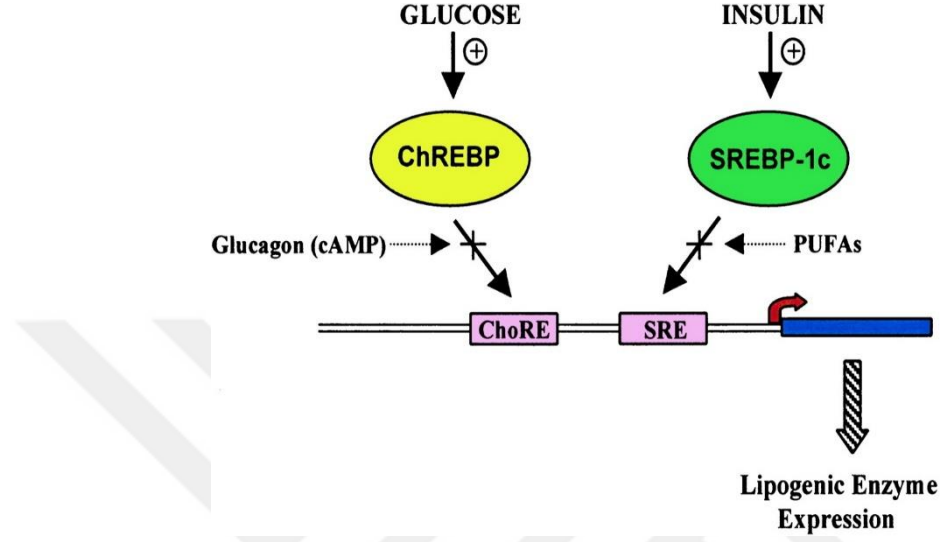
Transkripsiyon faktörlerinden olan karbonhidrata duyarlı element bağlayıcı protein (ChREBP) ve sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) , karaciğerde glikoz metabolizması ve lipid sentezinin iki temel düzenleyicisidir.³⁶ Memelilerde karbonhidrat (glikoliz ve glikojen) ve trigliserid sentezinin gerçekleştiği ana bölge olan karaciğerin metabolizmasının düzenlenmesi tüm vücut enerji dengesinde kilit rol oynar. Lipogenez, allosterik ve kovalent modifikasyonların aracılık ettiği, enzim aktivitelerinin akut kontrolü ile düzenlenir. Yine glikolitik ve lipojenik enzimlerin birçoğunun sentezi, özellikle glikozun önemli bir kaynak olduğu beslenme durumuna yanıt olarak düzenlenir. Bu yanıtta, glikolitik ve lipojenik enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi büyük rol oynar. Son yıllarda karaciğerde glikolitik ve lipojenik genlerin insülin ve glikoz tarafından transkripsiyonel düzenlenmesinin anlaşılmasını sağlayan gelişmeler olmuştur.³⁶ Öyle ki, hepatik lipogenezin ana düzenleyicisi insülinken, karaciğerde karbonhidrat ve lipid metabolizmasının koordineli düzenlenmesine glikozun da etkisi olduğuna dair kanıtlar vardır³⁷ (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Lipogenez Düzenlenmesi

Yağ asidi sentaz gibi çoğu lipojenik enzim geninin SREBP ve ChREBP bağlayan cevap elemanları (SRE ve ChoRE) vardır. Glikoz ve insülin varlığında lipojenik enzim

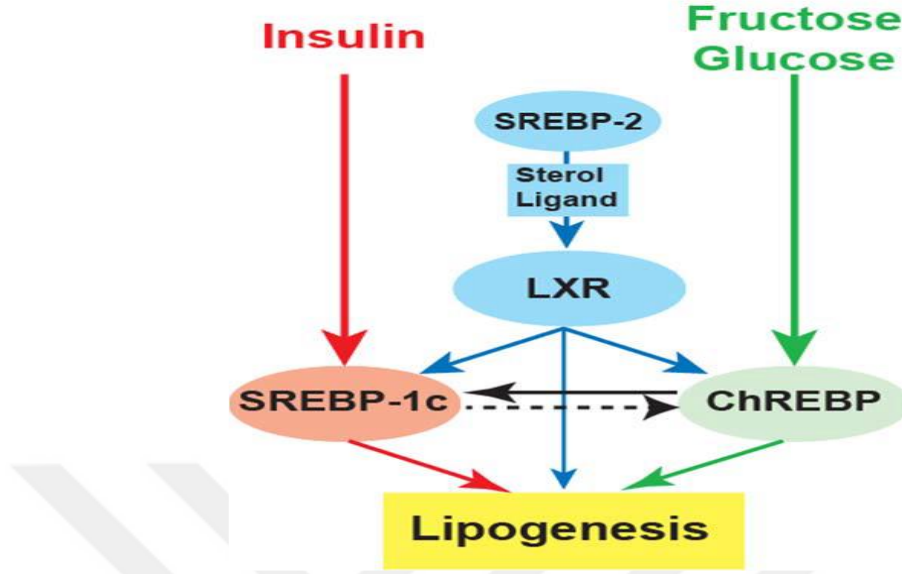
transkripsiyonunu indükleyen bu iki faktör sinerjik olarak çalışır (Şekil 2.4).³⁸ Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) ve kendi hücre içi aracı vasıtasıyla Glukagon, ChREBP ve SREBP'nin aktivitesini inhibe eder. Böylece, lipojenik enzim gen üretiminin çıktısı, birçok besin ve hormonal sinyale tümleşik hale gelir.



Şekil 2.4. Lipojenik Enzim Gen Transkripsiyonu Düzenlenmesinde ChREBP ve SREBP Rollerini.

Hepatik lipogenez düzenlenirken SREBP-1c, LXR ve ChREBP'nin uyumlu aktivitesi gerekir. İnsülin ve fruktoz / glikozun sinerjistik etkisi hepatik lipogenezi teşvik eder³⁹ (Şekil 2.5). İnsülin, SREBP-1c mRNA'nın transkripsiyonu ve aynı zamanda SREBP-1c proteininin proteolitik işlenmesini aktive eder. Fruktoz / glukoz ise ChREBP'yi birçok mekanizma ile etkinleştirir. İnsülinin aracılık ettiği SREBP-1c transkripsiyonunun aktive olması, LXR ve SREBP'lerin kendileri aracılığıyla etki eder. Temel olarak SREBP-1c mRNA'yı artırarak lipogenezi düzenleyen LXR, ayrıca ChREBP ve bazı lipojenik genlerin promoterlerini doğrudan aktive edebilir. SREBP-2, kolesterol biyosentezinin genlerini düzenler ve endojen sterol ligandlarının üretimini kontrol eder. Bu ligandlar LXR'nin SREBP1c, ChREBP ve lipojenik genlerin transkripsiyonunu aktive etmesi için gereklidir. Ayrıca ChREBP doğrudan SREBP-1c ifadesini düzenlerken; belirli koşullar altında SREBP-1c de ChREBP'yi düzenleyebilir.

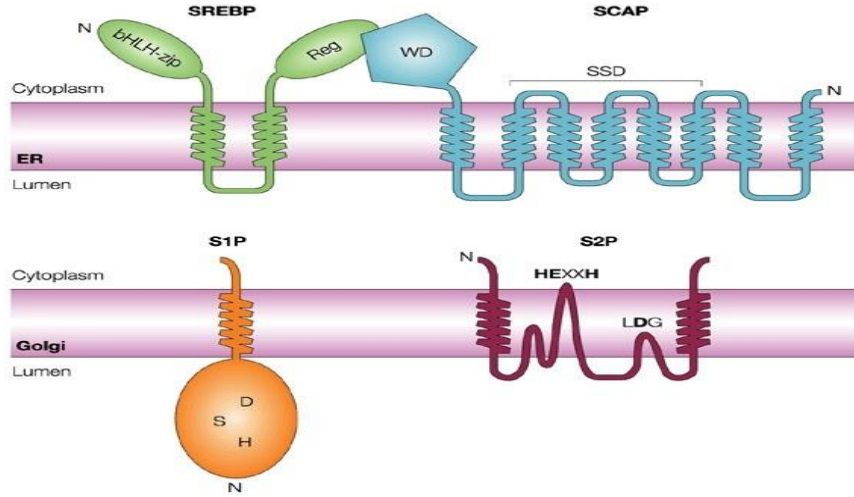
Öğün sonrası hepatik lipogenezin en yüksek düzeyde başlaması için LXR, ChREBP ve SREBP-1c hep birlikte gereklidir.³⁹



Şekil 2.5. Hepatik Lipogenezin Düzenlenmesi

2.2.1. SREBP (Sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler)

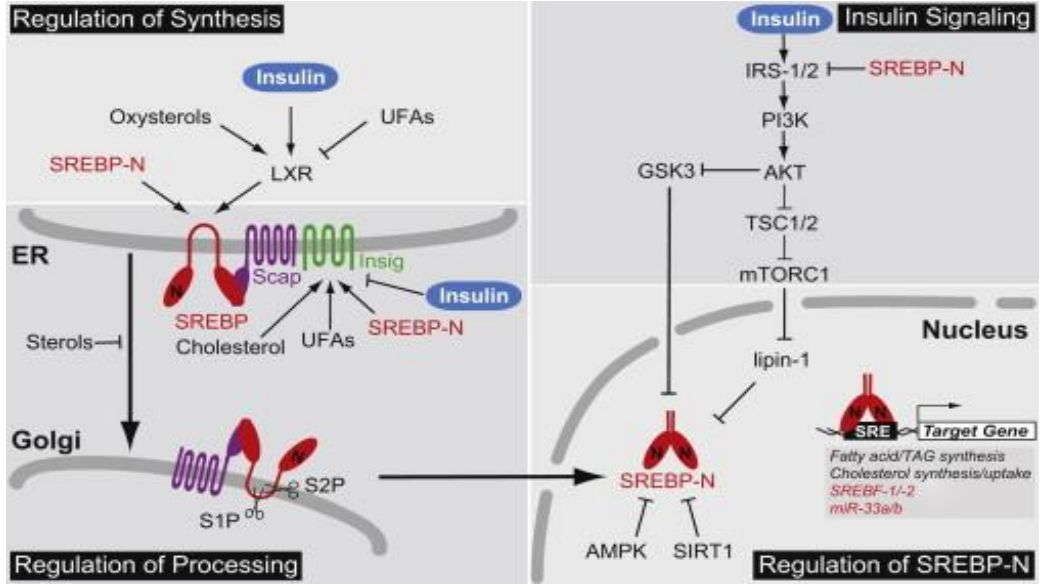
Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) transkripsiyon faktörleri, hücrede lipid metabolizmasını (kolesterol, yağ asitleri, trigliseritler sentezini kontrol ederek) düzenleyici rol oynarlar.⁴⁰ SREBP'ler membrana bağlı, temel sarmal halka-sarmal lösün fermuar (bHLH-LZ) transkripsiyon faktörleri (Şekil 2.6)⁴¹ olup bu rolleri yeni düzenleyici mekanizmaların ve yolların tanımlanması, transkripsiyonel hedeflerin belirlenmesi ve tip II diyabet, kanser, bağışıklık, nöroproteksiyon ve otofajide yeni işlevlerin keşfedilmesiyle gittikçe yaygınlaşmaktadır.⁴² Memelilerde SREBP-1a, SREBP-1c ve SREBP-2 olarak 3 adet SREBP izoformu tanımlanmıştır, bu izoformlar *SREBF1* ve *SREBF2* genlerince kodlanırlar. SREBP-1a, yağ asidi ve kolesterol sentezinde rol alırken SREBP-1c yağ asidi, SREBP-2 ise kolesterol sentezi ve alımını aktive eder.⁴⁰



Şekil 2.6. SREBP Yolağı

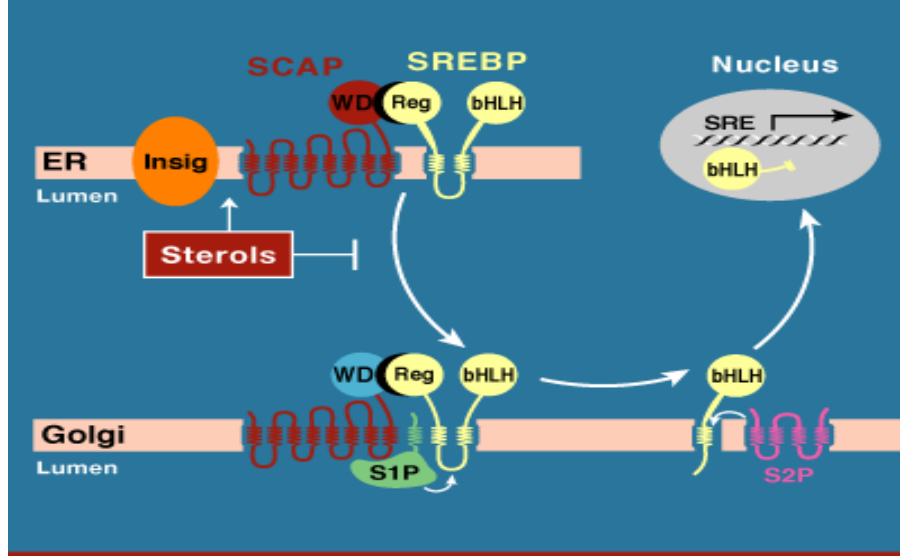
SREBP'ler, bHLH-LZ ailesindeki diğer transkripsiyon faktörlerinden farklı olarak inaktif öncüler olarak endoplazmik retikulum (ER) membranına yerleştirilir. Steroller, ER'den golgiye taşınmasını kontrol edip düzenlerler.⁴³ Golgiye yerleşik iki proteazın (Site-1 proteaz, S1P ve site-2 proteaz, S2P) aktiviteleri sonucu SREBP N-terminal bHLH-LZ transkripsiyon faktör alanı membrandan salınır (Şekil 2.7). SREBP klevaj aktive edici proteini (SCAP) SREBP'nin tüm izoformlarınca bağlanır ve ER'den Golgi'ye olan göçüne eşlik eder. Kolesterolün az olduğu hücrelerde, SREBP-SCAP kompleksi, S1P ve S2P'nin proteolitik aktivitesiyle membrandan ayrılarak SREBP N terminalini (SREBP-N) serbest bıraktığı COPII (coat protein kompleks 2) veziküller aracılığıyla Golgi aparatına ulaşır.⁴³ Çekirdeğe gelen SREBP-N, kolesterol biyosentezi ve alımında görevli genleri aktive ederek, sterol homeostazını sağlar. SREBP'ler transkripsiyonel olumlu geri bildirim ile kendi kendisini de düzenler. Ayrıca, *SREBF-1/2* transkripsiyonunun aktive olması ile *SREBF2 / SREBF1*'in intronlarında kodlanan mikroRNA'ların (*miR-33a / b*) ekspresyonu da artar ve bu genler, homeostazın sağlanmasına daha fazla yardımcı olmak için lipid ihracatını ve yağ asidi oksidasyonunu negatif olarak etkiler.⁴⁴ Aşırı ER kolesterolü, SCAP'i bağlayarak SCAP'in ER-yerleşik protein Insig'e bağlanmasını destekleyen konformasyonel bir değişikliğe yol açar, böylece SREBP-SCAP

kompleksinin ER çıkışını bloke eder ^{42, 45} (Şekil 2.7). Düzenleme, SREBP'nin sentezi, degradasyon, transkripsiyonel aktivite, proteolitik aktivasyon seviyelerinde olabilir. Birden fazla sinyal, Insig'in stabilitesini ve ekspresyonunu kontrol etmek suretiyle SREBP'lerin proteolitik aktivasyonunu ve ER'den Golgi'ye taşınmasını düzenler. İlaveten, nükleer SREBP'ler, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyonu da kapsayan translasyon sonrası modifikasyonla da yüksek oranda düzenlenir. Düzenleme olumsuz veya olumlu olabilir. (Şekildeki 2.7'deki kısaltmalar: Doymamış yağ asitleri (UFA'lar); SREBP'nin nükleer formu (SREBP-N); triaçilgliserid (TAG).) Aşırı kolesterollü koşullarda 25-hidroksikolesterol gibi kolesterolün oksisterol türevleri birikir ve bağımsız olarak Insig'e bağlanması SREBP-SCAP'ın ER tutulmasını sağlar. ⁴³ *INSIG1* ve *INSIG2* genleri Insig proteinlerini kodlarken SREBP taşınmasının doku ve sinyale özgü düzenlemesini kontrol eder. Insig-2den farklı olarak Insig-1, proteazoma bağlı bozunurken kolesterolün, Insig-1'i kararlı hale getirmesi SREBP'nin ER'den Golgi'ye taşınmasını inhibe eder. ⁴⁰ Ayrıca *INSIG1* doğrudan bir SREBP hedef geni olduğundan SREBP aktivasyonu, hem kolesterol seviyelerini hem de Insig-1 proteinini artırır böylece SREBP-SCAP taşınmasının ve proteolitik aktivasyonunun negatif geri besleme, yakınsak düzenlemesini sağlar. Oksisteroller de yağ asidi sentezini uyaran SREBP-1c'nin transkripsiyonunu uyarır; bunu nükleer hormon reseptörü karaciğer X reseptörünün (LXR) *SREBF1* promotörüne doğrudan bağlanmasıyla yapar. ⁴⁰



