

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**R316Q MUTASYONUNU TAŞIYAN FTO PROTEİNİNİN 3T3-L1 HÜCRE  
HATTINDAKİ PROTEOM DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Nil GÜZEL

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2016

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**R316Q MUTASYONUNU TAŞIYAN FTO PROTEİNİNİN 3T3-L1 HÜCRE  
HATTINDAKİ PROTEOM DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Nil GÜZEL

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAÇ

KOCAELİ

2016

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

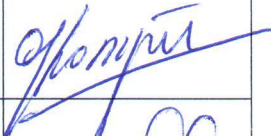

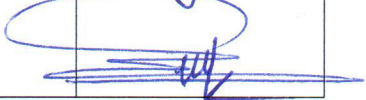
Tez adı: **R316Q Mutasyonunu Taşıyan FTO Proteininin 3T3-L1 Hücre Hattındaki Proteom Düzeyinde Araştırılması**

Tez yazarı: Nil Güzel

Tez savunma tarihi: 17.05.2016

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M.Doğan Gülkaç

İş bu çalışma Jürimiz tarafından **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Başkan	Prof. Dr. Gönül Kanıgür	
Danışman	Prof. Dr. M. Doğan Gülkaç	
Üye	Prof. Dr. Murat Kasap	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Amaç

Fat mass and obesity-associated protein (FTO) DNA ve RNA'yı oksidatif olarak demetile eden bir enzimdir. FTO'nun katalitik aktivitesinin araştırıldığı birçok çalışma olmasına rağmen FTO'nun varlığı veya yokluğunun hücre proteomuna etkisi henüz çalışılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, mutant (R316Q) ve yabancı FTO proteinlerinin 3T3-L1 hücrelerinin soluble proteomunda yaratacağı olası değişiklikleri araştırmaktır.

### Yöntem

Yabancı ve mutant FTO proteinlerini eksprese eden 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen protein lizatları DIGE deneyinde kullanıldı. Farklılık gösteren protein spotları jellerden kesilerek MALDI-TOF/TOF ile tanımlandı.

### Bulgular

Karşılaştırılan jellerde 300'den fazla protein spotu belirlenmiş fakat bunlardan sadece sekiz tanesi jeller arasında farklılık göstermiştir. Bu proteinlerden bazıları yapısal proteinler olup yabancı tip FTO ekspresyonu sonrası artışları çok düşük seviyededir. Diğer taraftan tanımlanan bu proteinlerden bir tanesi olan heteronuclear ribonucleoprotein K (HNRPK)'nın ekspresyonu hem mutant hem de yabancı FTO ekspresyonu sonrası 3 kat artmıştır.

### Sonuç

3T3-L1 hücrelerinde FTO ekspresyonuna bağlı HNRPK seviyesinde artış görülmüştür. Bu sonuç, HNRPK'nın pre-mRNA işlenmesi, hnRNA'nın nükleer mekanması, DNA hasarına p53/TP53 cevabı gibi oldukça önemli fizyolojik fonksiyonlara katılan multifonksiyonel bir protein olması açısından değerlidir.

**Anahtar Sözcükler:** FTO, Obezite, 2DE-DIGE Proteomiks, RNA Metilasyonu

## **ABSTRACT**

### **Objective**

Fat mass and obesity-associated protein (FTO) is an enzyme that oxidatively demethylates DNA. Although there are numerous studies regarding its catalytic function, the overall existence or absence of FTO on cellular proteome has not been investigated. The purpose of this study, thus, was to investigate the changes in soluble proteome of 3T3-L1 cells upon expression of WT and the mutant (R316Q) FTO proteins.

### **Methods**

3T3-L1 cells expressing either WT or the mutant FTO proteins were used in DIGE experiments. Spots displaying differences in their abundancies were cut from the gels and identified by MALDI-TOF/TOF.

### **Results**

More than 300 protein spots were detected on the gels but there were only eight spots displayed differences in their abundancies. Some of these protein spots arose from structural proteins and their increase was barely evident after expression of WT-FTO protein. On the other hand, one of those protein spots that belonged to heteronuclear ribonucleoprotein K (HNRPK) displayed a more than 3-fold increase in its abundancy when both WT and the mutant proteins were expressed.

### **Conclusions**

We demonstrated an increase in HNRPK levels upon FTO expression. This finding may be very important since HNRPK is a multifunctional protein involving several important physiological functions including pre-mRNA processing, nuclear metabolism of hnRNAs and p53/TP53 response to DNA damage.

**Anahtar Sözcükler:** FTO, Obesity, 2DE-DIGE Proteomics, RNA Methylation

## TEŞEKKÜR

Değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAÇ' a bana bu değerli çalışmada bulunma fırsatı verdiği için minnettarım.

Yüksek lisans öğrenimimde çok emeği geçen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Murat KASAP' a teşekkür ederim. Bu değerli insanın araştırmacılığı, yüksek analiz yeteneği ve hiçbir zaman esirgemediği desteği bu tez çalışmasının tamamlanmasında büyük rol oynamıştır. Her zaman konulara ve durumlara akılcı yaklaşımıyla yeni bir soluk getiren değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Gürler AKPINAR' a, yaptığı araştırmaları ve çalışmalarını benimle paylaşan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Aylin KANLI' ya desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Laboratuvar arkadaşlarım Ar. Gör. Kübra KARAOSMANOĞLU, Ayimugu ABULA, Mehin ZÜLFİGAROVA, Ar. Gör. Eylül Ece İŞLEK ve Mert SELİMOĞLU' na tükenmeyen enerjileri ve sonsuz destekleri için teşekkür ederim.

Bilgisayar ve teknik konulardaki desteği için hastanemizin bilgi işlem bölümünde çalışan arkadaşım Bektaş Bozkurt'a ve beni akademik alanda ilerlemem için yüreklendiren nükleer tıp asistanı arkadaşım Dr. Türkay HEKİMSOY' a, mikrobiyoloji anabilim dalı asistanları Ar. Gör. Hüseyin UZUNER' e ve Ar. Gör. Doğan Han ER' e çok teşekkür ederim.

Son olarak annem Fedva, babam Sabahattin, ağabeyim Selahattin GÜZEL' e maddi-manevi tüm desteklerinden ve bana olan inançlarını hiçbir zaman kaybetmediklerinden ötürü teşekkürü bir borç bilirim.

## **TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLGİSİ**

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan bilgi ve çizimler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir intihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.



# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLGİSİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1. 1. Obezite.....	1
1. 2. <i>fto</i> Geni.....	2
1. 2. 1. <i>fto</i> Geni ve Obezite.....	3
1. 2. 3. FTO Proteini ve Fonksiyonu.....	4
1. 2. 4. İnsanlarda ve Fare Modellerinde FTO ile İlgili Çalışmalar.....	5
2. AMAÇ.....	11
3. GEREÇ – YÖNTEM.....	12
3. 1. Besiyeri ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	12
3. 1. 1. Lauria-Bertani (LB) Besiyeri.....	12
3. 1. 2. Zengin Sıvı Besiyeri.....	12
3. 1. 3. Antibiyotikli Besiyeri.....	12
3. 2. Kullanılan Nükleik Asit Teknikleri.....	12
3. 2. 1. Kandan RNA İzolasyonu.....	12
3. 2. 2. cDNA Sentezi.....	13
3. 2. 3. Yabancı Tip <i>fto</i> Geninin PZR ile Çoğaltılması.....	13
3. 2. 4. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Yürütülmesi.....	14
3. 2. 5. DNA Parçalarının Agaroz Jelden İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	15
3. 2. 6. DNA Parçalarının Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi.....	15
3. 2. 7. DNA Parçalarının Etanol Çöktürmesi ile Temizlenmesi.....	16
3. 2. 8. DNA Parçalarının (insert) Vektör DNA'ya Ligasyonu.....	16
3. 2. 9. Elektrokompentent <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması.....	16
3. 2. 10. Elektrokompentent <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyon.....	17



3. 2. 11. Plazmit İzolasyonu.....	17
3. 2. 12. <i>E. coli</i> Hücrelerinden Endotoksin İçermeyen Plazmit İzolasyonu .....	18
3. 2. 13. DNA Konsantrasyonunun Ölçümü .....	18
3. 2. 14. Dizileme ve Dizi Analizi .....	18
3. 3. Klonlamalar .....	19
3. 3. 1. Yabancı Tip Rekombinant Vektör Klonunun Eldesi .....	19
3. 3. 2. Mutant Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi .....	19
3. 4. Hücre Kültürü.....	20
3. 4. 1. Hücrelerin Büyütülmesi .....	20
3. 4. 2. Hücrelerin Dondurulması .....	20
3. 4. 3. Hücrelerin Çözülmesi .....	21
3. 4. 4. Hücrelerin Pasajlanması.....	21
3. 4. 5. Lipofectamin 3000 ile Transient Ekspresyon Yapan Hücrelerin Oluşt.....	21
3. 5. Protein Analizleri.....	22
3. 5. 1. 3T3-L1 Hücrelerinden Protein Özütlelerinin Hazırlanması .....	22
3. 5. 2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi .....	23
3. 5. 3. SDS-PAGE Protein Jel Elektrofrezisi... ..	23
3. 5. 4. Western Blotlama.....	25
3. 6. Kullanılan Proteomiks Yöntemler .....	26
3. 6. 1. DIGE ve 2DE-Jel Elektrofrezisi .....	26
3. 6. 2. Jel İçindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi .....	27
3. 6. 3. Analizlerde Kullanılan Programlar .. ..	28
4. BULGULAR .....	29
4. 1. Yabancı Tip <i>fto</i> Geninin Eldesi, Görüntülenmesi ve Dizi Analizi .....	29
4. 2. Yabancı Tip <i>fto</i> PZR Ürününün Vektöre Klonlanması .....	30
4. 3. Mutant <i>fto</i> Geninin Eldesi.....	31
4. 4. Yabancı ve Mutant FTO Proteinini Eksprese Eden Hücrelerin Oluşturulması .....	32
4. 5. Mutant ve Yabancı Tip FTO Ekspresyonunun Gösterilmesi .....	32
4. 5. 1. 3T3-L1 Hücrelerinde Endojen FTO Ekspresyonu .....	33
4. 6. Yabancı ve Mutant FTO Proteinini Eksprese Eden Hücrelerin Proteom Analizi ....	36
4. 6. 1. 2DE-DIGE Metodu Kullanılarak Yapılan Karşılaştırmalı Analizler.....	36
4. 6. 2. 2DE-PAGE ile Regüle Olan Spotların Belirlenmesi ve Kesilmesi .....	38
4. 6. 1. 2DE-DIGE Metodu Kullanılarak Yapılan Karşılaştırmalı Analizler.....	36

4. 6. 3. Kesilen Protein Spotlarının MALDI-TOF/TOF ve IPA Analizleri .....	41
5. TARTIŞMA.....	45
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	51
7. KAYNAKÇA .....	52
8. ÖZGEÇMİŞ .....	56
9. EKLER.....	57



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2D	2 Dimentional
2-OG	2-oksoglutarat
3meT	3-metil timin
3meU	3-metil urasil
APS	Amonyum persülfat
BMI	Body Mass Index
cAMP	Siklik Adenozin monofosfat
cDNA	komplementer DNA
CREB	cAMP response element binding protein
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetraasidik asit
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
f <sup>6</sup> A	N <sup>6</sup> -formil adenzin
Ft	Fused toes
FTO	Fat mass and obesity associated protein
GWAS	Genome-wide association study
hm <sup>6</sup> A	N <sup>6</sup> -hidroksimetil adenzin
IAA	Iodoacetamide
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
LB	Luria-Bertani
m <sup>6</sup> A	N <sup>6</sup> -metil adenzin

MALDI-TOF/TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight/Time of Flight
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
mRNA	messenger RNA
NPY1	Neuropeptide receptor 1
OD	Optik dansite
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
ssDNA	Tek iplikli DNA
SNP	Single Nucleotide Polimorphism
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	Tris Buffer Salin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl) Phosphine
TEMED	Tetramethylethylenediamine
WHO	World Health Organisation

## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. <i>Fto</i> 'nun genomik organizasyonu ve komşu genler.....	3
Çizim 1.2. FTO'nun biyokimyasal aktivitesi .....	5
Çizim 3.1. Bölgeye yönlendirilmiş mutagenез deneyinin basit gösterimi.....	20
Çizim 4.1. PZR ile çoğaltılan <i>fto</i> geninin agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen jel görüntüsü .....	29
Çizim 4.2. Klonlama sonrası elde edilen transformantların 24 saat agar plate üzerinde büyütülmesi ile elde edilen koloniler.....	30
Çizim 4.3. Restriksiyon enzim kesimi sonrası insert ve vektörü görüntüleme amaçlı yürütülen agaroz jel görüntüleri.....	30
Çizim 4.4. <i>Fto</i> genine ait Vector NTI programı ile align edilerek elde edilen dizileme sonuçları.....	31
Çizim 4.5. Rekombinant vektörlerle oluşturulan hücrelerin petri tabaklarındaki ve ışık mikroskopundaki görüntüleri .....	32
Çizim 4.6. BSA ile oluşturulmuş standart eğri. Transfekte edilmiş hücrelerden 48 saat ekspresyon sonrası elde edilen lizatların protein konsantrasyonu bu eğri üzerinden hesaplanmıştır.....	33
Çizim 4.7. Protein konsantrasyon ölçümlerinin doğruluğunu verifiye edildiği SDS-PAGE jeli .....	34
Çizim 4.8 (A). anti-FTO ve anti- $\beta$ -aktin antikorları kullanılarak yapılan Western Blotlama sonucu elde edilen film görüntüsü (B). FTO bantlarının yoğunluk değerlerini gösteren kolon grafiği.....	35
Çizim 4.9. Transfekte edilmemiş 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen lizatlarla anti-FTO ve anti- $\beta$ -aktin antikorlarına karşı yapılan WB görüntüsü .....	35