Şekil 2.7. SREBP'lerin Düzenlenmesi

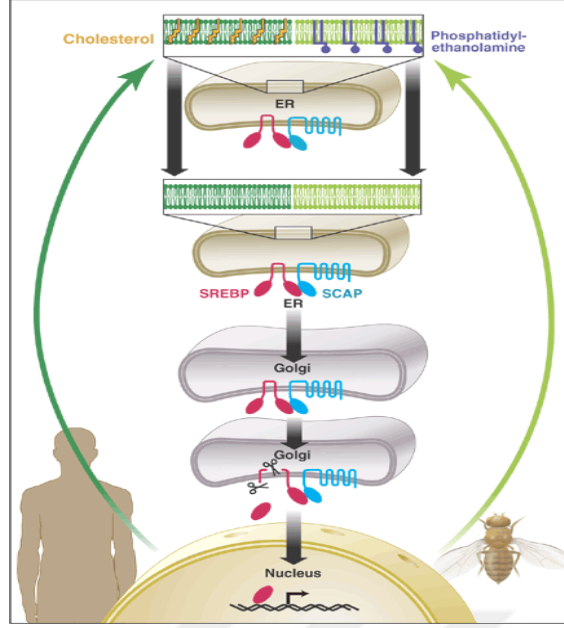
Hayvan hücrelerinde lipid homeostazı, transkripsiyonun son ürün geri bildirim düzenlemesiyle koordine edilir ⁴⁶ (Şekil 2.8). SREBP'nin, ER'den Golgi'ye hareketine eşlik eden SCAP ile oluşturduğu kompleks, sterollerin hem varlığında hem de yokluğunda stabil bir yapıdadır. SREBP'yi ER'den Golgi'ye taşımak için, SCAP'ın sterol algılama alanı, hücresel lipid yükünden gelen sinyalleri dönüştürmede gereklidir. ⁴⁰ SREBP'ler (sterol düzenleyici eleman bağlayıcı proteinler), hayvan hücrelerinde lipid sentezini ayarlayan zara bağlı kopyalama faktörleri olup transkripsiyonel olarak aktif uç amino terminalidir. Bu uç, S1P ve S2P'nin aracılık ettiği iki sıralı proteolitik aşamadan sonra membrandan salınır. Lipidler ER'deki öncünün golgideki proteazlar olan S1P ve S2P ye ulaşmasını düzenleyerek aktif SREBP'nin salınmasını da kontrol eder. ⁴¹



Şekil 2.8. SREBP Yolağı

SCAP-SREBP hareketinin sterol aracılı düzenlenmesi için iki protein, Insig-1 ve Insig-2 gereklidir. SCAP sterol algılama alanındaki nokta mutasyonlar, sterol aracılı düzenlemeyi bozar ve SCAP ile Insig-1 veya Insig-2 arasındaki etkileşimi bloke eder. Ayrıca Insig-1, stabilitesini düzenlemek için kolesterol biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimi olan HMG CoA redüktazın sterol algılama alanıyla etkileşir.

Böcekler, Insig proteinleri hariç SREBP yolağının bilinen tüm bileşenlerine sahiptir (Şekil 2.9).⁴⁷ Şekilde endoplazmik retikulumun (ER) zarlarından turuncu renkle gösterilen kolesterol veya mor ile gösterilen fosfatidiletanolaminin tükenmesi, mavi ile gösterilen SCAP ve kırmızı ile gösterilen SREBP'nin oluşturduğu kompleksin Golgi aparatına hareketine izin verir. Golgide makas ile gösterilen iki proteaz transkripsiyonel olarak aktif bir SREBP fragmanının salınmasına neden olur ki bu parça çekirdeğe girebilir ve lipid sentezinde yer alan genlerin ifadesini açar.⁴⁷



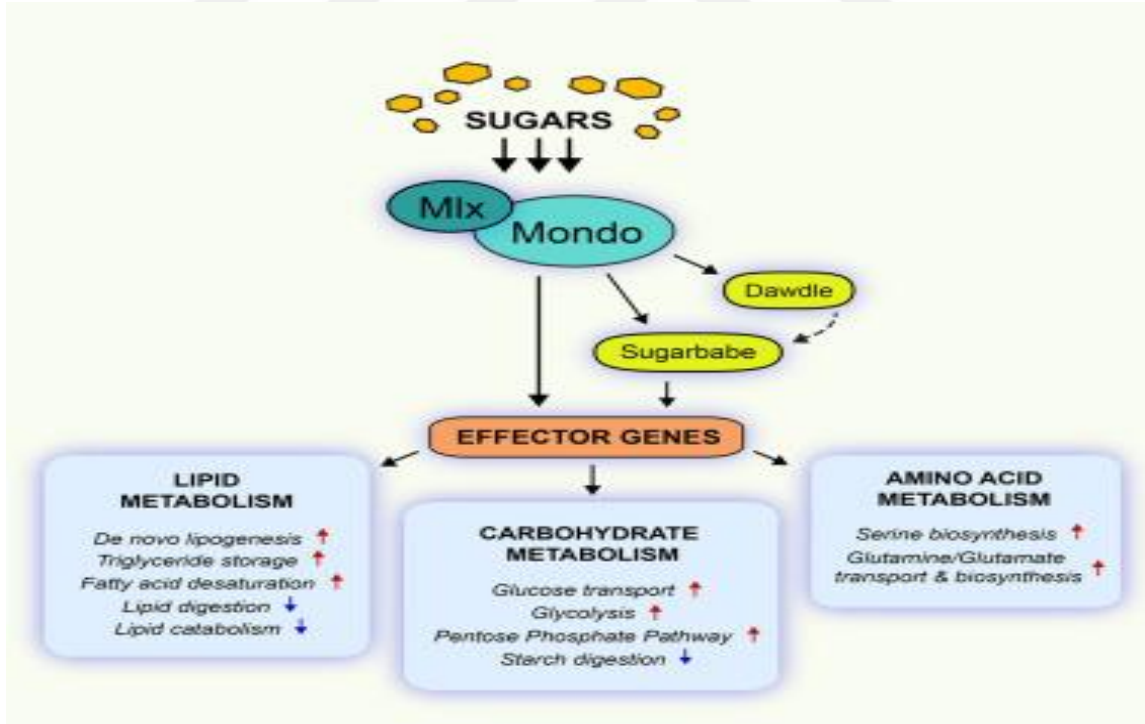
Şekil 2.9. Memelilerde ve Sineklerde SREBP Yolağının Geri Bildirim İnhibisyonu.

Böceklerde SREBP işlenirken, fosfatidiletanolamin, steroller yerine düzenlemede kullanılır. Birbirinden farklı iki lipidin SREBP işlemesi üzerindeki baskılayıcı etkisi, SCAP'nin lipidlerle klasik bir reseptör-ligand tarzı etkileşime girmek yerine zarın fiziksel özelliklerini algılayabileceğini göstermektedir.⁴¹

2.2.2. ChREBP (Karbonhidrat Duyarlı Element Bağlayıcı Proteinler)

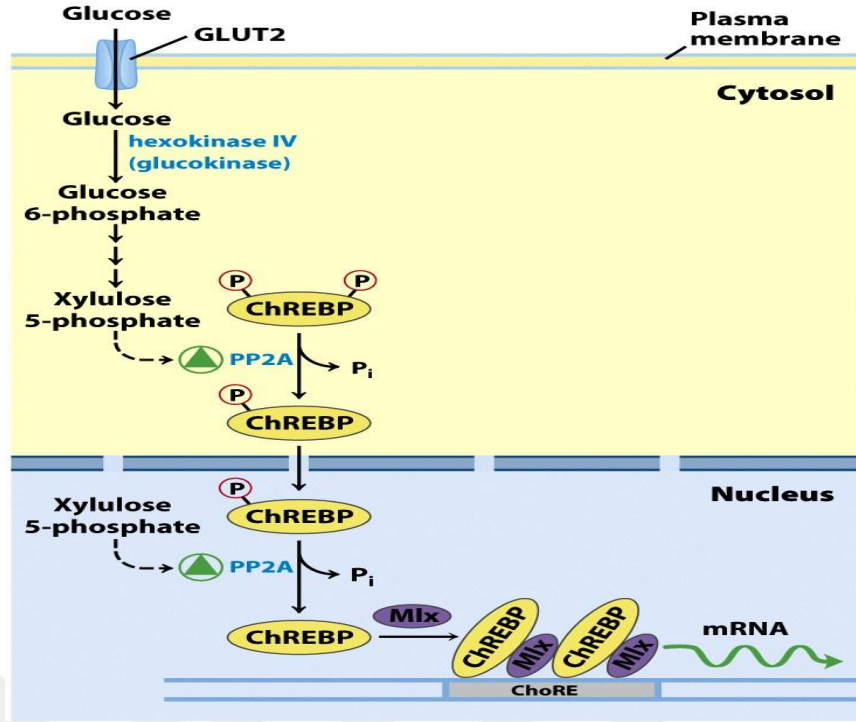
Bilinen diğer adlarıyla *Mio*, *MLX interactor*, ChREBP veya *Mondo*, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında rol alan temel sarmal döngü-sarmal-lösin fermuar transkripsiyon faktörünü kodlar. MLX olarak da bilinen *Bigmax* tarafından kodlanan bağlanma ortağıyla birlikte, şekere bağlı gen ekspresyonunu ve dahi lipogeneze yer alan genlerin aktivasyonunu kontrol eder. *Mondo* geni mutant olanlar diyetteki şekerlerini tolere edemezler ve bozulmuş kas fonksiyonları olur.⁴⁸ Aynı şekilde temel sarmal döngü-sarmal-lösin fermuar transkripsiyon faktörünü kodlayan MLX olarak da bilinen *Bigmax* ürünü, şekere bağlı gen düzenlemesinde yer alırken pentoz fosfat yolu glikoliz, *de novo* lipogenez de dâhil birçok metabolik yolun transkripsiyonel kontrolünde etkilidir. Aynı şekilde fonksiyonunun kaybında diyetle şekere intolerans oluşur.⁴⁹ ChREBP /

Mondo-Mlx transkripsiyon faktörleri şekerlerce aktive edilirler. Şekeri tolere edebilmek için gereklidir. Şekerlerin lipitlere dönüşmesini teşvik ederler. *Drosophila*'da Mondo-Mlx'in, şekerle düzenlenmiş genlerin çoğunu ki bunlara besin sindirimi ve taşınmasının yanı sıra karbonhidrat, amino asit ve lipid metabolizmasında yer alan genler de dâhil, kontrol ettiği gösterilmiştir^{50, 51} (Şekil 2.10). Dahası, *Mondo-Mlx* hedeflerinin insandaki ortologları, dolaşımdaki trigliseritlerle ilişkili gen varyantları arasında zenginlik gösterir. Mondo-Mlx metabolik genleri doğrudan düzenleyebildiği gibi, Gli-benzeri transkripsiyon faktörü Sugarbabe ve Aktivin ligandı Dawdle dâhil olmak üzere aşağı akış efektörleri aracılığıyla da metabolik homeostazı korur. *Sugarbabe*, yağ asidi desatürasyonu ve *de novo* lipogenezini içeren Mondo-Mlx'e bağlı işlemlerin bir alt kümesini kontrol eder. Kısacası Mondo-Mlx, yüksek şekerli bir diyet adaptasyonunda çalışan diğer şekere duyarlı yolların ana düzenleyicisidir⁵⁰⁻⁵² (Şekil 2.11).



Şekil 2.10. ChREBP / Mondo-Mlx Şematik Gösterimi

Sugarbabe geni ifadesinin, glikoz metabolizması tarafından düzenlenen ChREBP tarafından kontrol edildiği bilinmektedir.³⁶



Şekil 2.11. ChREBP Yolağı.

2.3. KCNQ

Voltaj kapılı potasyum kanalları (VKPK'ler) potasyuma özgü olup hücre zarındaki voltaj değişiklikleriyle aktive olurlar. Aksiyon potansiyelinde, VKPK'ler depolarize hücreyi dinlenme durumuna getirmede önemli görev üstlenirler. Yapılarındaki alfa alt birimleri gerçek iletkenlik için gözenek oluştururken, beta alt birimleri alfa alt birimleriyle ilişkide olup bunları düzenleyen yardımcı proteinlerdir.⁵³ Potasyum kanalları, iyon kanalı ailesindeki en çeşitli gruptur.⁵⁴ Her iki birim de hidrofobik transmembran çekirdekler açısından birkaç alt ailede sınıflandırılabilir.⁵⁵ Aksiyon potansiyelini şekillendirmede ve nöronal uyarılabilirlik ve esneklikte önemlidirler.⁵⁶ İnsanlarda bulunan 70'in üzerinde potasyum kanalı geninin sadece bir kısmı hastalıkla bağlantılıdır ki potasyum kanallarının KCNQ ailesi bu anlamda istisnaidir. Beş KCNQ geninin dördündeki mutasyonlarda sağırılık, kardiyak aritmiler ve epilepsi gibi olmak üzere hastalıklar gözlenir. Bu durumlar KCNQ kanallarının farklı fizyolojik fonksiyonlarını gösterir.⁵⁷ KCNQ kanalları insülin sekresyonu⁵⁸, kalp frekansı⁵⁹, düz

kası kasılması ⁶⁰ nörotransmitter salınımı ⁶¹, epitel elektrolit taşınması ⁶² ve nöronal uyarılabilirlik ⁶³ gibi fonksiyonlarda görev alılar. *KCNQ* genlerinin akciğer, beyin, pankreas, kalp, kulakta ve plasenta ifade edildiği gösterilmiş, vücutta yaygın olarak dağılmıştır. Örnek olarak repolarizasyon voltaj kapılı potasyum kanallarından ikr (eag, *KCNH2*) ve iks (kvLQT1, *KCNQ1*)'nin mutasyonları *Drosophila* ve omurgalılarda uzun QT sendromuna neden olduğu görülmüştür ^{64, 65} ve *Drosophila*' da ilk tanımlanan K⁺ kanalıdır.⁶⁶ Asyalılarda gerçekleştirilen ilk GWA çalışmasının raporunda yeni bir lokus, *KCNQ1* (potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 1), tip 2 diyabetle kuvvetle ilişkilendirildiği belirtilmiştir.²⁵

KQT benzeri kanallar olarak da bilinen *KCNQ* genleri tarafından, Kv7 potasyum kanal ailesinin üyeleri olarak kodlanır. K v 7.1 (*KCNQ1*) - KvLQT1, K v 7.2 (*KCNQ2*), K v 7.3 (*KCNQ3*), K v 7.4 (*KCNQ4*) ve K v 7.5(*KCNQ5*) olmak üzere beş üye tarif edilmiş olan *KCNQ* kanallarının dördü (*KCNQ2-5*) sinir sisteminde gözlenir. Bunlar önceleri 'M kanalı' olarak adlandırılan bir düşük eşikli voltaj geçişli K⁺ kanalı grubunu oluştururlar.⁶⁷ *KCNQ* kanalları, kalpte ise K⁺ akımlarını yeniden polarize ederken; sinirlerde muskarinik akımlardan sorumludurlar. ⁶⁸ Bunlar toksin bağlama özelliklerinin, kanal iletkenliğinin, voltaja bağlı geçit mekanizmasının çeşitliliğine sadece küçük amino asit değişiklikleri ile sahip olurken temelde oldukça benzer proteinlerdir. K⁺ kanalı aktivasyonu düzenleme türlerine göre değişen farklı sinyaller ve koşullar tarafından gerçekleşebilir. Örneğin bazıları hiperpolarizasyona veya hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda bir artışa veya plazma membranının depolarizasyonuna yanıt olarak açılırken, diğerleri hücre içi kinazlar ile birlikte bir vericinin bağlanmasıyla veya GTP bağlayıcı proteinler veya diğer ikinci haberciler tarafından düzenlenebilir. ⁶⁹ Ökaryotik hücrelerde, K⁺ kanalları kalp ritminin üretilmesinde ve nöral sinyalleme görevliyken; G protein-bağlı reseptörleri (GPCR'ler) içeren sinyal iletim yollarında görev yaparken

sitotoksik T lenfositlerce hedef hücre lizisinde rol alırlar.⁷⁰ Prokaryotik hücrelerde ise iyonik homeostazın sağlanmasında görev alırlar.⁷¹

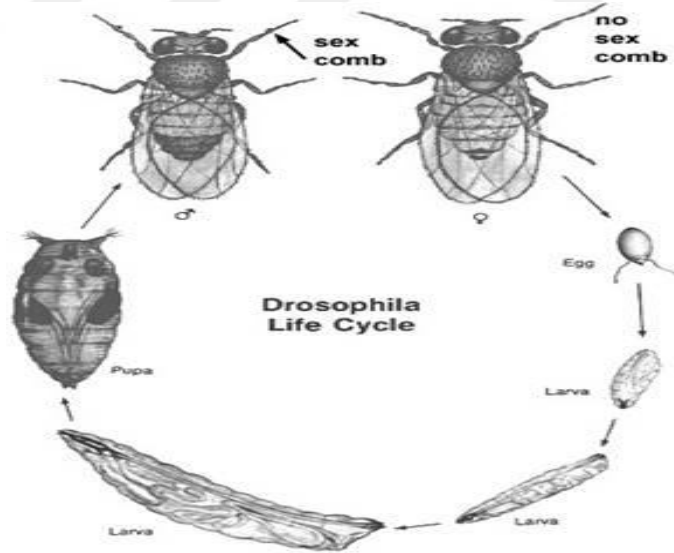
KCNQ (Kv7) *Drosophila*'da embriyonik gelişim ve kalp için zorunlu bir kanal olduğundan genindeki mutasyonları fibrilasyon ve ciddi aritmi ile seyretmiştir. ⁶⁴ *Drosophila* 'da Shaker akımından başka K akımlarının var olduğu ^{72, 73} gösterildikten sonra gen içinde silme işlemi sonrasında sineklerde hala bu genin kodladığına benzer K akımları görülünce uygulanan tekniklerle *Shab*, *Shaw* ve *Shal* olarak adlandırılan üç gen daha gösterilmiştir. ^{74, 75}. Bunlardan Shab kanalları nöron ve kaslardaki akımlarda görülür. ⁷⁶⁻⁷⁹ Aksiyon potansiyelinin düzenlenmesi ⁸⁰, sinaptik ileti ⁸¹, kalp kasılması ⁸² gibi birçok olayda karşımıza çıkarken kardiyomiyositler ⁸³, plasenta ⁸⁴, retina ⁸⁵, pankreas P-hücrelerin ⁸⁶, iskelet kasları ⁸⁷, vasküler düz kaslar ⁸⁸ Kv2 kanallarının bulunduğu yerlerdir. İlk defa *Drosophila*' da bulunan Shaw geni kanalları embriyonun son aşmasında sinir sistemi boyunca ifade edilir; beraberindeki Shawl kanalları ise merkezi sinir sistemi alt birimlerinin gelişimi sırasında uyarılmaz hücre tiplerinde bulunur. ⁸⁹ Sinir sisteminde Shaw kanallarının aşırı uyarılması vücut kütlelerinde azalma, eter kaynaklı sallama (ether-induced shaking) ve ölümle sonuçlanırken aynı kanalların sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde de rolü olduğu görülmüştür. ^{89, 90} *Drosophila* ' da Shal (Kv4) kanalları, sinirlerde A tipi K⁺ akımını iletmekte görev alırken ^{74, 91, 92} özellikle nöronal aksonlar yerine hücre ve dentritlerde bulunmuştur.⁹³ Shaker ve shal kanalları biyofiziksel özellikleri ve ifadelerinin topolojisinde de farklılık göstermektedir. Memelilerde Shal ailesinin Kv4.1, Kv4.2 ve Kv4.3 tipleri bulunur. Kv4.2 kanal mutasyonları temporal lob epilepsisiyle ilişkilidir. ⁹⁴ İnsan kalbinde Kv4.3 kanalı, dışa doğru Ito potasyum akımının önemli bir parçasıdır. ^{83, 95} Kv4.3 kanallarının ifadesi, kalp hastalıklarında kalıtsal ve edinsel kardiyak patojenleri de değiştirmiştir. ⁹⁶⁻⁹⁸ Kv4.3 mRNA ve protein seviyeleri, kalıcı ve paroksizmal atriyal fibrilasyonda azalmaktadır. ⁹⁹

2.4. *Drosophila Melanogaster* Model Organizması

Drosophila melanogaster sineği Diptera takımındandır; yaşamı süresince tam başkalaşım geçirir. Bir asırdan fazla bir süre önce halk arasında meyve/sirke sineği olarak da bilinen *Drosophila melanogaster* omurgasız bir hayvan modeli olarak klasik genetik alanında kullanılmaya başlanmıştır. *Drosophila*, insanın olduğu her yerde takipçisi olmuş, laboratuvarlarda bakımının kolay olması, elde edilebilmesi ve öğrenciler için ucuz bir model olmasından laboratuvarlarda tutulmuştur.¹⁰⁰ Birçok laboratuvar da araştırmalarda meyve sineği kullanılmaya başlanmış; Thomas Hunt Morgan ile öğrencileri Sturtevant ve Bridges sineklerle çalışmış ve bir asır önce ufuk açıcı keşifler yapmışlardır. Morgan ve ekibi, Mendel kalıtımının mekanizmasını kavramak ve bağlantı haritasını oluşturma amacıyla bu canlıyı kullanmışlardır. Morgan'ın çalışmalarıyla 1909 yılından beri genetik çalışmalarda kullanılmakta olan *Drosophila melanogaster* ile çalışmak evülasyon ve popülasyon genetiği, moleküler biyoloji, nörobiyoloji ve davranış gibi alanlarda büyük gelişmelere imkân tanımıştır.¹⁰⁰

Drosophila melanogaster, temel genetik olayları gözlemleyebilmek için oldukça uygun bir organizmadır. Ayrıca popülasyon genetikçileri seleksiyon deneyleri ve evrimsel çalışmalarında *Drosophila Melanogaster*'i kullanmaktadırlar. Kromozom yapısını ve şeklini, karyotipi çalışırken sitogenetikçiler için kullanışlı bir organizma olduğu görülmüştür. *Drosophila Melanogaster*, gelişimin moleküler temelini anlaşılmada kullanılan ilk ökaryotik organizmalardan bir tanesidir. Bu organizmanın genetik çalışmalarda kullanılmasında laboratuvar ortamında yetiştirilmelerinin ekonomik ve kolay olması, boyutlarının uygun olmasından dolayı yer kaplamaması tercih sebepleri arasında önde gelen nedenlerdir.¹⁰⁰ Jenerasyonlar arası süreler kısadır, bir sineğin erginleşip çok miktarda yavru oluşturmaları için 25°C'de 10 gün gibi bir süre yeterlidir.⁹ *Drosophila*, günümüzde hastalık mekanizmalarını kapsayan hücresel ve moleküler

mekanizmalarını açığa çıkarmak ve hastalıklarla ilişkili süreç veya yolların genetik bileşenlerini taramak için nörodejenerasyon ve hatta nörotoksikolojide de sıklıkla kullanılmaktadır.^{10, 12, 13} Laboratuvarlarda kolayca kültürlenebilen meyve sineği, yaşam döngülerinin kısa olması ve birçok yavru vermesi, insanlardaki hastalıklarla ilişkili birçok ortolog geninin olması, yoğun bir genomu sahip olmaları, genetik olarak manipüle etmenin kolay olması gibi niteliklere sahip olduğundan dünya üzerinde birçok laboratuvarlarda çalışılan güçlü bir model organizma olmuştur.⁹ *Drosophila melanogaster* sineklerinde döllenme ve zigot oluşumu dâhil embriyonik, larva, pupa ve yetişkin yaşamının tüm evreleri süre bakımından ortam sıcaklığına bağımlı olup en iyi büyüme sıcaklığı olan 25°C’de ortalama 10 gün içinde yetişkin olurlar.¹⁰¹ (Şekil 2.12). Şekilde sırasıyla Embriyonik gelişim (24 saat), Birinci larva evresi (L1) (24 saat), İkinci larva evresi (L2) (24 saat), Üçüncü larva evresi (L3) (72 saat), Pupa (96-120 saat), Yetişkin (960-1200 saat) görülmektedir.

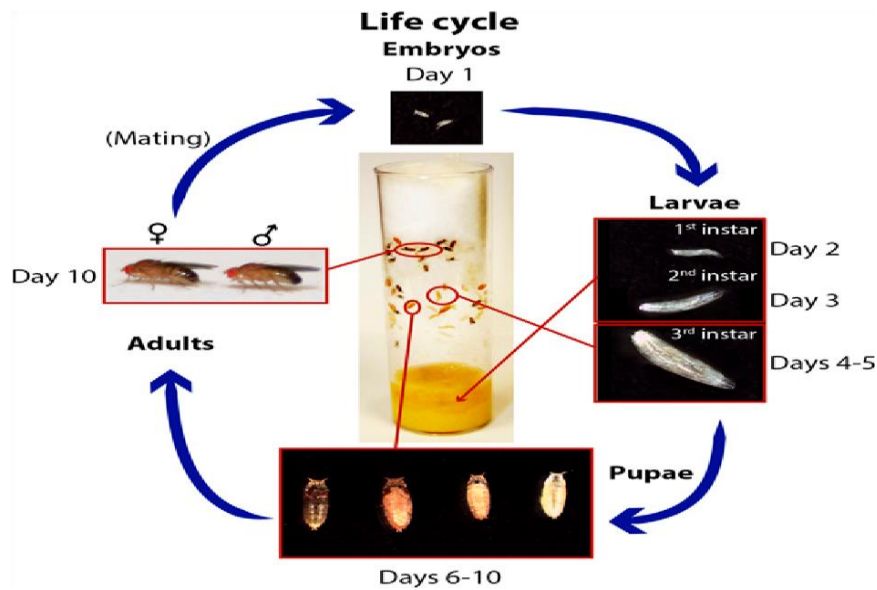


Şekil 2.12. *Drosophila* Yaşam Evreleri.

Şekil 2.13’te görüldüğü üzere *Drosophila melanogaster* sinekleri dibinde yiyeceğin olduğu ve ağız kısmının pamuk ile kapatıldığı viollerin içerisinde

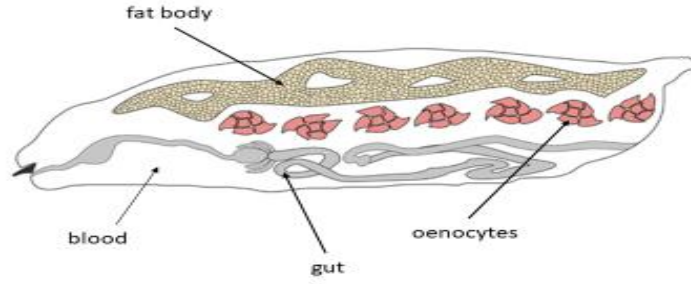
yetiştirilmektedir. Sineklerin 25°C’de tutulduğunda 9-10 günde tamamlanan metamorfoz sürecini görebileceğimiz violün resmini görmekteyiz. Embriyolar 1. günün sonunda yumurtadan çıktıktan sonra 4 gününü larva olarak besin içerisinde geçirir. 5. gün civarında, violün cidarında pupa oluşturmak üzere besin dışına çıkacak olan 3. instar larva aşamasını geçer. 5-9 günler arasında, metamorfoz oluşurken, pupa döneminde kararan kanatlar olgunlaşmanın neredeyse tamamlandığını anlatır. Yetişkin sinekler 9-10 günlerde pupadan çıkarlar⁹ (Şekil 2.13).

Erkekler pupa döngüsünden sonraki birkaç saatte fertil ve olgun duruma gelirler. Dişiler bu olgunluğa 6-12 saat arasında değişen sürelerde geldikten sonra olgun dişi birden fazla erkek sinek ile birçok defa eşleşebilir. Spermiler dişilerce karın bölgesinde depo edildikten kısa bir sürede yumurtaları dölemek üzere kullanılır. 25°C’de *Drosophila* dişileri ortalama 26 gün, erkekleri ise 32 güne kadar yaşayabilmelerine rağmen sineklerin kullanılması için en uygun süre başlangıçtan itibaren 20 gündür. Çaprazlamalarda yaşlandıkça fertiliteleri azaldığından 10 günden büyük olmayan genç dişiler tercih edilir.^{102, 103}



Şekil 2.13. *Drosophila Melanogaster*’ in Yaşam Döngüsü.

Erişkin bireyin gelişimi 25°C ve %60 bağıl nem ortamında 10 günde tamamlanırken, 23,5°C'de 336, 18°C'de ise 504 saate kadar uzamaktadır. Yumurtalar, oval şekilde, ortalama 0.2 mm çap ve 0.5 mm uzunluğunda, koryon zarı ile kaplı, dorsal (sırt) kısımları ventral (karın) kısımlarına göre daha yassı şekildedir, sırt kısmın anterior (ön) ucunda yumurtanın oksijen almasını sağlayan iki filament bulunur. Bu filamentler ayrıca yumurtanın yumuşak olan besine batmasına engel olur.¹⁰³ Dişiler yumurtalarını karınlarında depo ederler, henüz daha cinsel olgunluğa erişmeyen dişiler erkeklerin olmadığı bir tüpe aktararak istenilen çaprazlama modeli için hazır tutulur. Erkeklerin testislerinde, diploid spermatogoniumlardan haploit olarak üretilen spermilerin boyları 1.7-1.8 mm arasında değişir. Dişi sineğin uterusuna aktarılan spermier burada günlerce yaşayabilirler, spermier uterusu geçip yumurtaları döileyerek zigot oluştururlar. Herhangi bir sperm yumurta ile eşleşir eşleşmez dişi yumurtasını bırakabilir ya da yumurta embriyonik gelişimin erken safhalarına kadar uterusu kalabilir. Embriyonik gelişimin ardından (yaklaşık 24 saat) sonra larvalar temel besinin maya olduğı besiyerine çıkarlar.¹⁰⁴ L1 döneminden L2 dönemine geçiş yani ilk deri değişimini 24 saat sonra gerçekleştirilir. L2 evresine giren larvalar 24 saat sonra yine deri değişimi gerçekleştirerek L3'e dönüşür. L3 evresi 48 saat sürmekte olup, larvalar bu evrede çengel şeklindeki ağızlarıyla beslenir. Bu evrede gelişim beslenmeye paralel olarak hızlı bir şekilde gerçekleşir. Yetişkin larvalar besi yeri içerisinde tüneller açarak hem besi yeri içerisinde hem de besi yerinin üzere, yukarı doğru hareketlenirler. Bu dönemde larvaları şişelerin cidarında ve besi yeri içerisinde larvaları görmek mümkündür.



Şekil 2.14. Larvada Metabolik Organlar

L3 döneminin sonlarına gelmiş larvalar kültür şişesinin cidarında uygun bir yere tırmanıp diğer gelişimlerini tamamlamak için pupa halini almaya başlarlar. Pupalar ilkin beyaz renkteyken, iki saat sonra koyumsu sarı renge ve sonunda kahverengiye dönüşürler. Bu dönemde pupalar hareketsizdir, beslenme görülmez. Erişkin bir sineğin vücut şekline ve organlarına sahip bir bireyin gelişimi için gereken başkalaşım (metamorfoz), pupa evresinde sıcaklık ortalama 20°C iken 144 saatte, ortalama 25°C sıcaklıkta ise 120 saatte gerçekleşir. Gelişimin tamamlanmasıyla pupa kılıfının operkulumundan delinmesi ile uzun vücut yapısına sahip, açık renkli yeni erişkin sinekler dışarı çıkarlar, bu bireylerin renkleri birkaç saat içinde koyulaşır. Sineklerin kanatlar başta olmak üzere yumuşak olan vücut bölümleri ortamdaki oksijene maruz kalarak sertleşir. Son olarak kırışık durumda bulunan kanatlar açılır ve bireyler normal erişkin sinek görünümüne ulaşırlar ¹⁰⁵ (Şekil 2.15).