<b>Çizim 4.10.</b> DIGE jellerinin Cy2, Cy3 ve Cy5 filtreleriyle alınan görüntüleri .....	37
<b>Çizim 4.11.</b> Cy boylarına uygun filtrelerle alınmış 2D jel görüntülerinin çakıştırılmasıyla elde edilen DIGE jeli görüntüsü.....	38
<b>Çizim 4.12.</b> Regüle olduğu belirlenen spotların 3D görüntüleri.....	39
<b>Çizim 4.13.</b> Kesilen spotların jel üzerindeki yerleri.....	40
<b>Çizim 4.14.</b> IPA analizi sonucu düzenlendiği belirlenen yolaklar.....	43
<b>Çizim 5.1.</b> Proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılmasını gösteren pasta grafiği.....	48



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> cDNA sentez reaksiyonu karışımı.....	13
<b>Çizelge 3.2.</b> Primer listesi ve PZR şartları.....	14
<b>Çizelge 3.3.</b> 1:3 oranında kurulan ligasyon reaksiyonu karışımı.....	16
<b>Çizelge 3.4.</b> Transfeksiyon için hazırlanan karışımlar.....	22
<b>Çizelge 3.5.</b> SDS-PAGE İçeriği.....	24
<b>Çizelge 3.6.</b> Western Blot analizinde kullanılan birincil ve ikincil antikorların listesi.....	26
<b>Çizelge 4.1.</b> Hazırlanan protein özütlerinin protein konsantrasyonları.....	34
<b>Çizelge 4.2.</b> DIGE deneyine ait deney tasarımı.....	36
<b>Çizelge 4.3.</b> MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinler.....	42
<b>Çizelge 4.4.</b> Mutant ve yabancı FTO'nun overeksprese edildiği örneklerde düzenlendiği belirlenen proteinlerin kontrol örneğine olan oranları.....	44

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Obezite

Dünya Sağlık Örgütü (WHO-World Health Organisation) obeziteyi bireylerdeki anormal ya da aşırı yağ birikimi olarak tanımlamaktadır. Bu tanıma göre WHO, vücut kitle indeksi (BMI-Body Mass Index) (bireyin kg cinsinden ağırlığının bireyin m cinsinden boyunun karesine oranı) 30'dan büyük olan tüm bireyleri obez kabul etmektedir. Günümüzün en büyük halk sağlığı sorunlarından biri obezitedir. Dünya erişkin popülasyonunun %58'den fazlasının 2030 yılına kadar aşırı kilolu veya obez olacağı tahmin edilmektedir.

Aşırı kilo ya da obezite; hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, solunum zorluğu, kanser gibi ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır (Despres and Lemieux, 2006; Galassi ve diğ., 2006; Pischon ve diğ., 2006). WHO'nun yaptığı araştırmalara göre her yıl en az 2,8 milyon insan obezite ya da aşırı kilo ile ortaya çıkan bu sorunların sonucu olarak hayatını kaybetmektedir (<http://www.who.int>).

Obezite, yaşam şekli ile yakından ilişkilidir. Bireylerin yaşamını kolaylaştıran günümüz teknolojisi yetersiz fiziksel aktivite ve sağlıksız beslenmeyi de beraberinde getirmiştir. Gelişen teknolojiyle obezite prevalansı 1980'lerden bu yana artmakta ve bahsi geçen ciddi sağlık problemlerini de beraberinde getirmektedir. Fakat obezitenin sadece hareketsiz yaşam tarzı ve sağlıksız beslenme ile ilişkili olmadığı, bazı genlerde meydana gelen genetik varyasyonların da obezitenin ortaya çıkmasında rol oynadığı artık bilinmektedir (Li ve diğ., 2014). GWAS yaklaşımı kullanılarak yapılan çalışmalar, *fto* (Fat mass and obesity associated) geninin obeziteye neden olan genlerden biri olduğunu göstermiştir (Frayling ve diğ., 2007; Scuteri ve diğ., 2007). FTO'nun kişinin beslenme tercihini ve kontrolünü değiştirerek obezite riskini artırdığı ileri sürülmektedir (Loos and Yeo, 2014). Ancak genetik faktörlerin ilgili genin ürünü olan proteine ne şekilde yansıdığı, bireyin vücut kitle indeksini hangi hücresel yolları kullanarak etkilediği ve özellikle adipoz dokuda hangi proteinlerle etkileşime girdiği henüz tam bir kesinlikle ortaya konulamamıştır. Obezitenin ve ilerleyen dönemde obeziteye bağlı olarak görülen hastalıkların oluşma mekanizmalarının daha belirgin şekilde ortaya konulabilmesi için genetik faktörler moleküler çalışmalarla desteklenmelidir. Kullanılan moleküler yaklaşımlardan birisi obezite ile ilişkili yabancıl ve mutant genlerin, bu genlerin protein ürünlerinin hücrede meydana getirdiği değişikliklerin karşılaştırmalı analizlerini yapmaktır. Gende oluşturulan mutasyonun proteinin

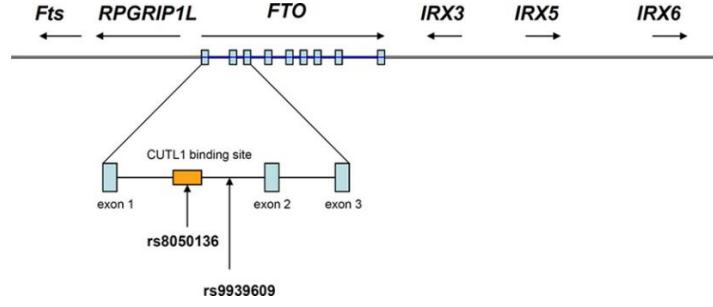


fonksiyonunu ne şekilde değiştirdiğinin yabani tip ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi, ilgili yolaklarda anahtar rol oynayan moleküllerin ortaya çıkarılmasına ve ilerleyen vadede biyohedef özelliği gösterebilecek proteinlerin belirlenmesine yardımcı olabilmektedir.