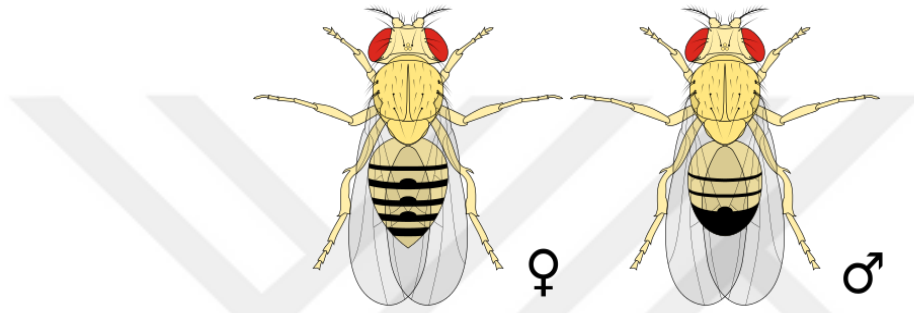
Şekil 2.15. *Drosophila Melanogaster* Yetişkin Sinek

Drosophila melanogaster açık dolaşım sistemine sahip olup, memelilerdeki kanın eşdeğeri olan sıvısına hemolinf denilmektedir. Hemolinf içerisinde şeker olarak iki glikoz molekülünden oluşan ve trehalose olarak isimlendirilen disakkarit bulunur. Memelilerde olduğu gibi şeker ayrıca glikojen olarak da yağ dokuda depolanmaktadır. Dolaşımında trehalose miktarı insandaki glukoz miktarına oranla aşırı yüksektir (1500 – 2000 mg/dL ve ~100 mg/dL).^{106, 107} Kanda trehalose miktarını ölçmek için uygulanan bir metot vardır; klinik biyokimyaadaki uygulamalara benzer şekilde birkaç hayvandan elde edilen 0,5 µL kanda, trehalose enzimatik olarak glukozla çevrildikten sonra ölçüm gerçekleştirilir. Literatürde genetiksel ve kimyasal metotlarla manipüle edilen sineklerdeki trehalose seviyenin en fazla %50 civarında bir değişim sergilediği kaydedilmiştir.^{106, 107} Trehalose metodu fazlaca meşakkatli ve zaman alıcı olup *Drosophila*'da gerçekleştirilecek geniş çaplı taramalar için uygun bir yöntem değildir. Ayrıca theralose şekerinin insan metabolizmasında bulunmamasından dolayı, ölçümünün insan fizyolojisini anlamaya katkısı net değildir. Trehalose ölçme metodu çok önceden bulunmasına rağmen herhangi bir genetik tarama için kullanılamamıştır. Ayrıca bireylerde glukozun az miktarda bulunması hatta bazen hiç olmaması nedeniyle, glukoz ölçümü gerçekleştirilememektedir. Akdemir F. ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda SREBP-GAL4 pilot genetik taramasında buldukları bazı genleri laboratuvarında karakterize etmeye çalışırken, ChREBP mutantlarında glukometrenin sinyal verdiğini ve glukoz değerinin yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri verilere dayalı olarak kan şekeri metodunu bulup, optimize ederek oluşturulacak *Drosophila* modellerinin insan hiperglisemi çalışmaları için uygun olup olmadığını denemişlerdir. Bu amaçla memelilerde fonksiyonları yok edildiğinde, kan şekeri düzeyinin artmasını indükleyen genlerin, sinyal iletim yollarının *Drosophila*'da ortolog eşdeğerlerini inhibe ederek gözlemeye çalışmışlardır. Elde ettikleri ön veriler hem yeni metodun hem de *Drosophila*

model organizmasının insan için uygunluğunu ve geçerliliğini ortaya koymuştur. Bu amaçla yaklaşık kırk farklı mutant hayvanda hem trehalose hem glukoz düzeyleri ölçülmüştür; birçoğunda hiperglisemi görülürken ChREBP dışındakilerde trehalose seviyesinde istatistiksel açıdan farklılığın oluşmadığı kaydedilmiştir. Ayrıca çalışmalarında *Drosophila*'da trehalose'dan ziyade glukoz homeostazisinin ön plana çıktığı, trehalose'un bu canlıda glikojen gibi şeker depolama formu olduğu sonuçları da çıkarılmıştır. *Drosophila*'da kan miktarı en çok L3 döneminde bulunur, bu dönemde kandaki glukoz konsantrasyonu insandaki muadili ile karşılaştırıldığında çok düşük seviyededir. Larvalar şekerli besiyerinde yaşadıklarından dolayı küçük bir şeker kontaminasyonunun ölçümü etkilememesi için larvalar beş kez yıkanır. Yine araştırmacılar tarafından sinek makrofaj kültürü tekniğinin bulunması, böylece hemolinf ile aseptik çalışması bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde büyük kolaylık sağlamıştır. Bu yöntem ChREBP gibi hiperglisemik bir mutant metodu optimize etmeyi mümkün kılmıştır. Bu metot, trehalose tekniğine göre az iş gücü gerektirmesi, çok daha hızlı olması, sinyal/gürültü oranının yüksek ve standart sapması çok daha küçük olmasından dolayı geniş çaplı bir genetik tarama için uygundur. Bu model organizmada ilk defa kan glukoz seviyesinin ölçülmesine imkân sağlamıştır, böylece bir hafta gibi kısa sürede onlarca farklı gen ekspresyonu RNAi ile yok edilip kan şekeri düzeyinin incelenmesi mümkün görünmektedir.^{108, 109}

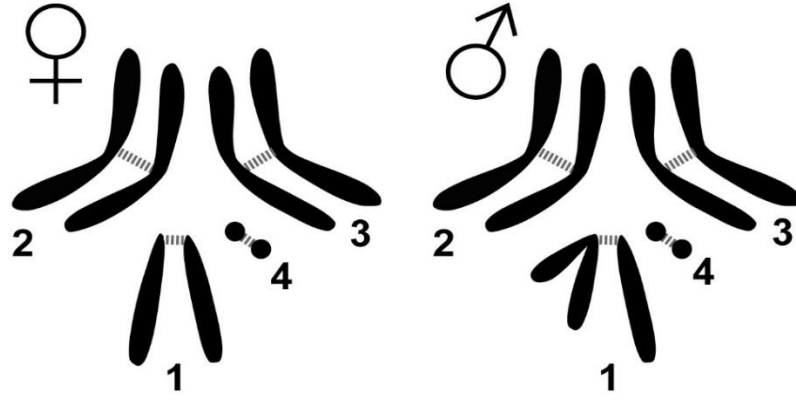
Erişkin erkek ve dişi sinekler belirgin olan birtakım özellikleriyle kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilebilirler. *Drosophila melanogaster* erkeklerinin karın yapıları kısa ve yuvarlak olduğu halde, dişi sineklerin karnının ucu uzun ve sivri görünümündür¹¹⁰ (Şekil 2.16). Ek olarak dişilerin yaşlandıkça karın bölgeleri yumurtalarla dolduğundan genişler. Yine cinsiyet ayrımında kullanılan bir diğer özellik de karın segmentlerinde bulunan koyu renkli çizgilerdir. Bu görülebilir segmentler dişilerin karnında yedi,

erkeklerin karnında ise beş adet olarak gözlenir. Mikroskopik incelemelerde dış genital yapılarında da farklılıklar görülür. Stereo mikroskop altında yetişkin erkek sinekler incelendiğinde, birinci çift yürüme bacaklarının birinci tarsus segmenti üzerinde kalın ve siyah kıl demetinden oluşmuş eşey tarağı (sex comb) olarak adlandırılan yapı gözlemlenir, dişilerde böyle bir yapı mevcut değildir. Çaprazlamada kullanılan sineklerin cinsiyetlerinin ayırt edilmesinde ve özellikle virjin birey seçiminde bu karakteristik özellikler kullanılmıştır.¹⁰³



Şekil 2.16. *Drosophila Melanogaster*'de cinsiyetlerin fenotipik görünümü

Drosophila melanogaster'in diploit setinde 4 çift kromozom ($2N=8$) bulunmaktadır. Bu setin üç çifti otozomal, bir çifti ise gonozomaldır. Yine dişi sineklerde iki adet X kromozomu, erkek sineklerde ise bir adet X kromozomu ve ters J şeklinde bir adet Y kromozomu bulunmaktadır¹¹¹ (Şekil 2.17). Homogametik dişi sinekler (XX) ile heterogametik erkek sinekler (XY) arasında eşey kromozomunda gözlenen bu farklılıklardan dolayı, X kromozomu üzerindeki mutasyonlar (cinsiyet ile ilgili genler) baskın olmasına bakılmadan erkek sineklerin fenotipine yansır. Başka bir deyişle erkek sineklerde X kromozomu bir adet olduğundan, X kromozomu üzerindeki genler hemizigot durumda bulunmasının sonucu olarak resesif mutasyonlar erkek sineklerde baskın mutasyonlar gibi fenotipe yansır.



Şekil 2.17. *Drosophila melanogaster*'de kromozomal yapı

Genetikte *Drosophila* ile oluşturulan farklı modeller, genom ölçeğinde tanımlanmış mutantların ve moleküler olarak tanımlanmış olan genomik eksikliklerin incelenmesi veya taranmasına imkân sağlamaktadır. Ayrıca karmaşık transgenik sistemler aracılığıyla RNAi çalışmaları gerçekleştirilmektedir. *Drosophila* aracılığıyla gerçekleştirilen genetik ve genomik çalışmalar hastalıkların nedeni olan genlerin keşfine yönelik yeni yaklaşımlar sunmaktadır.¹¹² Dört çift kromozoma ($2n=8$) sahip olan *Drosophila*'da, kromozomların ayırt edilebilmesi ve incelenmesi kolaydır. Larvalar tükürük bezi hücrelerinde dev kromozomlara sahiptirler; bu özellik sitogenetik çalışmalar için oldukça idealdir.¹⁰²

Drosophila melanogaster, insan hastalıklarının moleküler mekanizmalarını anlamada izlemesi kolay ve iyi çalışılmış bir genetik model organizmadır. Pek çok genetik varyanta sahip olduklarından kalıtımla ilgili sorunların araştırılması ve çözümünde kullanılabilir. Genetik çalışmalarda yaygın kullanılmasının diğer bir nedeni de *Drosophila*'nın gelişmiş hayvanlar ve insanlar gibi ökaryotik canlı olması ve hücre metabolizmasının neredeyse aynı olmasıdır.¹¹³ İnsanlarda genetik hastalıklara yol açan genlerin *Drosophila*'daki gen karşılıklarını (ortolog genler) kullanarak ilgili hastalıkların araştırılabildiği Homofila (Homophila) çalışmaları bu organizmayı güçlü bir model organizma yapmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda insan genlerinin %

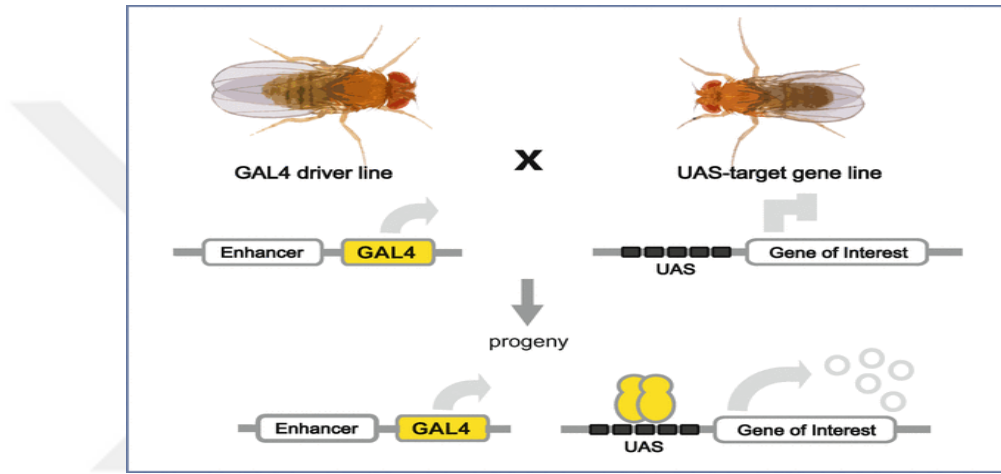
60'ından fazlasının *Drosophila*'da ortolog gen olarak temsil edildiği kaydedilmiştir. Ortolog genler son yıllarda gen manipölasyonundaki tekniklerin gelişmesiyle de daha fazla önem kazanmıştır.^{114, 115} Başka araştırmacılar memeliler ile *Drosophila melanogaster* arasında nörolojik, biyolojik ve fizyolojik birçok temel özelliğin korunduğu ve insanda hastalığa neden olan genlerle sinekte fonksiyonel genlerin arasındaki homolojinin yaklaşık %75 olduğunu rapor etmişlerdir.¹¹⁶ Çok düşük maliyetler, güçlü genetik araçların varlığı, korunmuş hastalık yolları gibi benzersiz özellikler sağlayan *Drosophila melanogaster* insan hastalıkları modelleri, kardiyovasküler hastalıklar, merkezi sinir sistemi bozuklukları, diyabet, kanser ve iltihaplanma bozuklukları için ilaç keşfi de dâhil biyomedikal araştırmaların yapılmasına dair büyük fırsatlar sunmaktadır.¹¹⁶ *Drosophila*'nın insan genomuna yüksek oranda homoloji göstermesinden (yaklaşık %60-65), hücresel ve fizyolojik süreçlerde etkili olan ve gelişimi yöneten moleküler mekanizmaların büyük kısmının her iki organizma arasında korunmuş olmasından ve manipölasyonların yapılıp kontrollü çaprazlamaların yapılabilmesine imkân vermesinden dolayı kullanım alanları oldukça artmıştır.¹¹⁷

Araştırmacının kontrolü altında, belirli özelliklere sahip organizmaların çaprazlanmasına kontrollü çaprazlama denir; kontrollü çaprazlama genetikte kullanılan bir çalışma yöntemidir. *Drosophila* kontrollü çaprazlama için ideal bir organizmadır; çalışmanın amacına uygun atasoyların seçilerek çaprazlanması, elde edilen yavru bireylerin birkaç nesil takip edilebilmesi hedeflenen kalıtsal mekanizmanın ortaya çıkarılması için muazzam bir olanak sağlamaktadır.¹⁰²

2.5. GAL4 - UAS sistemi

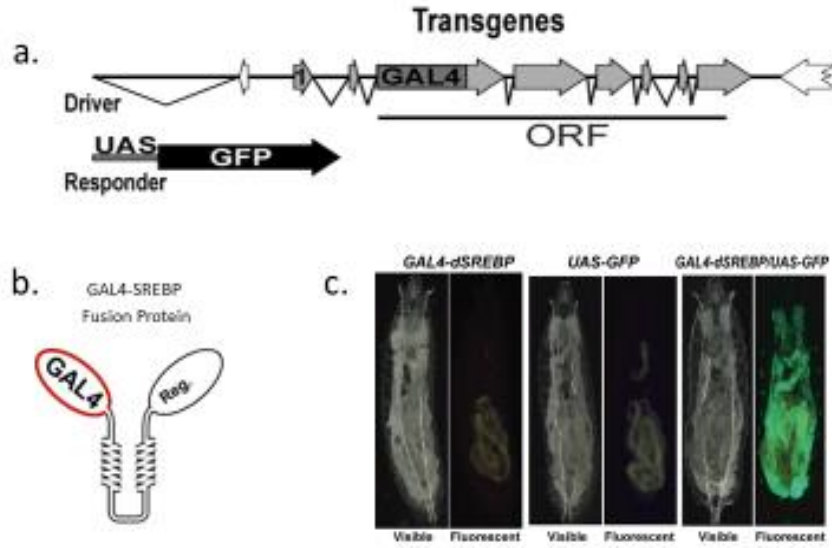
GAL4-UAS sistemi, *Drosophila melanogaster* sineği gibi organizmalarda gen ifadelerini ve fonksiyonunu incelemede kullanılan biyokimyasal yöntemlerden birisidir. Hücre kültüründe reseptör kimyasal bağlama fonksiyonlarını çalışabilmek için *in vitro*

duruma uyarlanmıştır. Böylece gen ifadesini incelemeye ideal teknik olarak düşünülmüştür.¹¹⁸⁻¹²⁰ GAL4 / UAS sistemi, GAL4 proteini için özgün bir DNA bağlanma bölgesine sahip yukarı akış UAS güçlendiricisi ile modifiye edilmiş DNA dizilerinin RNA ifadesini arttırmak için maya transkripsiyon faktörü GAL4'ü kullanır. Dokuya özel güçlendiriciler kullanılarak, GAL4 protein ifadesini belirli dokulara dahil edilebilir.¹²¹ Resimde aktif bir sisteme sahip yavru birey, GAL4 transkripsiyon faktörüne sahip bir sinek ile UAS güçlendirici bir sinek çaprazlanarak oluşturulur¹²² (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. *Drosophila Melanogaster* 'de GAL4/UAS Sistemi.