## 1.2 FTO Geni

*Fto* geni insanlarda 16q12.2 kromozomal gölgede lokalize dokuz ekzonlu 400kb'lik alan kaplayan büyük bir gendir. Günümüze dek obeziteyle ilgili tanımlanan bütün SNP'lerin, genin birinci intronunda lokalize olduğu ve bu bölgenin türler arasında son derece iyi korunduğu saptanmıştır (Loos and Bouchard, 2008). Evrimsel olarak, FTO sadece omurgalılar ve deniz yosunlarında bulunurken; omurgasızların tamamında, mantarlarda ve yeşil bitkilerde bulunmamaktadır (Robbens ve diğ., 2008; Sanchez-Pulido and Andrade-Navarro, 2007).

FTO'nun keşfi Hoeven ve ark. tarafından fare kromozomları ile yaptıkları deneylerle gerçekleşmiştir. Bu deneyde Fused toes (Ft) fare dominant mutasyonunu, ilk olarak, fare kromozomu 8'de 1.6 Mb'lik bir delesyona neden olan insersyonel mutagenesis ile oluşturulmuştur (van der Hoeven ve diğ., 1994). Bu mutasyon sonucu heterozigot Ft farelerin önkollarında kısmi sindaktili ve timik hiperplazi görölmüştür (van der Hoeven ve diğ., 1994). Homozigot Ft farelerde ise büyüme geriliği ve kroniyofasiyal yapıda ciddi malformasyonlarla beraber embriyonik dönemde ölüm görölmüştür (Anselme ve diğ., 2007). FTO, Ft farelerde delesyona uğratılan bölgedeki 6 genden biridir. İlk kez Peers ve ark. (1999) tarafından pozisyonel klonlama ile tespit edilmiş ve "Fatso" olarak adlandırılmıştır (Peters ve diğ., 1999). Bunu takiben, Frayling ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir GWAS çalışmasında, insan FTO geninde yaygın bir varyant tip 2 diyabet ve artmış vücut kitle indeksi için bir risk olarak tespit edilmiş ve vücut ağırlığı fenotipi ile ilişkisinden sonra *fto* (Fat mass and obesity-associated) geni olarak adlandırılmıştır (Frayling ve diğ., 2007).



**Cizim 1.1.** *Fto*'nun genomik organizasyonu ve komşu genler (Cheung and Yeo, 2011)

### 1.2.1 FTO Geni ve Obezite

Obezitenin monogenik formları, erken başlayan morbid obezitenin sadece % 5'ini oluşturur. Bu yüzden bireylerin büyük çoğunluğu için obeziteye genetik yatkınlığın poligenik olması muhtemeldir. Obezite için gerçek ve tekrarlanabilir ortak genetik varyantların tanımlanması uzun zaman almıştır. Yeterli büyüklükte çalışma gruplarını bir araya getirmek amacıyla uluslararası işbirliğiyle GWAS çalışmaları yapılmıştır (Tung and Yeo, 2011). Yapılan GWAS çalışmaları 30 farklı genin obezite ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Li ve diğ., 2014).

Ft fare modelinde delesyona uğratılan genlerden biri AlkB ailesine aittir ve insanda 16q12.2 pozisyonunda bulunur. Dokuz eksonlu 400 bç'lik bu genin varyasyonlarının (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79068>) obezite ile ilişkili olduğu birbirinden bağımsız üç farklı çalışma ile gösterilmiştir. Frayling ve ark. 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada BMI ve FTO varyantları arasındaki ilişki ve buna bağlı olarak fazla kilo sonrasında gelişen obezite farklı populasyonlarda araştırılmıştır. Elde ettikleri sonuçlar SNP rs9939609'da A allelinin tip 2 diyabet ile ilişkili olduğu, üstelik bu risk allelini homozigot halde taşıyan bireylerin BMI'lerinin bu alleli taşımayanlara göre daha yüksek olduğu görülmüş ve obezite geliştirme riskleri %31 olarak hesaplanmıştır (Frayling ve diğ., 2007). Bu çalışmayı destekler nitelikte 2007'de Dina ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada FTO geninin ilk intronunda yer alan 48 nötral SNP çalışılmış ve özellikle rs1121980'de T allelinin yetişkin obezitesi ile sıkı bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma FTO'nun ilk intronundaki varyasyonları (rs1421085 ve rs1787449) sadece yetişkin obezitesi ile değil aynı zamanda çocukluk dönemi obezitesi ile de ilişkilendirmiştir (Dina ve diğ., 2007). Gerken ve arkadaşları tarafından 2007'de izole Sardunya populasyonu ile yapılan GWAS çalışması

FTO genindeki rs9930506'de varyasyonun BMI ve total vücut ağırlığı ile doğrudan ve yüksek derecede ilişkili olduğunu göstermiştir (Gerken ve diğ., 2007).

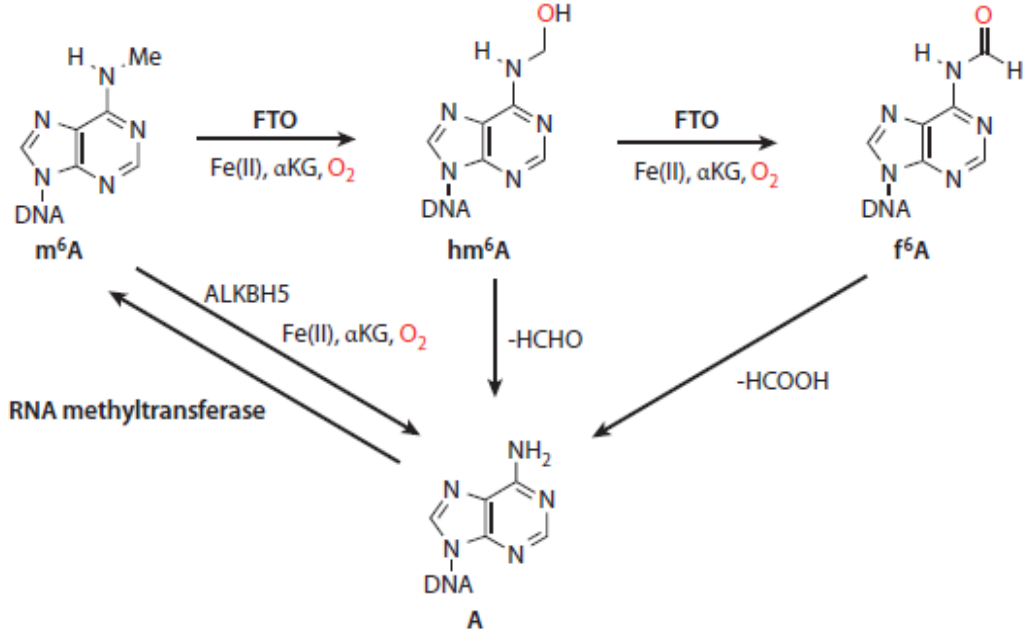
Bugün bu SNP'lerin FTO geninin ekspresyonunu veya kırılmasını etkileyip etkilemediği, FTO'nun ekspresyonuna veya fonksiyonuna yansımaları muhtemel değişikliklerin obezite ile ilişkisi hala açık değildir.

### 1.2.3 FTO Proteini ve Fonksiyonu

*Fto* geni, 505 amino asitlik bir protein kodlar ve omurgalılarda oldukça iyi korunmuştur. Bu gen hem fetal hücrelerde hem de yetişkin hücrelerinde eksprese olmakta ve beyinde en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmaktadır (Frayling ve diğ., 2007). FTO ekspresyonunun beyinde yüksek seviyede görülmesi iştahın kontrol edildiği hipotalamustan kaynaklanmaktadır.

Biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak yapılan çalışmalarda FTO proteininin memelilerde DNA tamir proteini olan ABH2 ve ABH3 ile yüksek dizi benzerliği gösterdiği ortaya konmuştur (Gerken ve diğ., 2007). Bu tamir proteinleri,  $Fe^{+2}$  ve 2- oxoglutarate (2-OG) bağımlı dioksijenaz ailesine aittir. Bu ailenin üyesi olan proteinler  $Fe^{+2}$  yi bir kofaktör olarak, 2-OG'yi ise bir kosubstrat olarak kullanarak ssDNA (3meA) ve RNA'da (3meU,  $m^6A$ ) demetilaz aktivitesi gösterirler. FTO demetilaz aktivitesi ile adenin molekülünün RNA Metil Transferaz tarafından metile edilmiş formu olan  $N^6$ -metil adenzin ( $m^6A$ )'i  $N^6$ -hidroksimetil adenzin'e ( $hm^6A$ ) ve  $hm^6A$ 'yı da  $N^6$ -formil adenzin'e ( $f^6A$ ) çevirir. Bu şekilde  $f^6A$  ve  $hm^6A$  indirgenerek tekrar moleküldeki orijinal form olan adenine dönüşür (Çizim 2.1) (Shen ve diğ., 2014). Daha sonra yapılan çalışmalar DNA ve RNA 'da bulunan  $N^6$ - metil adenzinin FTO'nun 3meU ya oranla 50 kat daha fazla tercih edildiği ve bu nedenle FTO nun majör substratı olduğu gösterilmiştir (Jia ve diğ., 2011). Jia ve ark tarafından yapılan bu çalışmada FTO'nun kısmen "nükleer splicing speckle faktörler" (SART1 ve SC35) ve Ser2'de fosforile olan RNA polimeraz II ile birlikte lokalize olduğu, fakat telomerazlar, replikasyon site, Cajal Cisimciği, cleavage cisimciği veya P-cismi gibi nükleer alt bölgelerde görülmediğini bulmuşlardır. Bu bulgulara dayanarak araştırmacılar, FTO fonksiyonunun muhtemelen pre-mRNA ve/veya diğer nükleer RNA'ların işlenmesini etkileyebileceği ve RNA epigenetik modifikasyonlarında gerekli olabileceği sonucuna varmışlardır. Aynı grup tarafından 2013 yılında yapılan çalışmada, FTO'nun demetilaz

aktivitesinin geri dönüşlü ve dinamik olarak düzenlenebiliyor olması, RNA metilasyonunun gen ekspresyonu ve hücrenin akıbetinin belirlenmesinin çevresel sinyallere hızlı bir şekilde cevap oluşturulmasını sağlayan RNA bağımlı hücresel yolları kontrol ettiğini göstermektedir (Jia ve diğ., 2013).



**Çizim 1.2.** FTO'nun biyokimyasal aktivitesi (Shen ve diğ., 2014)

### 1.2.4 İnsanlarda ve Fare Modellerinde FTO ile İlgili Çalışmalar

FTO'nun fonksiyonel özelliklerine dair bilgiler, insanlarda FTO mutasyonlarının analiz edilmesiyle kazanılmıştır. Boissel ve ark. akraba evlilikleri olan Filistinli büyük bir ailenin dokuz bireyinde *fto* geninde fonksiyon-kayıbı mutasyonu bulmuşlardır (Boissel ve diğ., 2009). Etkilenen bireylerin tamamı, nonsinonim homozigot mutasyona (pozisyon 316'da arjinin-glutamin değişimine neden olan R316Q) sahip olup, postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, psikomotor gerilik ve yüze ait morfolojik bozukluklar gösterdikleri gözlenmiştir. Aile üyelerinden bazılarının beyin malformasyonları, kardiyak anomaliler ve yarı damak gösterdiği de görülmüştür. Bütün olgularda letalite üç yaşından önce

gerçekleşmiştir. Biyokimyasal analizler sonucu, hem 2-OG'yi süksinata çevirme hem de 3meT'i demetile etme fonksiyonu açısından değerlendirildiğinde, FTO proteininin bu mutant formunun tamamen etkisiz olduğu gösterilmiştir. R316Q mutanıtı, proteinin katalitik core içeren N terminal domainde lokalize olduğu için (Han ve diğ., 2010), FTO proteini aktvitesini kaybetmiştir. Boissel ve ark.nın çalışmasında olguların hiçbirinde obeziteye dair bir işaret görülmemiştir. Bu da araştırmacıların FTO'da fonksiyon/ekspresyon kaybının obeziteden koruyucu olabileceği şeklinde bir hipotez kurmalarına neden olmuştur (Boissel ve diğ., 2009).

Bu güne kadar yapılan fare ve insan FTO mRNA ekspresyonu çalışmaları sonucunda, FTO'nun her iki türde de yaygın şekilde özellikle beyinde ve hipotalamusta yüksek seviyede olmak üzere eksprese olduğu gösterilmiştir (Dina ve diğ., 2007; Frayling ve diğ., 2007; Peters ve diğ., 1999). Model organizmalarda yapılan çalışmalar FTO ekspresyonunun beslenme ile düzenlenebileceğini göstermiştir. Aç bırakılan fareler, beslenen kontrolleri ile karşılaştırıldığında, hipotalamik FTO mRNA ekspresyonunda önemli bir düşüş olduğu görülmüştür. FTO açlık sırasında downregule olmakta ve beslenme esnasında upregule olmaktadır. FTO'nun bu şekilde düzenlenmesine neden olan bir varyasyonun, beslenmeyi ve obeziteyi tetikleyici bir sinyal olabileceği ileri sürülmüştür (Gerken ve diğ., 2007; Stratigopoulos ve diğ., 2008).