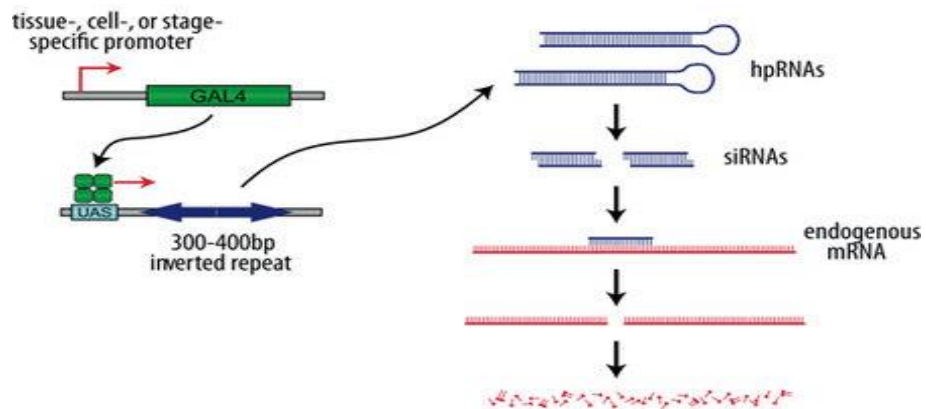
Çalışmada kullanılan GAL4/UAS sisteminde GAL4 bir maya (*S. Cerevisia*) transkripsiyon faktörü olup UAS gene özgü DNA kontrol bölgesini tanımaktadır¹¹⁸. GAL4 transgenik sineklerinin sayıları on binden fazla olup stok merkezlerinden elde edilebilmektedir. GAL4'un başına gelen kontrol bölgesi bu proteinin hangi doku ya da dokularda üretileceğini belirler. Yine UAS transgenik sinekler olup UAS kontrol kısmından sonra bir genin cDNA'sı, GFP, LacZ gibi belli olmasını sağlayan genler de olabilmektedir. Örneğin GAL4 transgenik bir sinekle, UAS-GFP transgenik bir sinek çaprazlandığı zaman GFP sinyali GAL4 proteininin hangi hücrelerde ifade edildiğini bize gösterir³⁹ (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. SREBP-GAL4,UAS-GFP Habercisi

2.6. RNA interferansı (RNAi)

RNA interferansı (RNAi), diziye özgü olarak hedeflenen bir genin transkriptinin, çift zincirli RNA (dsRNA) ile durdurulmasıdır.¹²³ Aslında dsRNA, normal bir savunma mekanizmasının katalitik yolunun etkinleştirilmesidir. Durdurma hedef mRNA zincirine tamamlayıcı bir dsRNA'nın tek zincirinin (21 bazlık, antisense zincir) bağlanmasıyla gerçekleşir. dsRNA, iletildiği hücrelerde siRNA (small interfering RNA) denen daha küçük parçalara bölünür¹²⁴ (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. RNA İnterferansı (RNAi)

RNAi hücrede karmaşık bir biyolojik düzenleyici olarak görev yapan mekanizmadır. Bu mekanizma aracılığıyla hücrede gen ifadesinin transkripsiyonel düzenlenmesi ve viral genler, dış kaynaklı RNA'lar, transpozonlar gibi istenmeyen yabancı moleküllerin yok edilmesi sağlanır.¹²⁵⁻¹²⁷ RNA interferansın gerçekleşmesinde ilk basamak olan dsRNA'nın 21-23 nükleotidli daha küçük RNA'lara parçalanmasından sonra hedef mRNA'nın belirlenip yıkılması meydana gelir.¹²⁸ *Drosophila*'da RNAi olarak isimlendirilen bu mekanizma *Caenorhabditis Elegans*'da bulunmuştur. RNAi memeli sistemlerde siRNA olarak bilinmektedir.¹²⁹ RNAi veya siRNA, mRNA'sı yok edilmek istenen genin bir kısmına komplement olup mRNA'ya bağlanarak çift zincirli RNA oluşturmaktadır. Oluşan bu çift zincirli RNA hücrede enzimatik bir kompleks tarafından tanınıp parçalanmaktadır. Hücre kültüründe kullanıldığı gibi transgenik canlı da yapılabilmektedir. UAS kontrol kısmından sonra spesifik bir gene karşılık gelen çift zincirli RNA oluşturan transgenik sinekler hemen hemen her gen için olup, bu hatlar *Drosophila* stok merkezlerinden temin edilebilmektedir.^{104, 130} UAS-RNAi (UAS-IR) transgenik sinekler, GAL4 transgenik sineklerle çaprazlandığında GAL4 ekspresyonunun gerçekleştiği hücrelerde hedef genin ekspresyonu yok edilmektedir (ekspresyon azalması %100 olmayabilir, hipomorf).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Sineklerin Laboratuvar Ortamında Yetiştirilmeleri

Drosophila melanogaster, laboratuvarında boyutları deneyin amacına ve çalışma alanının şartlarına bağılı olarak değişim gösterebilen kültür kaplarında, 25°C sıcaklığa ayarlı havalandırma imkânı olan inkübatörlerde yetiştirilirler. Kültür kapları saydam cam olduğundan sinekler kolay bir şekilde izlenilebilmektedir. Kültür kabı olarak 50 ml'lik tüpler ortalama 10 ml besi yeri konulur. Kapların ağzı, içeriye hava akışına engel olmayacak şekilde pamuk tıpayla kapatılır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sinekler İçin Kültür Tüpü

Meyve sinekleri doğal olarak fermente olabilen bitkisel ürünlerde bulunurlar, ancak meyvelerden doğrudan beslenemezler. Bu canlıların besin maddesi temelde mayalardır, mayaların çoğalmasının olduğu her türlü ortam iyi bir besin ortamıdır. Bu sebeple kültür ortamında, maya gelişimine uygun ve larvanın beslenmesini sağlayabilecek miktarda şeker bulunmalıdır. Farklı tiplerde kültür ortamları hazırlanabilir. Laboratuvarımızda sinekler için kullanılan besiyerinin 1 ölçeğinde 6 gr

agar, 30 gr maya, 60 gr mısır unu, 75 gr şeker tozu, 6 ml propiyonik asit ve 1300 ml su kullanılmaktadır. Besiyeri hazırlanırken 300 ml soğuk su, maya ve mısır unu iyice karıştırılır. Pişirme kabına ise şeker tozu ve agar koyulup 1000 ml sıcak su ilavesiyle ocağa koyulur. Bu arada soğuk suda hazırlanan maya ve mısır unu karışımı kaba aktarılır ve karıştırılarak pişirilir. Karışım kaynamaya başladıktan sonra pişirilme işlemi 10 dakika daha sürdürülür. Karışım daha sonra steril bir ortamda 5-10 dakika soğumaya bırakılır. 6 ml propiyonik asit soğuyan karışıma homojen hale gelene kadar karıştırılarak eklenir. Son olarak karışım tüplere belli miktarlarda dökülür ve tüpler kullanılıncaya kadar temiz ve serin bir ortamda muhafaza edilir.

3.2. Laboratuvar Çalışması için Gerekli Ekipman

İnkübatör (etüv): 25°C sıcaklığa ayarlı olup sineklerin yetiştirilmesi için kullanılan laboratuvar gerecidir.

Morg: %70'i alkol ve %30'u su karışımı olan ve incelenen sineklerin içine konulması için hazırlanan şişelerdir.

Fırça: Sineklerin incelenmesi için kullanılır. İnceleme esnasında sineklerin zarar görmemesi için, çeşitli numaralarda suluboya fırçalarından yumuşak kıllı olanları tercih edilir.

Anestetizer: Üzerinde çalışılacak olan sineklerin bayıltılması için kullanılan, CO₂ gazını geçiren bir tabakanın olduğu düzeneştir. Bayıltma işlemi için küçük bir şişe yardımı ile eter de kullanılabilir. Çalışmada larvaları hareketsiz kılmak için, 50 ml tüpün dibine pamuk konulup üzerine 1 ml izofloran ekleyerek yaptığımız bir bayıltma düzeneği de oluşturuldu.

Stereo Mikroskop: *Drosophila*'nın morfolojik özelliklerini belirlemek, eşey ayrımı yapmak, virjin sinekleri toplamak amacıyla kullanıldı.

Floresan Mikroskop: aprazlamalardan sonra GAL4 proteinin hangi hücrelerde olduğunun gösterilmesi, GFP sinyalinin değerlendirilmesi gibi iřlemeler için gereklidir (şekil 3.2).



şekil 3.2. Zeiss v12 Stereo Floresan Mikroskobu

Monokromatik plate reader: Çalışmada kan şekeri değerlerinin ölçülmesi aşamasında deney plakasını değerlendirmek için kullanıldı (şekil 3.3).



şekil 3.3. Monokromatik Plate Reader (BioTek Plate Reader)

3.3. Dişi Virgin (Bakire) Sinek Toplanması

Pupadan erişkin bireye dönüşen sineklerin cinsel olgunluğa erişebilmeleri için 8-12 saat gibi bir süre gereklidir. Bu süre değişik hatlarda farklılık göstermektedir. Çalışmada virjin birey toplanacak hatlar en az 7 tüpte kendi aralarında çaprazlandı. Yavru bireyler 3. larva aşamasına geldiklerinde ebeveynler tüp ortamından çıkarıldı. Ortamda bulunan larvalar yaklaşık 5-6 gün sonra erişkin sineğe dönüştü. Saat 09:00 – 17.00 saatleri arasında bu tüplerden dişi bireyler toplandı, ertesi gün aynı işlemin tekrarlanabilmesi amacıyla tüpler soğuk odaya (18°C) alındı. Çaprazlamaya yetecek kadar virjin sinek elde edilene kadar bu işlemler tekrar edildi. Virgin sineklerin toplanması için kullanılan diğer bir yöntem ise heat shock'tır. Yine virjin toplanmak istenen hatlar en az 7 tüpte çoğaltıldı. Aynı şekilde 3. larva aşamasında tüplerde bulunan ebeveynleri başka bir tüpe aktarıldı ve iki gün boyunca 1 saat 37°C'de su banyosunda bekletildiğinde tüplerde elde edilen yetişkin dişilerin tamamı bakire olmaktadır.

3.4. *Drosophila Melanogaster* Çaprazlamaları

Çalışmaların tamamı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesinde bulunan Tıbbi Genetik laboratuvarında gerçekleştirildi, çalışmada Bloomington'dan (ABD) temin edilen mutant *Drosophila melanogaster* sinekleri kullanıldı.

Çaprazlama yapılacak hatların birinden 10 virjin dişi ile diğer hattan en az 5 erkek sinek yeni bir tüpte çaprazlandı. Hemen akabinde tüplerin üzerine yeni çaprazlamada kullanılan hatların özellikleri, cinsiyetleri ve çaprazlama tarihi gibi bilgiler yazıldı. Tüpler 25°C'de tutulduğunda 2-3 gün içinde larvaların çıplak gözle görülmesi gerekir, 5-6 gün içinde larvaların meydana gelmediği durumlarda çaprazlamalar yeniden yapılmıştır. Larvaların görülmesi ile çaprazlama başarılı kabul edilerek oluşacak sonuçların başarılı bir şekilde gözlenmesi amacıyla ebeveynler morga veya başka bir tüpe aktarıldı. Bu çaprazlamalarla 8-10 günlük sürede 50-100 tane yavru sinek elde edilmiştir.

Drosophila melanogaster'de *KCNQ* geni yalnızca yabancı tipte temsil edilir. İnsanlarda ise aynı genin mutant formlarının oluşmasıyla 5 homologunun var olduğu bilinmektedir. Bu açıdan bakıldığında *Drosophila*'da *KCNQ* geninin incelenmesi çok daha kolay gözükmemektedir. Ancak yine de bu genin *Drosophila*'da tamamen yok edilmesi ile letalite oluşmaktadır. Bu nedenle, *KCNQ* geni metabolizma için çok önemli olan yağ dokuda, dokuya özgü gen manüplasyonu ile baskılanmıştır. *KCNQ* geninin yağ dokuda RNAi ile yok edilerek SREBP, ChREBP ve kan şekeri üzerine etkilerini araştırabilmek için kullanılan sinekler aşağıdaki stoklardan seçilmiştir.

Tablo 3.1. Çaprazlamada Kullanılan *Drosophila* Stokları

Stok No	<i>Drosophila</i> Hatları
27252	UAS-KCNQ-RNAi
7011	Dcg-GAL4
8547	UAS-RFP
6874	UAS-GFP
4847	UAS-RAS
38395	SREBP-GAL4
NA	Sug-GAL4

Çalışmada üzerine çalışılan hedef genler otozomaldır, bu nedenle çaprazlamalarda kullanılan hatlar için cinsiyet tercihi önemsizdir. Ancak yumurta verimliliği göz önüne alınarak dişi sinekler GAL4 stoklarından seçilmiştir. Çaprazlamalar 2 kez tekrarlandı. Kontrol grubu oluşturmak amacıyla çaprazlamalarda OregonR hattı erkek sinekler kullanıldı. Yapılan çaprazlamalar şu şekildedir:

- 1) Dcg-GAL4 (♀) X UAS-GFP (♂)
- 2) Dcg-GAL4 (♀) X UAS-RFP (♂)
- 3) Dcg-GAL4 (♀) X UAS-KCNQ-RNAi (♂)
- 4) Dcg-GAL4 (♀) X OreR (♂) (kontrol)
- 5) SREBP-GAL4,UAS-GFP (♀) X UAS-KCNQ-RNAi (♂)

- 6) SREBP-GAL4,UAS-GFP (♀) X OreR (♂) (kontrol)
- 7) Sug-GAL4, UAS-GFP (♀) X UAS-KCNQ-RNAi (♂)
- 8) Sug-GAL4, UAS-GFP (♀) X UAS-RAS (♂)
- 9) Sug-GAL4, UAS-GFP (♀) X OreR (♂) (kontrol)

Dcg-GAL4 sisteminin yağ dokusuna özgü olduğunun anlaşılabilmesi için 1 ve 2 no'lu, yağ dokusunda KCNQ geni ifadesinin RNAi ile engellemesi için 3 no'lu, KCNQ geninin yok edilmesinin SREBP yolağına olan etkisinin araştırılması için 5 no'lu, KCNQ geninin Sugarbabe geni ifadesine ve dolayısıyla ChREBP yolağına etkisini araştırmak 7 no'lu çaprazlama, Sug-GAL4 habercisi ifadesinin değişebilir olduğunu göstermek için ise 8 no'lu çaprazlamalar yapılmıştır.

3.5. Kan Glikoz Ölçümü

Drosophila melanogaster açık dolaşım sistemine sahip bir canlı olup memelideki kanın eşdeğeri olan sıvıya hemolinf denmektedir. Trehalose metodu uzun zaman alıp fazla iş gerektirmektedir. Glikoz konsantrasyonu, en çok kanın olduğu 3. larva döneminde, insanla karşılaştırıldığında çok düşüktür. Larvalar şekerli besiyerinde yetiştirilir, küçük bir kontaminasyonun ölçümleri etkilememesi için larvalar beş kez yıkandı. KCNQ geninin yağ dokuda RNAi ile yok edilerek kan şekerinin ölçülmesi için, iki farklı tüpte ortalama 5-10 arasında DcG-GAL4 dişi sinek ile UAS-RNAi stoğundan yaklaşık beş erkek sinek aynı standartlarda çaprazlandı. Bir hafta sonra bu çaprazlamalardan elde edilen L3 aşaması larvaları, çeşme suyu altında özel süzgeç kullanılarak küçük bir petri kabına toplandı. Yine su içindeki larvalar kaba yiyecek parçalarından 2 molar tuzlu su kullanılarak ayrıştırıldı ve petri kabına eklendi. Toplanan bu larvalar rutin mikroskop altında incelendi. Zarar görmüş, henüz daha L3 evresine ulaşmamış olan larvalar diskalifiye edildi. Bu çalışmada on beş larvadan alınan 2 µL kan

rutin stereo mikroskop altında doğrudan larvalar parçalanarak toplanmıştır, bu işlem istatistiksel analizin gerçekleştirilebilmesi için 4 kez tekrarlanmıştır, böylece her parametrede yaklaşık altmış larva kullanılmıştır. Kağıt havlu üzerine koyularak suyu alınan larvalar parafilm üzerine aktarıldı. Mikroskop altında parafilm üzerindeki larvaların tek tek ince uçlu forsept ile derileri delinerek hemolinfin dışarı çıkması sağlandı, böylece yaklaşık on beş larvadan pipet yardımıyla 2 µL hemolinf alındı. Alınan hemolinf buz üzerinde bekletilen 96 kuyucuklu plate'ye aktarıldı. Kontrol grubunda beyaz (white) genine karşı UAS-RNAi kullanıldı. Plate'de standart eğri yapmak için konsantrasyonu bilinen solüsyonlardan 2 µL konuldu, ilgili her kuyucuğa klinik kimyada kullanılan ve enzimatik yolla glukoz ölçen kimyasal karışımdan (Autokit Glucose, Wako kimyasal) 150 µL eklendi. Plate hafif çalkalandıktan sonra beş dakika oda sıcaklığında tutuldu. BioTek Plate Reader'da 505 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı ve elde edilen veriler bilgisayarda işlendi. Çalışmada *KCNQ* geni ifadesinin RNAi ile engellemesi için DcG-GAL4 hattı, UAS-KCNQ-RNAi hattı ile çaprazlanarak yağ dokuya özgü genetik manipülasyon yapıldı.

3.6. Mikroskopik İnceleme

Floresan çalışmalarında Zeiss v12 Stereo floresan mikroskobu kullanıldı. Her şekildeki floresan resimler aynı parametreler kullanılarak elde edilmiştir. Larvaları hareketsiz kılmak için 50 ml tüpün dibine pamuk konularak ve 1 ml izofloran eklenerek bayıltma düzeneği hazırlandı. Temizlendikten ve sudan arındırıldıktan sonra parafilm üzerine aktarılan larvalar Şekil 3.4'te görülen bayıltma düzeneği ile 2 dakika boyunca anesteziye maruz bırakıldı.



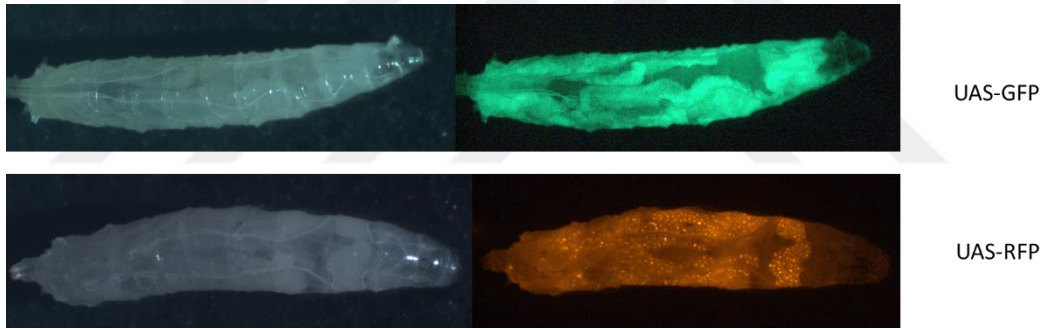
Şekil 3.4. Bayıltma Düzeneği

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada hem istatistiksel analizin gerçekleştirilmesi hem de deney sonuçlarındaki doğruluğun artırılması amacıyla aynı çaprazlamadan elde edilen altmış larva on beşerli dört gruba ayrıldı. Böylece dört gruptan elde edilen 2 μ L hemolinf dört farklı kuyucuğa konularak ölçümler gerçekleştirildi. Bu deney düzeneği üç kez tekrarlandı. Yine floresan veya stereo mikroskopları ile yapılan mikroskopik değerlendirmede, her çaprazlama grubundan elde edilen L3 larvalarından ayrı ayrı 40-60 aralığında birey seçilmiş ve incelemeye tabi tutulmuştur. İstatistiksel değerlendirme için, student-t test kullanılmıştır. (n =4, hata çubukları: standart sapma, student-t testi, 2-2, (p<0.001).