FTO ekspresyonu veya fonksiyonundaki farklılıkların, yağ kütesini azaltmaya veya arttırmaya neden olup olamayacağını araştırmak için FTO mutasyonu taşıyan fare modelleri oluşturulmuştur. Bu mutasyonlardan biri FTO protein ekspresyonunun tamamen yok olduğu FTO null mutasyon (*Fto*<sup>-/-</sup>) taşıyan fare modelidir (Fischer ve diğ., 2009). Bu fareler postnatal büyüme geriliği, yüksek metabolik hız ve gıda alımında artışın olduğu kompleks bir fenotip göstermektedir. Ayrıca lokomotor aktivitede düşüşle beraber postnatal mortalite de görülmüştür. Bunlar düşük yağ kütesine sahiptirler. Heterozigot modeller yüksek yağlı diyetle rağmen obeziteye dirençli bulunmuştur. Bir diğeri model ise, azalmış FTO protein seviyesinin olduğu kısmi fonksiyon-kaybı mutasyonudur (Church ve diğ., 2009). Kısmi fonksiyon-kaybı FTO fare modeli, ENU-Mutagenesis ile indüklenen, 367. pozisyonda izolösini fenilalanine dönüştüren (I376F) bir nokta mutasyonu taşır. Bu rezidü, katalitik core'un dışında olmasına rağmen, yeni bir fonksiyonel domain olarak tanımlanan ve omurgalıların hepsinde korunmuş olan yaklaşık 20 amino asitlik bir blok içerisinde lokalize olmaktadır. FTO I367F mutasyonunu taşıyan erkek hayvanların daha az yağ kütesine sahip olduğu ve yüksek enerji tüketimi gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla beraber bu farelerde

büyüme geriliği, hiperfaji ve düşük lokomotor aktivite görülmemiştir. FTO I367F mutanti kısmi olarak aktivite göstermektedir, bu nedenle tüm genin delesyonuna göre daha ılımlı bir fenotipe sahip olabilir ve postnatal mortalite görülmeyebilir. *In vitro* deneyler, full-length I367F proteininin nukleusa doğru konumlandığını, fakat ekspresyon seviyesinin düştüğünü ve katalitik aktivitesinin de azaldığını göstermiştir (Church ve diğ., 2009). Her iki modelde de kontroller ile karşılaştırıldığında, yüksek yağlı diyet sonucu düşük kilo kazanımı ve düşük beyaz yağ doku görülmüştür. Bu bulgular, FTO aktivitesinde gerçekleşebilecek bir bozulmanın diyetle indüklenen obeziteye karşı koruyucu olabileceğini düşündürmüştür. Araştırmacılar, obezite riskini arttırdığı ileri sürülen allellerin varlığınının, FTO'nun upregülasyonuna ya da disregülasyonuna neden olabileceği, FTO inhibisyonunun obeziteye karşı koruyucu olabileceği sonucuna vararak FTO aktivite kaybının morbid obezite tedavisinde hedef olabileceğini öne sürmüşlerdir (Church ve diğ., 2009; Fischer ve diğ., 2009).

Gao ve ark. (2010) FTO eksikliği ile ilgili olarak iki fare modeli geliştirmiştir. Tüm vücut FTO knockout fare modelinde, postnatal büyüme geriliği, daha kısa vücut uzunluğu, düşük kemik mineral yoğunluğu ve normal vücut kompozisyonu görülmüştür. Sadece nöral sistemde FTO özgün delesyona uğratılan modelde de FTO knockout fare modelindeki sonuçlara benzer fenotipik sonuçlar alınmıştır. Araştırmacılar bu gözlemlerine dayanarak, FTO'nun beyindeki fonksiyonunun postnatal büyümeyi regüle ettiği sonucuna varmışlardır (Gao ve diğ., 2010).

Daha sonra Church ve ark. (2010), CAGGs promotorü (chicken beta-actin promoter) kullanarak Rosa26 lokusunda *fto* genini kondisyonel olarak overekprese eden bir fare modeli geliştirmişlerdir. Bu farelerin beyaz adipoz doku, hipotalamus, iskelet kası ve karaciğer gibi dokularında, yüksek miktarda FTO mRNA ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Genin ekstra kopyasını taşıyan bu fareler, artmış yağ doku kütlesi ve adiposit büyüklüğünden dolayı vücut ağırlığında doz bağımlı bir artışa sahiplerdir. FTO overeksprese fareler, hiperfajiktir ve yüksek yağlı diyetle maruz kaldıkları zaman artmış glukoz toleransı ve açlık durumunda daha yüksek insülin seviyesi göstermişlerdir (Church ve diğ., 2010). Bugüne dek üzerinde çalışılmış olan bu fare modelleri, GWAS çalışmalarından elde edilen verilerle paralel şekilde FTO'nun vücut ağırlığı kompozisyonunun kontrolünde bir rol oynadığını göstermiştir.

Daha önceki GWAS çalışmalarında *fto* genindeki SNP'lerin obezite ile ilişkisi gösterilmiş fakat bu SNP'lerin FTO'da fonksiyon kaybına veya kazancına neden olup

olmadığına netlik kazandırılmamıştır. Obez ve normal kiloda olan bu varyantların çalışılması, SNP'ler ile FTO protein fonksiyonu arasındaki mekanizmanın aydınlatılmasını sağlayabilir. Bu sebeple Meyre ve ark. 2010'da, Boiessel ve ark.nın yaptığı FTO fonksiyon/ekspresyon kaybının obeziteden koruyucu etkisinin olabileceği hipotezini daha ayrıntılı olarak araştırmışlardır (Meyre ve diğ., 2010). Bu çalışmada, yapı-fonksiyon ilişkisinin daha iyi aydınlatılması için doğal varyantların ve fonksiyon-kaybı FTO mutasyonu olan proteinin fonksiyonel ve enzimatik özellikleri çalışılmıştır. Yaklaşık 1400 ileri derece obez ve 1400 normal bireyde *fto*'nun eksonları dizilenmiş ve obez bireylerde %2,4, normal bireylerde ise %2,5 olmak üzere 33 heterozigot nonsinonim varyant bulunmuştur. Mutasyonların sekiz tanesi sadece obez bireylerde, 11 tanesi ise sadece normal bireylerde bulunmuştur. İki yeni mutasyon korunmuş rezidüleri değiştirmiştir. Bunlar; katalitik domaindeki R322Q ve substrat tanıma bölgesindeki R96H'dir. Katalitik core içindeki önemli mutasyonlardan biri olan R322Q değişiminin, R316Q değişimi (sadece obez bireylerde) gibi, FTO proteinin fonksiyonunu kaybetmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Substrat tanıma bölgesinde görülen R96H değişiminin ise basal aktiviteyi koruduğu fakat ekstra substrat eklenmesiyle bu aktivitenin artmadığı gözlenmiştir. Bu mutasyonların her ikisinin de hem normal hem de obez bireylerde bulunduğu görülmüştür. Meyre ve ark. (2010) bulunan diğer nonsinonim varyantların hepsinin normal enzimatik aktiviteye sahip olmasına rağmen, bunların aktivitesinin tamamen yabancı tipte olduğu şeklinde bir ifade kullanımında dikkatli olmak gerektiğinin altını çizmişlerdir. Bunun sebebi olarak şunlar gösterilmiştir, mutasyonların her zaman uncoupled reaksiyona zarar vermeyebileceği ve FTO'nun enzimatik olarak farklı biyolojik rollerinin belirlenmemiş.

FTO'nun normal şartlarda türler arasında yüksek oranda korunmuş COOH-terminal bölgesinde bulunan V493F mutantıyla yapılan çalışmalar da V493F FTO'nun dioksijenaz aktivitesinde bir değişim olmadığını göstermiş fakat yapı ve fonksiyonda nasıl bir değişim meydana geldiği aydınlatılmamıştır. Yine de Meyre ve ark. proteinin COOH-terminal bölgesiyle ilgili potansiyel önemi göz ardı edilemeyecek iki gözlem kaydetmişlerdir; bu gözlemlerden ilki, nonsinonim mutasyonların sıklığının COOH-terminal bölgede proteinin geri kalan kısmından yaklaşık üç kat daha az oluşudur. İkincisi ise, molekülün başka yerlerinde olan nonsinonim varyantlar obez ve normal bireylerde eşit oranda bulunmasına rağmen COOH-terminal bölgedeki varyantlar sekiz obezde ve sadece iki normal bireyde bulunmuştur. Bu ön gözlemlerin, FTO fonksiyonunun daha iyi anlaşılmasına ve enerji

dengecinin korunmasında potansiyel öneme sahip olduğuna dikkat çekmişlerdir (Meyre ve diğ., 2010).

Pitman ve ark. (2012) yaptıkları deneylerde SHSY-5Y nöroblastoma ve 3T3-L1 preadiposit hücre hatlarında çalışmış ve siRNA kullanarak FTO ekspresyonunu downregüle etmişlerdir. Bu yolla hücresel seviyedeki enerji dengesi üzerinde FTO'nun etkisini araştırmışlardır. Hücrenin enerji durumunu hücre içerisindeki ATP seviyesini ölçerek değerlendirmişler ve *fto* gen ekspresyonundaki değişikliklerin hücre tipine özgün bir şekilde hücresel enerji dengesini bozduğunu ilk kez göstermişlerdir (Pitman ve diğ., 2012).

FTO dozaj değişikliklerinin vücut ağırlığını etkilemesinin yanı sıra, farklı etkilerinin de olabileceği düşünülmektedir. Berulava ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada FTO fonksiyonunun aydınlatılması için farklı hücre tiplerinde (Hek293, HeLa, MCF-7) FTO'nun subcellular lokalizasyonu, RNA ekspresyon profilleri ve RNA modifikasyon seviyeleri üzerine FTO'nun dozaj etkisi incelenmiştir. Çalışılan hücre tiplerinin tamamında FTO'nun nukleusta nokta benzeri yapıda, özellikle speckles bölgede (pre-mRNA splicing faktörlerin depolama ve/veya modifikasyon bölgesi olduğu düşünülen) daha fazla biriktiği gözlemlenmiştir. Bu bulgu daha önce Jia ve ark (2011)'in ileri sürdüğü bulgular ile tutarlılık göstermektedir. FTO'nun subnuklear yapı olan çekirdekçikte lokalize olduğu görülmüş ve FTO'nun rRNA modifikasyonlarında gerekli olabileceğini düşündürmüştür. Değişen FTO seviyelerinin, özgün fonksiyonel kategorilere ait genlerin (RNA işlenmesi ve metabolizma) RNA seviyesi gibi, farklı RNA sınıflarında (mRNA ve muhtemelen rRNA) farklı modifikasyonları ( $m^6A$ , 3meU) etkilediği görülmüştür. Berulava ve ark (2012) farklı RNA değişikliklerini göz önünde bulundurduklarında, endojen RNA hedeflerini ve ilgili doku/dokuları tanımlamak için son derece önemli olabileceğini ön görmüşlerdir (Berulava ve diğ., 2013).

Guo ve ark. (2012) Hela ve Hek 293 hücreleri ile çalışmışlardır. Bu çalışmada glukoz dengesi, lipit dengesi ve özellikle  $\beta$  hücrelerinden insülin salınımı için esansiyel olan Foxa2 transkripsiyon faktörünün (Lantz ve diğ., 2004; Wolfrum ve diğ., 2004) FTO geninin anahtar düzenleyicisi olduğunu ileri sürmüşlerdir (Guo ve diğ., 2012). Yaptıkları çalışmada FTO geninin promotor bölgesinde delesyonlar oluşturmuş ve mutant Foxa2 proteinlerinin bu promotor bölgelere bağlayarak promotor aktivitesini test etmişlerdir. Sonuç olarak, Foxa2'nin FTO geninin promotor aktivitesini ve ekspresyonunu downregüle ettiğini göstermişlerdir.



Pandey tarafından 2003'te yapılan bir çalışmada fosforillenmiş CREB'in (pCREB), DNA üzerinde "cAMP responsive element"lere bağlanarak besin alımının ve fiziksel aktivitenin düzenlenmesine aracılık eden NPY1 (neuropeptide receptor 1) ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Pandey, 2003). Lin ve ark. (2014) neuroblastoma (SK-N-SH) hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada FTO overekspresyonunun "cAMP response element binding protein" (CREB) defosforilasyonunu geciktirdiğini, pCREB'in NPY1 ekspresyonunu arttırdığını özetle, FTO'nun obeziteyi CREB sinyal yolağını düzenleyerek hafiflettiğini ileri sürmüşlerdir (Lin ve diğ., 2014).

Bu çalışmada FTO proteininin preadiposit hücrelerindeki muhtemel substratlarının ne olduğu, obezite ile nasıl ilişkilendirilebileceği ve FTO'nun protein ekspresyonunu hangi yollar aracılığıyla nasıl değiştirebileceği proteomik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan literatür araştırmasında FTO'nun overekspresyonu sonrası karşılaştırmal iki boyutlu jel elektroforezi tabanlı protein tanımlanmasına yönelik bir proteomik çalışmaya rastlanmamıştır.