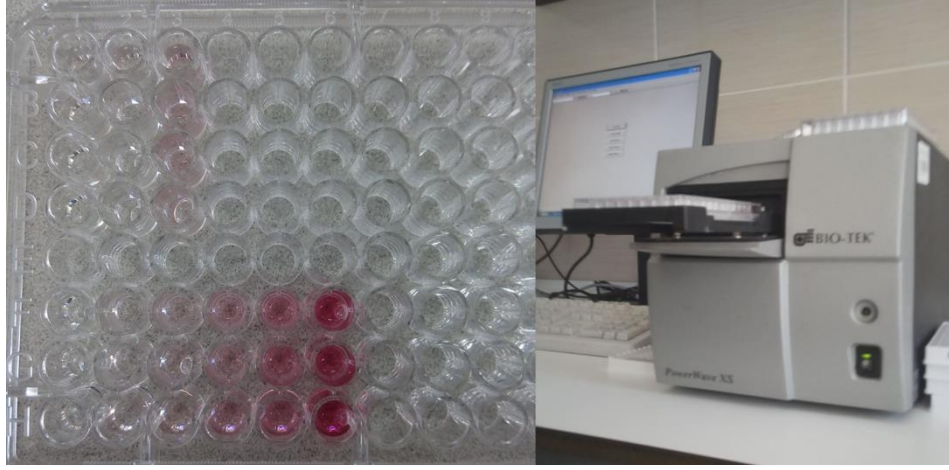
4. BULGULAR

Memeli sistemlerde beş homoloğu olmasına rağmen *Drosophila* genomunda yalnızca bir lokusta bulunan *KCNQ* geninin tüm canlıda yok edilmesi letaliteye neden olacağından, *KCNQ* geni dokuya özgü olarak yalnızca yağ dokusunda genetik manipülasyona uğratıldı. Dcg-GAL4 sisteminin yağ dokuya özgü olduğunun doğrulanması amacıyla Dcg-GAL4 hattı ayrı ayrı UAS-GFP ve UAS-RFP hatları ile çaprazlandı. Şekilde 4.1’de görüldüğü gibi Dcg-GAL4 x UAS-GFP veya Dcg-GAL4 x UAS-RFP (Nükleer) çaprazlamaları sonucu oluşan larvalarda sadece yağ dokusu bariz sinyal vermiştir (Sol paneller beyaz ışık, sağ paneller ise floresan ışık altındaki resimlerdir.).



Şekil 4.1. Dcg-GAL4 Hattının UAS-GFP ve UAS-RFP (Nükleer) Hatlarıyla Çaprazlanması.

KCNQ geni ifadesinin RNAi ile engellemesi için Dcg-GAL4 hattı UAS-*KCNQ*-RNAi hattı ile çaprazlanarak yağ dokusuna özgü genetik manipülasyon yapıldı. Aynı çaprazlamadan elde edilen larvaların on beşerli gruplar halinde parçalanmasıyla ortaya çıkan 2 µL’lik hemolinfler dört paralel kuyucuğa konularak ölçüm gerçekleştirildi. Dört gruptan elde edilen 2 µL hemolinf 4 farklı kuyucuğa konularak ölçüm gerçekleştirildi. Dört paralel kuyucuktan elde edilen ortalama şeker seviyesi kaydedildi (Şekil 4.2).

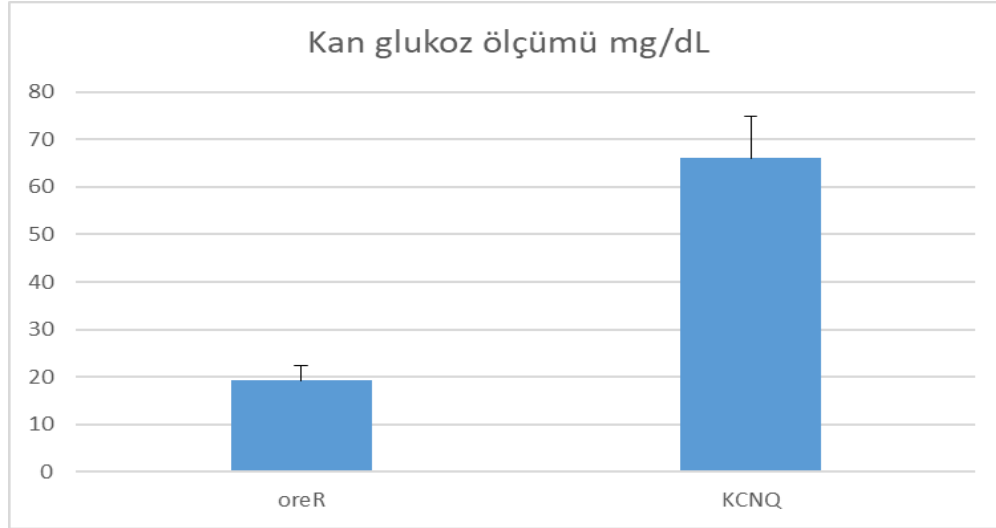


Şekil 4.2. *KCNQ* Geninin Yağ Dokusunda RNAi ile Yok Edilerek Kan Şekerinin Ölçülmesi. (96 Kuyucuklu Plate ve ELİSA Okuyucu)

Tablo 4.1 ve Şekil 4.3'te görüldüğü gibi *KCNQ* geninin ifadesinin RNAi ile yağ dokusunda yok edilmesi sonucu şeker seviyesi yaklaşık üç kat artmıştır. Bu sonuç fonksiyonel olarak ilk defa gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre *KCNQ* geninin RNAi ile ifadesinin engellenmesi sonucu hiperglisemi oluşmaktadır ($p < 0.001$).

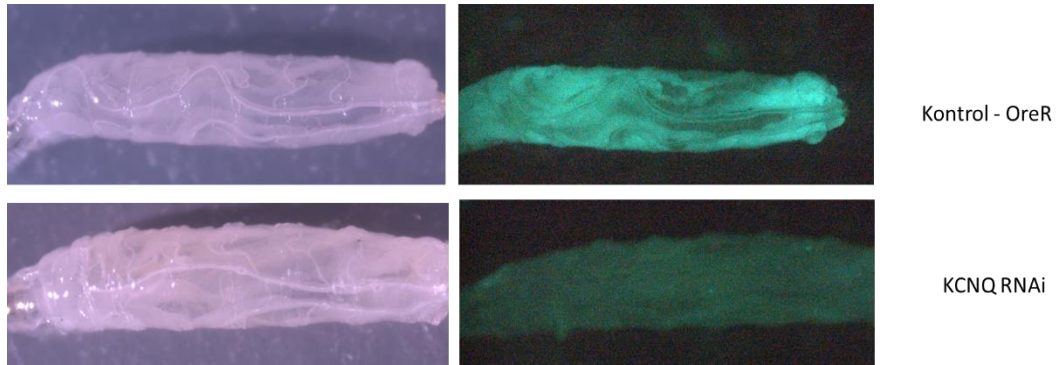
Tablo 4.1. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Ortalama Şeker Seviyesi

	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	Önemlilik
(Kontrol) OreR	19,21 $\pm$ 3,16	1
(Deney) <i>KCNQ</i>	66,14 $\pm$ 8,68	0,00012



Şekil 4.3. Kontrol ve Deney Gruplarındaki Ortalama Şeker Seviyesi Grafiği

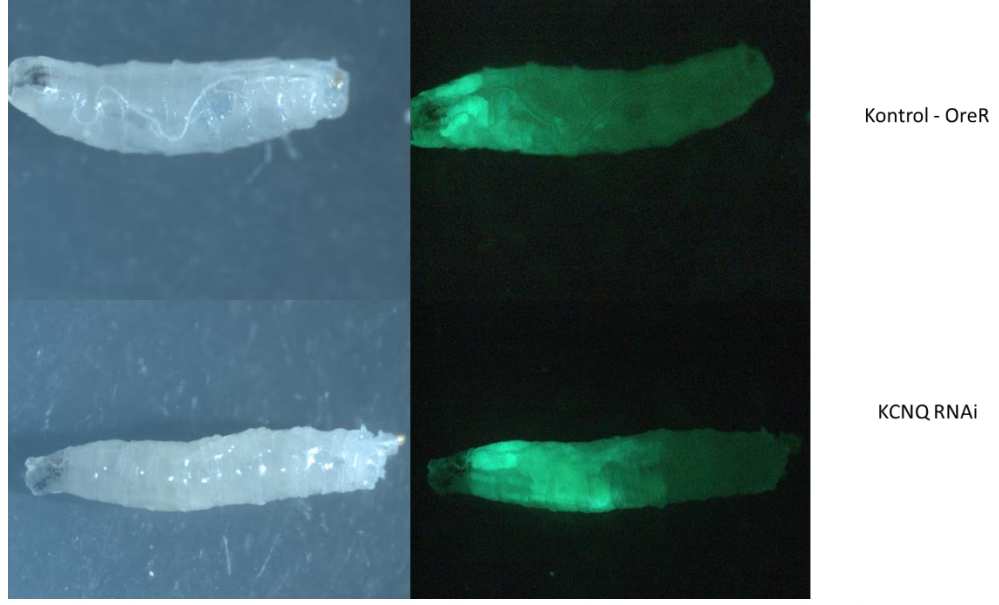
Çalışmada ayrıca SREBP-GAL4,UAS-GFP habercisi dişi virjin sinekler UAS-KCNQ-RNAi erkek sinekler ile çaprazlanarak *KCNQ* geninin yok edilmesinin SREBP yolağına etkisi de araştırılmıştır. Normal koşullarda SREBP yolağı özellikle yağ dokusunda aktiftir (Şekil 4.4, üst paneller). Kontrol çaprazlaması (SREBP-GAL4,UAS-GFP (♀) X OreR (♂)) sonucunda elde edilen larvalardaki sinyallerle karşılaştırıldığında, *KCNQ*-RNAi ile *KCNQ* geninin yok edilmesi SREBP sinyalini dramatik bir şekilde azalmaktadır (Şekil 4.4 alt paneller). Şekilde 4.4'te sol paneller beyaz ışık, sağ paneller ise floresan resimlerdir.



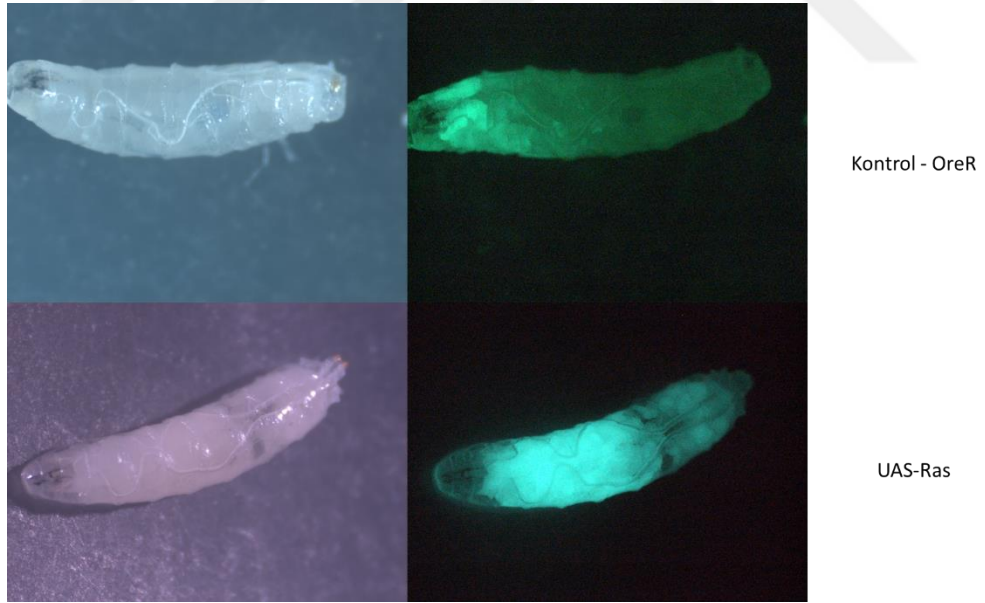
Şekil 4.4. *KCNQ* Geninin RNAi ile Yok Edilmesinin SREBP Yolağına Etkisi

KCNQ geninin, glikoz metabolizması tarafından düzenlenen ChREBP tarafından kontrol edildiği bilinen *Sugarbabe* gen ifadesine etkisini araştırmak amacıyla sug-GAL4, UAS-GFP hattı dişi sinekler UAS-KCNQ-RNAi hattı erkek sineklerle çaprazlanmıştır. Şekil 4.5'te üst panelde görüldüğü gibi kontrol çaprazlaması (Sug-GAL4, UAS-GFP (♀) X OreR (♂)) sonucunda elde edilen larvaların yağ dokusunun ön kısmında sinyal oluşmaktadır (Şekil 4.5'te sol paneller beyaz ışık, sağ paneller ise floresan resimlerdir). Şekil 4.5'te alt panellerde görüldüğü gibi *KCNQ* geninin RNAi ile yok edilmesi ile Sug-GAL4,UAS-GFP habercisinin sinyalinde ciddi bir farklılık gözlenmemiştir. Buna rağmen Sug-GAL4 habercisi RAS onkojeni ile çaprazlandığında sinyal artmaktadır; sinyal artışı tüm yağ dokusunda görülmektedir (Şekil 4.6). Şekilde sol paneller beyaz ışık, sağ paneller ise floresan resimlerdir. Bu durum sug-GAL4 habercisinin ifadesinin değişebilir olduğunu göstermektedir, ancak *KCNQ* geninin fonksiyonel yok edilmesi ciddi etki gösterememektedir.

Mikroskobik ölçümlerde karşılaştırılan her grup için çaprazlamalardan elde edilen 40-60 larva incelemeye tabi tutulmuştur, grup içerisindeki larvalar incelemede hemen hemen aynı sonucu vermişlerdir.



Şekil 4.5. *KCNQ* Geninin RNAi ile Yok Edilmesinin Sug-GAL4, UAS-GFP Habercisine Etkisi.



Şekil 4.6. *Ras* Onkojeninin, Sug-GAL4, UAS-GFP Habercisinin Ekspresyonuna Etkisi.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *KCNQ* geninin diyabetle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu gen, genom boyu ilişkilendirme (GWAS) çalışmalarında RNAi ile yok edilerek diğer mekanizmalardaki rolü incelenmiştir. Bu çalışmada *KCNQ* geni fonksiyonel olarak incelenmiştir. İnsan ve farede beş homoloğu olan *KCNQ* geninin bu canlılarda incelemesi oldukça zordur; aksine bu gen *Drosophila* genomunda yalnızca bir lokusta temsil edilir. Bu nedenle çalışmamız uygulanabilirlik açısından *KCNQ* geninin fonksiyonel özelliklerinin araştırılmasında büyük avantaj sağlamaktadır. *KCNQ* geninin doğrudan hiperglisemiye sebep olduğu ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. Bu sonuç *KCNQ* geninin diyabetteki rolünü doğrudan göstermektedir. Ayrıca *KCNQ* geninin yok edilmesi lipid metabolizması belirteçlerinden SREBP'yi de etkileyerek SREBP aktivasyonunu belirgin şekilde düşürmüş olup diğer metabolizma belirteci olan ChREBP'nin ifadesinde ise gözle görülür bir fark oluşturmamıştır.

Genom boyu ilişkilendirme (GWAS) çalışmalarında, hasta bireylerin gen polimorfizmleri kontrol grubundakilerle karşılaştırılarak hastalıkla genler arasındaki ilişkinin var olup olmadığı araştırılmıştır. Tip II diyabet de GWAS çalışmalarına konu edilmiştir.¹³¹⁻¹³³ Bu araştırmalarda bilinen bir genin bir hastalıkla ilişkisine de doğrudan bakılabilmektedir.¹³⁴ Bu türde araştırmalar sonucunda diyabetle ilişkisi gösterilen *KCNQ* gen ailesi, beş farklı genden oluşmaktadır. *KCNQ1* geninin özellikle tip II diyabet ve komplikasyonları ile ilişkisi belirtilmiştir.¹³⁵⁻¹³⁷ Ayrıca *KCNQ* geni gestasyonel (gebelik) ve Diabetes Mellitus'da da önemli olduğu gösterilmiştir.^{138, 139} Diyabet GWAS çalışmalarında bulunan başka genler de vardır. Ancak bu çalışmalarda ilgili bir genin yok edilmesi, ekspresyonun az veya çok olması, mutant durumlarda üstlendiği yeni fonksiyonu ile ilgili araştırmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle daha fazla gen manüplasyonu çalışmasının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Daha önce yapılan GWAS

çalışmalarına *FTO* ve *KCNE2* genlerinin konu alındığı araştırmalar örnek verilebilir. Bir çalışmada *FTO* geni yok edilerek mutant fareler oluşturulmuştur, böylelikle bu genin metabolizmadaki etkisi ortaya çıkarılmıştır.¹⁴⁰ Başka bir çalışmada potasyum kanalı geni olan *KCNE2* geninde, benzer şekilde manüplasyonlar yapılarak, bu genin diyabetle ilişkisi ortaya konmuştur.¹⁴¹ İnsan ve farede *KCNQ* gen ailesi beş üyeden oluştuğundan dolayı bu üyelerden birisinin mutant forma dönüşmesi durumunda ailenin diğer üyelerinin gen fonksiyonunu sürdürmesi beklenir. Bu nedenden dolayı örneğin farelerin kullanıldığı bir laboratuvar çalışmasında *KCNQ* geninin fonksiyonlarını araştırmak oldukça güçtür. *KCNQ* gen ailesinin beyin ve kalpte önemli fonksiyonlarda rol oynadığı da bilinmektedir, bu ailenin birkaç üyesinin mutant forma dönüşmesi durumunda letalitenin gerçekleşmesi muhtemeldir. *Drosophila*'da ise bu beş gene karşılık gelen tek bir ortolog gen vardır. Bu çalışma *KCNQ* geni ifadesi yok edilerek metabolik fenotiplerin bulunması açısından öncü niteliğindedir. Özetle, bu çalışma kalpte fonksiyonu az çok bilinen *KCNQ* gen ailesinin metabolizmada da rolü olduğunu doğrudan göstermesi açısından önemlidir.

KCNQ geninin lipid metabolizmasında anahtar rol oynayan SREBP yolağına etkisi bu çalışma ile doğrudan gösterilmiştir. Çalışmamızda SREBP yolağının aktivasyonunu gösteren ve lipidlerle modüle olduğu belirlenen bir haberci kullanılmıştır.¹⁴² Böyle bir kompleks habercinin farede oluşturması neredeyse imkânsızdır. Ayrıca literatürde *KCNQ* genlerinin SREBP yolağına olan etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. *KCNQ* geninin SREBP yolağına etkisi ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir.

Karaciğerdeki yağ sentezi, yemek sonrasında yükselmektedir. İnsülin, yağ asidi sentezinde yer alan genleri transkripsiyonel olarak aktive eden SREBP'yi aktive ederken glikoz, hem glikoliz hem de yağ asidi sentezini aktive eden karbonhidrata duyarlı element

bağlayıcı proteini (ChREBP) aktive eder.³⁹ İlgili çalışmada SREBP ve ChREBP 'nin, glikolitik ve lipojenik mRNA'ların koordineli indüksiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu iki yolağın koordineli olarak çalışmasından dolayı, araştırmamızda ChREBP yolağı da konu edilmiştir. *Sugarbabe* geninin ifadesi ChREBP tarafından kontrol edilmektedir. ChREBP de glikoz metabolizması tarafından düzenlenmektedir.³⁶ ChREBP'in hedef geni olan *Sugarbabe*'nin habercisi yağ dokusunun ön kısmında sinyal vermektedir. Çalışmamızda *KCNQ* geni için RNAi ile yok edildiğinde yağ dokusunda ciddi bir sinyal değişikliğinin gerçekleşmediği görüldü. *Sugarbabe* habercisinin sinyalinin değişken olabileceğini Ras onkojeni ile gösterdik. Dolayısıyla bu metabolik yolakta *KCNQ* geninin etkisinin fazla olmadığı söylenebilir. Farklı diyetlerle ChREBP habercisi olarak kullandığımız *Sugarbabe* geninin ifadesi değişmektedir.⁵¹ Diğer yandan memeli hücre kültüründe SREBP yolağı araştırılabilir, *KCNQ* genleri tek tek veya birlikte siRNA ile yok edip bu yolağa etkileri olup olmadığı gösterilebilir.¹⁴³

Çalışmamızda elde edilmiş verilerin yanında, *KCNQ* proteinin gösterilen etkilere nasıl sebep olduğu moleküler olarak bilinmemektedir. Voltaj kapılı potasyum kanallarının hücre membran potansiyeli repolarizasyonundaki rolleri, hem kalp kası hem sinir hücreleri için iyi bilinmektedir. Potasyum kanallarının hücre hacim değişikliklerinden etkilendiği ve hücre hacmi değişikliğine sebep olabileceği bilinmektedir.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ Kalsiyumun SREBP yolağını etkilediği de rapor edilmiştir.¹⁴⁸ Çalışmamızda her ne kadar *KCNQ* geninin susturulması sonucunda *KCNQ* proteinin translasyonu engellenmişse de, bu proteinin hücre membran potansiyelini nasıl etkilediği gösterilememiştir. Membrandaki voltaj değişikliği moleküler olarak nasıl hiperglisemiye sebep olmaktadır ve nasıl SREBP yolağını etkilemektedir? Elde edilen bulgular ışığında, bu olayların aynı mekanizma tarafından etkilendiği varsayılabilir. Ayrıca voltaj değişikliğinin kalsiyum sinyalinde değişikliğe sebep olabileceği öngörülebilir. Bu

Çalışmanın akabinde sözü edilen bu hipotezlerin deneysel olarak doğrulanması hedeflenmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *KCNQ* geni fonksiyonel olarak, dokuya özgü yok edildiğinde hipergliseminin oluştuğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca lipid metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi olan SREBP yolağı aktivasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak membran proteini olan ve hücre zarı elektrik potansiyelinde rolü bilinen *KCNQ* geninin hiperglisemi yapmadaki rolü halen daha bilinmemektedir. Fare ve insanda beş homoloğu olan *KCNQ* geninin genetik analizi pratik olmadığından, geliştirdiğimiz sistemde bu genin moleküler mekanizma analizi mümkündür.

Drosophila yağ doku hücreleri hacim olarak büyüktür ve bu canlıda elektrofizyoloji çalışmaları yapılabilir. Hücre zarı potansiyeli ölçülerek normalden farkı belirlenebilir. Ayrıca mutant yağ dokular *in vitro* ortama alınıp kalsiyum boyaması yapılabilir. Kalsiyumun SREBP yolağını etkilediği bilindiğinden, *KCNQ* mutasyonunun kalsiyum sinyalini etkilediği gösterilirse, bu durum *KCNQ* geninin SREBP yolağını direkt etkilediği anlamına gelecektir.

Potasyum kanallarının hücre hacim değişikliklerinden etkilendiği veya hücre hacmi değişikliklerine neden olabileceği bilinmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda *KCNQ* geninin yok edilmesinden sonra canlıda yağ hücrelerinin total hacmi ölçülebilir.

Yapılan bütün bu çalışmalara rağmen halen daha *KCNQ* proteinin SREBP yolağını nasıl bir mekanizma ile etkilediği bilinmemektedir. Memeli hücre kültüründe SREBP yolağının incelenmesi nispeten kolaydır, *KCNQ* genleri tek tek veya birlikte siRNA ile yok edilerek bu yolağa etkilerinin olup olmadığı gösterilebilir ve mekanistik çalışmalar hücre kültüründe araştırılabilir. Çalışmamızda ChREBP habercisi olarak kullanılan ve farklı diyetlerde gen ifadesinin değiştiği bilinen *Sugarbabe* geninin değişken olduğunu Ras onkogeni kullanılarak gösterildi. *KCNQ* geninin yok edilmesi durumunda *Sugarbabe* habercisinin fazla etkilenmediği kaydedildi. Yapılacak

Çalışmalarda, canlının farklı diyet ortamında tutulması ve *KCNQ* geninin susturulması durumunda nasıl bir etkinin ortaya çıkacağı da araştırılabilir.



KAYNAKLAR

1. Türkiye Kalp ve Damar Hastalıklarını Önleme ve Kontrol Programı 2015-2020. Türkiye Ankara: Sağlık Bakanlığı. 2015.
<http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/Yayin/506>. 10 Kasım 2020.
2. *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. Geneva: World Health Organization
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1
. 10 Kasım 2020.
3. *Noncommunicable diseases country profiles 2018*.
http://www.who.int/nmh/countries/tur_en.pdf?ua=1. 10 Kasım 2020.
4. Türkiye’de Tuz Tüketimi ve Gıda Kaynakları Çalışması - SALTürk 2 Ankara: Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği. 2012
http://www.turkhipertansiyon.org/tuz_280512.php. 10 Kasım 2020.
5. Jakab M, Hawkins L, Loring B, Tello J, Ergüder T, Kontas M. Bulaşıcı Olmayan Hastalıklarda Daha İyi Sonuçlar: Sağlık Sistemi için Zorluklar ve Fırsatlar, No.2, Türkiye Ülke Değerlendirmesi. Copenhagen Dünya Sağlık Örgütü Avrupa Bölge Ofisi. <http://kronikhastaliklar.thsk.saglik.gov.tr/dosya/Dokumanlar/BOHTR.pdf>. 10 Kasım 2020.
6. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*. 2001, 104: 2746-53.
7. A.H.A., 2005. <http://www.americanheart.org/>. 15 Kasım 2020.
8. F A, Ion Channel Diseases. *Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci*. 2010, 6: 65-70.
9. Hales KG, Korey CA, Larracuenta AM, Roberts DM. Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System. *Genetics*. 2015, 201: 815-42.

10. Bier E. Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet.* 2005, 6: 9-23.
11. Hu Y, Flockhart I, Vinayagam A, Bergwitz C, Berger B, Perrimon N, Mohr SE. An integrative approach to ortholog prediction for disease-focused and other functional studies. *BMC Bioinformatics.* 2011, 12:357.
12. Jaiswal M, Sandoval H, Zhang K, Bayat V, Bellen HJ. Probing mechanisms that underlie human neurodegenerative diseases in Drosophila. *Annu Rev Genet.* 2012, 46: 371-96.
13. Rand MD. Drosophotoxicology: the growing potential for Drosophila in neurotoxicology. *Neurotoxicol Teratol.* 2010, 32 : 74-83.
14. Metabolizma. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Metabolizma> 10 Kasım 2020.
15. Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar Çok Paydaşlı Eylem Planı (2017-2025)” 1056, Ankara ve 2017.
16. *Dünya Sağlık Örgütü*
https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/346695/BOH_TR.pdf. 15 Kasım 2020.
17. Türkiye Hanehalkı Sağlık Araştırması Bulaşıcı Olmayan Hastalıkların Risk Faktörleri.
https://www.who.int/ncds/surveillance/steps/WHO_Turkey_Risk_Factors_A4_TR_19.6.2018.pdf, 15 Kasım. 2020.
18. *Noncommunicable diseases country profiles 2014. Geneva: World Health Organization;2014*
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/128038/1/9789241507509_eng.pdf. 10 Kasım2020.

19. *Diabetes country profiles 2016*. Geneva: World Health Organization; 2016
(http://www.who.int/diabetes/country-profiles/tur_en.pdf?ua=1 10 Kasım 2020.
20. Bartelt A, Merkel M, Heeren J. A new, powerful player in lipoprotein metabolism: brown adipose tissue. *J Mol Med (Berl)*. 2012, 90 : 887-93.
21. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et. al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*, 2011, 17 : 200-205.
22. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, et. al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*, 2013, 28: 169-80.
23. Arikoglu H. Tip 2 diyabetin moleküler genetik temeli; Son gelişmeler. *Genel Tıp Dergisi*. 2015, 25: 147.
24. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson A, et. al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet*, 2010, 42: 105-16.
25. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, et. al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*, 2008, 40: 1092-7.
26. Metabolik Hastalıklar ve Obezite <http://www.bilgehastanesi.com/metabolik-hastaliklar.asp> 10 Kasım 2020
27. Bishop K S, Ferguson LR. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrient.s*. 2015, 7 : 922-47.
28. Choi SW, Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr*. 2010, 1: 8-16.

29. Kürekçi GK, Bunsuz M, Önal M, Dinçer P., Kazanılmış Epigenetik Değişikliklerin Kalıtımı ve Hastalıklara Yatkınlıktaki Rolü. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*. 2017, 80: 1
30. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997, 29 :1305-12.
31. Van Nimwegen E. Scaling laws in the functional content of genomes. *Trends Genet*. 2003, 19 :479-84.
32. Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struct Biol*. 2004, 14 : 283-91.
33. Brivanlou AH, Darnell Jr JE. Signal transduction and the control of gene expression. *Science*. 2002, 295: 813-8.
34. Arbiza L, Gronau I, Aksoy B. A, Hubisz, MJ, Gulko B, Keinan A, Siepel A. Genome-wide inference of natural selection on human transcription factor binding sites. *Nat Genet*. 2013, 45 :723-9.
35. Jones S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol*. 2004, 5: 226.
36. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*. 2005, 87: 81-6.
37. Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Letters*. 2008, 582 : 68-73.
38. Towle HC. Glucose and cAMP: adversaries in the regulation of hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98 :13476-8.

39. Linden AG, Li S, Choi HY, Fang F, Fukasawa M, Uyeda K, et. al. Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice. *J Lipid Res*, 2018, 59: 475-487.
40. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 2006, 124: 35-46.
41. Rawson RB. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003, 4: 631-40.
42. Shao W, Espenshade PJ. Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell Metab* 2012, 16 : 414-9.
43. Osborne TF, Espenshade PJ. Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes Dev*. 2009, 23: 2578-91.
44. Moore KJ, Rayner KJ, Suárez Y, Fernández-Hernando C. The role of microRNAs in cholesterol efflux and hepatic lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2011, 31: 49-63.
45. Multivalent regulation of SREBPs
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466394/figure/F1/> 05 Kasım 2020.
46. Brown goldstein Lab.
<http://www4.utsouthwestern.edu/moleculargenetics/pages/gold/current.html>. 15 Kasım 2020 .
47. Nohturfft A, Losick R. Fats, Flies, and Palmitate. *Science*. 2002, 296: 857-858.
48. Flybase. https://flybase.org/reports/FBgn0032940#general_information_sub. 15 Kasım 2020.
49. Flybase. <https://flybase.org/reports/FBgn0039509>. 15 Kasım 2020.
50. Flybase. <https://flybase.org/reports/FBfr0229877>. 15 Kasım 2020.

51. Mattila J, Havula E, Suominen E, Teesalu M, Surakka I, Hynynen R, et. al. Mondo-Mlx Mediates Organismal Sugar Sensing through the Gli-Similar Transcription Factor Sugarbabe. *Cell Rep*, 2015, 13: 350-64.
52. Nelson LD, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company. Fifth Edition. 2008.
53. Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Oliver Doll J, Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of β -subunit. *Nature*. 1994, 369 : 289-294.
54. Perney TM, Kaczmarek LK. The molecular biology of K⁺ channels. *Curr Opin Cell Biol*. 1991, 3: 663-70.
55. Horvath CM, Stark GR, Kerr IM, Darnell Jr JE. Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol*. 1996, 16 : 6957-64.
56. Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. *Nature*. 1988, 332 : 837-839.
57. Jentsch TJ. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci*. 2000, 1 : 21-30.
58. Li XN, Herrington J, Petrov A, Ge L, Eiermann G, Xiong Y, et. al. The role of voltage-gated potassium channels Kv2.1 and Kv2.2 in the regulation of insulin and somatostatin release from pancreatic islets. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013, 344: 407-16.
59. Olesen, M. S.; Nielsen, M. W.; Haunsø, S.; Svendsen, J. H., Atrial fibrillation: the role of common and rare genetic variants. *Eur J Hum Genet* **2014**, 22 (3), 297-306.

60. Evseev, A.; Semenov, I.; Archer, C.; Medina, J.; Dube, P.; Shapiro, M.; Brenner, R., Functional effects of KCNQ K⁺ channels in airway smooth muscle. *Frontiers in Physiology*. 2013, 4: 277.
61. Martel P, Leo D, Fulton S, Bérard M, Trudeau LE. Role of Kv1 potassium channels in regulating dopamine release and presynaptic D2 receptor function. *PLoS One*. 2011, 6 : 20402.
62. Alzamora R, Gong F, Rondanino C, Lee JK, Smolak C, Pastor-Soler NM, Hallows K. AMP-activated protein kinase inhibits KCNQ1 channels through regulation of the ubiquitin ligase Nedd4-2 in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299: 1308-19.
63. Shi L, Zheng H, Zheng H, Borkowski BA, Shi D, Gonen T, Jiang QX. Retraction for Shi et al., "Voltage sensor ring in a native structure of a membrane-embedded potassium channel". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 7097.
64. Ocorr K, Reeves NL, Wessells RJ, Fink M, Chen HS, Akasaka T, et. al. KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 3943-8.
65. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 2006, 440:463-9.
66. Wang KW, Tai KK, Goldstein SA. MinK residues line a potassium channel pore. *Neuron*. 1996, 16 : 571-7.
67. Brown DA, Passmore GM. Neural KCNQ (Kv7) channels. *Br J Pharmacol* 2009, 156 : 1185-95.
68. Miceli F, Soldovieri MV, Martire M, Taglialatela M. Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Curr Opin Pharmacol*. 2008, 8 : 65-74.

69. Schwarz TL, Tempel BL, Papazian DM, Jan Y N, Jan LY. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*. *Nature*. 1988, 331 (6152), 137- 42.
70. Attali B, Romey G, Honoré E, Schmid-Alliana A, Mattéi MG, Lesage F, et. al. Cloning, functional expression, and regulation of two K⁺ channels in human T lymphocytes. *J Biol Chem*, 1992, 267: 8650-7.
71. Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*. 2000, 1: 4, Reviews0004.
72. Salkoff L, Wyman R. Genetic modification of potassium channels in *Drosophila* Shaker mutants. *Nature*. 1981, 293: 228-230.
73. Wu, C. F.; Haugland, F. N., Voltage clamp analysis of membrane currents in larval muscle fibers of *Drosophila*: alteration of potassium currents in Shaker mutants. *J Neurosci*: 1985, 5 : 2626-40.
74. Butler A, Wei AG, Baker K, Salkoff L. A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science*. 1989, 243 : 943-7.
75. Wei A, Covarrubias M, Butler A, Baker K, Pak M, Salkoff L. K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science*. 1990, 248 : 599-603.
76. Tsunoda S, Salkoff L. The major delayed rectifier in both *Drosophila* neurons and muscle is encoded by Shab. *J Neurosci*. 1995, 15 : 5209-21.
77. Chopra M, Gu GG, Singh S. Mutations affecting the delayed rectifier potassium current in *Drosophila*. *J Neurogenet*. 2000, 14 : 107-23.
78. Hegde P, Gu GG, Chen D, Free SJ, Singh S. Mutational analysis of the Shab-encoded delayed rectifier K(+) channels in *Drosophila*. *J Biol Chem*. 1999, 274 : 22109-13.

79. Singh A, Singh S. Unmasking of a novel potassium current in *Drosophila* by a mutation and drugs. *J Neurosci*. 1999, 19 : 6838-43.
80. Peng IF, Wu CF. Differential contributions of Shaker and Shab K⁺ currents to neuronal firing patterns in *Drosophila*. *J Neurophysiol*. 2007, 97 : 780-94.
81. Ueda A, Wu CF. Distinct frequency-dependent regulation of nerve terminal excitability and synaptic transmission by IA and IK potassium channels revealed by *Drosophila* Shaker and Shab mutations. *J Neurosci*. 2006, 26: 6238-48.
82. Frolov RV, Berim IG, Singh S. Inhibition of delayed rectifier potassium channels and induction of arrhythmia: a novel effect of celecoxib and the mechanism underlying it. *J Biol Chem*. 2008, 283: 1518-24.
83. Ordög B, Brutyó E, Puskás LG, Papp JG, Varró A, Szabad, J, Boldogkoi Z. Gene expression profiling of human cardiac potassium and sodium channels. *Int J Cardiol*. 2006, 111 : 386-93.
84. Wareing M, Greenwood SL, Fyfe G K, Baker PN, Taggart MJ. Glibenclamide inhibits agonist-induced vasoconstriction of placental chorionic plate arteries. *Placenta* 2006, 27 : 660-8.
85. Pinto LH, Klumpp DJ. Localization of potassium channels in the retina. *Prog Retin Eye Res*. 1998, 17 : 207-30.
86. Yan L, Figueroa DJ, Austin CP, Liu Y, Bugianesi RM, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, Kohler MG. Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets. *Diabetes*. 2004, 53 : 597-607.
87. Wang W, Hino N, Yamasaki H, Aoki, T.; Ochi, R., KV2.1 K⁺ channels underlie major voltage-gated K⁺ outward current in H9c2 myoblasts. *Jpn J Physiol* 2002, 52: 507-14.

88. Patel AJ, Lazdunski M, Honoré E. Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K⁺ channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *Embo j* 1997, 16 : 6615-25.
89. Hodge JJ, Choi JC, O'Kane CJ.; Griffith, L. C., Shaw potassium channel genes in *Drosophila*. *J Neurobiol.* 2005, 63 : 235-54.
90. Hodge JJ, Stanewsky R. Function of the Shaw potassium channel within the *Drosophila* circadian clock. *PLoS One.* 2008, 3 : e2274.
91. Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron*, 1991, 7: 763-73.
92. Yu D, Feng C, Guo A. Altered outward K(+) currents in *Drosophila* larval neurons of memory mutants rutabaga and amnesiac. *J Neurobiol.* 1999, 40 : 158-70.
93. Rivera JF, Ahmad S, Quick MW, Liman ER, Arnold DB. An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K⁺ channels mediates dendritic targeting. *Nat Neurosci.* 2003, 6 : 243-50.
94. Singh B, Ogiwara I, Kaneda M, Tokonami N, Mazaki E, Baba K, Matsuda K, Inoue Y, Yamakawa K. A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*, 2006, 24: 245-53.
95. Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S. Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol.* 2007, 582 : 675-93.
96. Gaborit N, Wichter T, Varro A, Szuts V, Lamirault G, Eckardt L, et. al. Transcriptional profiling of ion channel genes in Brugada syndrome and other right ventricular arrhythmogenic diseases. *Eur Heart J*, 2009, 30: 487-96.
97. Giudicessi JR, Ye D, Tester DJ, Crotti L, Mugione A, Nesterenko VV et. al. Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-

- encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhyth*, 2011, 8: 1024-32.
98. Refaat M, Chemaly E, Lebeche D, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Ventricular arrhythmias after left ventricular assist device implantation. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2008, 31 : 1246-52.
99. Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Wietes M.; Grandjean JGet. al. Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K⁺ channels. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37: 926-32.
100. Kohler RE. Drosophila and evolutionary genetics: the moral economy of scientific practice. *Hist Sci*. 1991, 29 : 335-75.
101. Carolina Biological Drosophila manual. <https://www.carolina.com/flies/drosophila-manual-carolina/452620.pr>. 15 Kasım 2020.
102. Uysal H, Şişman T, Aşkın H. *Drosophila Biyolojisi ve Çaprazlama Yöntemleri*. Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat fakültesi Ofset Tesisleri: Erzurum, 2006.
103. Yazıcı S. Potasyum iyon kanallarının drosophila kalp yetmezliği modelinde test edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi Erzurum, 2018.
104. Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, et. al. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. *Nature*, 2007, 448: 151-6.
105. Drosophila
[https://tr.wikipedia.org/wiki/Drosophila#/media/Dosya:Drosophila_melanogaster_-_side_\(aka\).jpg](https://tr.wikipedia.org/wiki/Drosophila#/media/Dosya:Drosophila_melanogaster_-_side_(aka).jpg) 15 Kasım 2020.

106. Kim SK, Rulifson EJ. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature*. 2004, 431 : 316-20.
107. Rulifson EJ, Kim SK, Nusse R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science*. 2002, 296 : 1118-20.
108. Akdemir F, Farkas R, Chen P, Juhasz G, Medved'ová L, Sass M, Wang Let. al. Autophagy occurs upstream or parallel to the apoptosome during histolytic cell death. *Development*, 2006, 133: 1457-65.
109. Chew SK, Akdemir F, Chen P, Lu W-J, Mills K, Daish T, Kumar S, et. al. The Apical Caspase dronc Governs Programmed and Unprogrammed Cell Death in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 2004, 7: 897-907.
110. *Drosophila* Melanogaster
https://www.wikiwand.com/en/Drosophila_melanogaster 15 Kasım 2020.
111. <https://drososchools.files.wordpress.com/2015/04/drosophilachromosomes.jpg>
15 Kasım 2020.
112. Wolf MJ, Rockman HA. *Drosophila*, genetic screens, and cardiac function. *Circ Res*, 2011, 109 : 794-806.
113. Çakır Ş, Sarıkaya R. Bazı organik fosforlu insektisitlerin *Drosophila melanogaster*'in yaşama yüzdesi üzerine etkisi. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*. 2004, 24: 71-80.
114. Bernards A, Hariharan IK. Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*. 2001, 11 : 274-8.
115. Chien S, Reiter LT, Bier E, Gribskov M. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30 : 149-51.
116. Pandey UB, Nichols CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev*, 2011, 63 : 411-36.

117. Ugur B, Chen K, Bellen HJ. Drosophila tools and assays for the study of human diseases. *Dis Model Mech*. 2016, 9 : 235-44.
118. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993, 118 : 401-15.
119. Kakidani H, Ptashne M. GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell*. 1988, 52 : 161-7.
120. Webster N, Jin JR, Green S, Hollis M, Chambon P. The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell*. 1988, 52 : 169-78.
121. Cho KS, Bang SM, Toh A. Lipids and Lipid Signaling in Drosophila Models of Neurodegenerative Diseases. Watson RR, De Meester F(eds). In *Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health*, Boston, Academic Press, 2014: 327-336.
122. Caygill EE, Brand AH. The GAL4 System: A Versatile System for the Manipulation and Analysis of Gene Expression. Dahmann, C (Ed). In *Drosophila: Methods and Protocols*, New York, Springer New York, NY, 2016: pp 33-52.
123. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
124. RNAi Libraries. https://stockcenter.vdrc.at/control/library_rnai. 15 Kasım 2020.
125. Fritz JH, Girardin SE, Philpott DJ. Innate immune defense through RNA interference. *Sci STKE*, 2006, 339: 27.
126. Saleh MC, Tassetto M, Van Rij RP, Goic B, Gausson V, Berry B, et. al. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 2009, 458: 346-50.

127. Xu J, Cherry S. Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol*. 2014, 42 : 67-84.
128. Kaya-Çopur A, Schnorrer F. A Guide to Genome-Wide In Vivo RNAi Applications in *Drosophila*. *Methods Mol Biol*, 2016, 1478: 117-143.
129. Perrimon N, Ni JQ, Perkins L. In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010, 2 : a003640.
130. Ni JQ, Markstein M, Binari R, Pfeiffer B, Liu LP, Villalta C, et. al. Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods*, 2008, 5: 49-51.
131. Saxena R, Voight B, Lyssenko V, Burt N, de Bakker P, Chen, H, et. al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science (Washington)* 2007, 316: 1331-1336.
132. Scott L, Mohlke K, Bonnycastle L, Willer C, Li Y, Duren W, et. al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*, 2007, 316: 1341.
133. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et. al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 2007, 445: 881-885.
134. Wang H, Miao K, Zhao J, Liu L, Cui G, Chen C, et. al. Common variants in *KCNQ1* confer increased risk of type 2 diabetes and contribute to the diabetic epidemic in East Asians: a replication and meta-analysis. *Ann Hum Genet*, 2013, 77: 380-91.
135. García-Chapa EG, Leal-Ugarte E, Peralta-Leal V, Durán-González J, Meza-Espinoza JP. Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes in Mexican Mestizos. *Biomed Res Int*, 2017: 1-10.

136. Kido Y. Gene-environment interaction in type 2 diabetes. *Diabetol Int.* 2017, 8 : 7-13.
137. Kumar S, Aswal VK, Agrawal RP, Quoseena M, Jillellamudi C, Kapur S, Toshani NC. SNP in KCNQ1 Gene is Associated with Susceptibility to Diabetic Nephropathy in Subjects with Type 2 Diabetes in India. *J Assoc Physicians India*, 2018, 66: 58-61.
138. Ao D, Wang HJ, Wang LF, Song JY, Yang HX, Wang Y. The rs2237892 Polymorphism in KCNQ1 Influences Gestational Diabetes Mellitus and Glucose Levels: A Case-Control Study and Meta-Analysis. *PLoS One*, 2015, 10: e0128901.
139. Fatima SS, Chaudhry B, Khan TA, Farooq S. KCNQ1 rs2237895 polymorphism is associated with Gestational Diabetes in Pakistani Women. *Pak J Med Sci*, 2016, 32: 1380-1385.
140. Church C, Lee S, Bagg EA, Mc Taggart JS, Deacon R, Gerken T, et. al. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000599.
141. Lee SM, Baik J, Nguyen D, Nguyen V, Liu S, Hu Z, Abbott GW. Kcne2 deletion impairs insulin secretion and causes type 2 diabetes mellitus. *Faseb j* 2017, 31 : 2674-2685.
142. Kunte AS, Matthews KA, Rawson RB. Fatty acid auxotrophy in Drosophila larvae lacking SREBP. *Cell Metab.* 2006, 3 : 439-48.
143. Rawson RB, Cheng D, Brown MS, Goldstein JL. Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding proteins at site 1. *J Biol Chem.* 1998, 273 : 28261-9.

- 144.** Calloe K, Nielsen MS, Grunnet M, Schmitt N, Jorgensen NK. KCNQ channels are involved in the regulatory volume decrease response in primary neonatal rat cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1773 : 764-73.
- 145.** Grunnet M, Jespersen T, MacAulay N, Jørgensen NK, Schmitt N, Pongs O, Olesen SP, Klaerke DA. KCNQ1 channels sense small changes in cell volume. *J Physiol*. 2003, 549 : (Pt 2), 419-27.
- 146.** Hammami S, Willumsen NJ, Olsen HL, Morera FJ, Latorre R, Klaerke DA. Cell volume and membrane stretch independently control K⁺ channel activity. *J Physiol* 2009, 587: 2225-31.
- 147.** Hougaard C, Klaerke DA, Hoffmann EK, Olesen SP, Jorgensen NK. Modulation of KCNQ4 channel activity by changes in cell volume. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1660: 1-6.
- 148.** Wang WA, Liu WX, Durnaoglu S, Lee SK, Lian J, Lehner R, Ahnn J, Agellon LB, Michalak M. Loss of Calreticulin Uncovers a Critical Role for Calcium in Regulating Cellular Lipid Homeostasis. *Sci Rep*. 2017, 7 : 5941.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Gökhan BİLGİN
Doğum tarihi:	18 Temmuz 1976
Doğum Yeri:	ERZURUM
Medeni Hali:	Evli
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Erzurum İl Sağlık Müdürlüğü Şerifefendi Aile Sağ. Mer.
Tel:	05053467128
Faks:	-
E-mail:	gokhan.bilgin15@ogr.atauni.edu.tr
Eğitim	
Lise:	Erzurum Anadolu Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Yüksek lisans:	
Doktora:	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Almanca:	-
Rusça:	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Erzurum Aile Hekimleri Derneği	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Futbol, Kayak, Mobilya ve dekorasyon Doğa ve kültürel geziler	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Tıbbi Biyoloji Ana bilim dalında Doktora Tezi olarak Dr Öğr Üyesi Fatih AKDEMİR danışmanlığında sunulan “İki Farklı Lipid Metabolizması İndikatörüne KCNQ Geninin Yok Edilmesinin Etkisinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre yazıldığını, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	10	15
Genel Bilgiler	6	30
Materyal ve Metod	1	35
Bulgular	0	10
Tartışma	0	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 22 / 12/ 2020

Gökhan Bilgin

Fatih AKDEMİR

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Fen ve Mühendislik Bilimleri Etik Kurul Başkanlığı



Sayı : 60665420-000-E.1900316877
Konu : Etik Kurul Onay Talebi Sonucu
(Dr.Öğr.Üyesi Fatih AKDEMİR)

04.11.2019

HUKUK MÜŞAVİRLİĞİNE

İlgi : 22.10.2019 tarihli ve 77040475-000-E.1900301041 sayılı belge.

İlgi'de kayıtlı yazınız ile; Üniversitemiz Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyoloji Bölümü doktora öğrencisi *Gökhan BİLGİN*'in yürütücülüğünde **Dr.Öğr.Üyesi Fatih AKDEMİR** danışmanlığında yapılacak olan "**İki Farklı Lipid Metabolizması İndikatörüne KCNQ Geninin Yok Edilmesinin Etkisinin Araştırılması**" konulu proje çalışması için Etik Kurul uygunluk-onay belgesi talebine ilişkin Fen ve Mühendislik Bilimleri Etik Kurulunun 01.11.2019 tarih ve 13 sayılı oturumunda alınan 18 no'lu kararı aşağıya çıkarılmıştır.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof.Dr. Cavit KAZAZ
Kurul Başkanı

Karar-18) Hukuk Müşavirliğinin; Üniversitemiz Temel Tıp Bilimleri Tıbbi biyoloji Bölümü doktora öğrencisi *Gökhan BİLGİN*'in yürütücülüğünde **Dr.Öğr.Üyesi Fatih AKDEMİR** danışmanlığında yapılacak olan "**İki Farklı Lipid Metabolizması İndikatörüne KCNQ Geninin Yok Edilmesinin Etkisinin Araştırılması**" konulu proje çalışması için Etik Kurul uygunluk-onay belgesi talebine ilişkin 22.10.2019 tarih ve E.1900301041 sayılı yazısı görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; Doktora öğrencisi *Gökhan BİLGİN* yürütücülüğünde yapılacak olan "**İki Farklı Lipid Metabolizması İndikatörüne KCNQ Geninin Yok Edilmesinin Etkisinin Araştırılması**" konulu proje çalışması ile ilgili olarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alındığında, konuyla ilgili çalışmaların gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel yönden sakınca bulunmadığına mevcut oy birliği ile **Karar verildi.**

Ek : 1.11.2019 tarihli 60665420-000-E.1900313670 sayılı belge

Atatürk Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Etik Kurul Başkanlığı 25240
Yakutiye/ERZURUM

E-Posta: Muhammet.alan@atauni.edu.tr



Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=B359BA96555>