## 2. AMAÇ

Obezite günümüzde kalp hastalıkları, tip-2 diyabet ve kanser gibi son derece ciddi hastalıklara yatkınlık oluşturabilen ciddi halk sağlığı sorunlarından biridir. Genome-wide Association Study (GWAS) ile tip-2 diyabet hastalarındaki *Fat mass obesity-associated* (FTO) varyantları kullanılarak genom analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler, FTO geninin ve gen sekansında bulunan SNP'lerin obezite ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Obezitenin bireylerde sebep olduğu bu yatkınlıkların anlaşılması açısından vücut ağırlığının nasıl düzenlendiğinin araştırılması ve aydınlatılması klinik, bilimsel ve toplumsal anlamda büyük önem taşımaktadır.

FTO geninin kodladığı FTO proteininin  $Fe^{+2}$  ve 2-OG (2-oxoglutarat) varlığında tek iplikli DNA'da 3-meT'in, tek iplikli RNA'da ise 3-meU ve  $N^6$ -meA'nın demetilasyonunu katalizlediği gösterilmiştir (Jia ve diğ., 2011). FTO'nun bu fonksiyonu onun nükleik asit tamiri veya modifikasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalarda FTO geninde belirlenen mutasyonlardan bazıları çalışılmış fakat FTO proteininin endojen substratlarının ne olduğu, hangi yollarla etkileştiği, mutant FTO'nun hangi yolaktaki substratlarla etkileşiminin bozulduğu ve FTO'nun demetilasyon aktivitesinin insanlardaki obezite ile ilişkisi ortaya konulamamıştır. Bu durum, FTO proteininin hücre proteomu ve bağlantılı olabileceği protein yolları üzerindeki etkilerinin detaylı bir şekilde araştırılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada mutant ve yabanıl tip FTO genlerini eksprese eden 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin oluşturulması ve böylelikle FTO'nun 3T3-L1 hücre proteomunu nasıl etkilediğinin anlaşılması amaçlanmıştır. Bunun için mutant ve yabanıl tip *fto* genleri klonlanmış ve 3T3-L1 hücrelerine verilerek eksprese edilmiştir. FTO ekspresyonu sağlandıktan sonra hücreler parçalanarak protein özütleri hazırlanmıştır. Hazırlanan protein özütleri ile 2D tabanlı proteomik yaklaşımlar ve kütle spektrometrisi kullanılarak protein tanımlanması yapılmıştır.

Çalışmada tanımlanan 8 proteinden biri olan HNRNPK mRNA-binding proteininin FTO overekspresyonuna bağlı artışı görülmüştür. Bu çalışma, FTO proteininin aktivitesini hücrede hangi proteinler üzerinden gerçekleştirdiğinin ve gende meydana gelen varyasyonların neden önemli olabileceğinin ortaya konması açısından önem arz etmektedir.

### **3. YÖNTEM**

#### **3.1. Besiyerleri ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması**

##### **3.1.1. Luria-Bertani (LB) Sıvı Besiyeri**

Luria-Bertani (LB) (Sigma, ABD), ticari olarak satılan preparatından üreticinin tavsiyesine uygun olarak hazırlandı. Besiyerleri otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildikten sonra sıvı besiyeri kullanılacağı zamana kadar +4 °C’de saklandı.

##### **3.1.2. Zengin Sıvı Besiyeri**

Bir litre sıvı besiyeri için; 10g tripton, 5 g maya özütü, 5 g NaCl, 2 g glukoz tartıldı ve 1000 ml’ye saf su ile tamamlandı. Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra porsiyonlanarak -20 °C’de saklandı.

##### **3.1.3. Antibiyotikli Besiyeri**

Antibiyotikli besiyeri için sadece 100 mg/ml stok konsantrasyondaki ampisilin kullanıldı. Ampisilin besiyeri otoklavlandıktan sonra otoklavlandıktan sonra 50°C’ye soğutularak eklendi. Bu şekilde sıcakla antibiyotik inaktivasyonu engellendi. Bunzen bek alevinin yanında antibiyotik besiyeri ile iyice karıştırıldıktan sonra eğer katı besiyeri yapılacak ise plastik petrilere yaklaşık derinliği 3-4 mm olacak şekilde döküldü. Oda ısısında katılaşması beklenen agar tabakları kullanılacağı zamana kadar +4°C’de saklandı. Sıvı besiyeri ise antibiyotik eklendikten hemen sonra kullanıldı.

#### **3.2. Kullanılan Nükleik Asit Teknikleri**

##### **3.2.1.Kandan RNA İzolasyonu**

Kandan RNA izolasyonu, ticari olarak satılan Qiamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, ABD) kullanılarak üreticinin tavsiyesine uygun olarak yapıldı. İzlenen yöntem kısaca şu şekildedir; eritrositler selektif olarak parçalandı ve santrifüj yapılarak lökositler alındı.

Toplanan lökositler yüksek derecede denatüre edici şartlarda parçalanarak RNaz inaktivasyonu sağlandı ve bu şekilde intakt RNA'lar elde edildi. QIAshredder kolondan etanol geçirilerek kolonun bağlama koşulları ayarlandı ve elde edilen lizat homojen hale getirilerek bu kolondan geçirildi. RNA bu işlem sırasında kolona bağlandı. Kolon yıkanarak kontaminantlar uzaklaştırıldı ve sonraki işlemlerde kullanılmak üzere total RNA 30 µl ultra saf su (RNaz bulundurmayan) kullanılarak kolondan ayrıldı.

### 3.2.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi izole edilen RNA'dan random hegzamer metodu ve oligo (dT)<sub>18</sub> metodu birlikte kullanılarak yapıldı. Çizelge 3.1 'de içeriği verilen reaksiyon buz üzerinde hazırlandı. Karışım önce 90 °C'de 1 dakika öncül denatürasyona uğratıldı, daha sonra buz üzerine alınarak içerisine *M-MuIV RT* enzimi ve ribobolok RNaz inhibitörü eklendi. Karışım 42 °C'de 3 saat boyunca tutularak reaksiyon gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.1.** cDNA sentez reaksiyonu karışımı

dH <sub>2</sub> O	5 µl
5 X Reaction Buffer	4 µl
10 mM dNTP Karışımı	2 µl
Random Hexamer Primer 100 µg (0,2 µg/µl)	1 µl
Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer 100 µg (0,5 µg/µl)	1 µl
RNA	5 µl

### 3.2.3. Yabancıl Tip *fto* Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), çoğaltılmak istenen gen bölgesi için özel olarak tasarlanan ve uçlarında kesim bölgeleri bulunan forward primer ve reverse primer kullanılarak yapıldı. PZR karışımı forward ve reverse primerlerden 5'er µM, 1 X Long PZR

tamponu, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, dört baz çeşidinin her birinden 0.25 mM olmak üzere dNTP karışımı, 2.5 U Long PZR enzimi (ThermoScientific, ABD) ve 0.1µg/µl kalıp DNA'dan oluştu. Buz üzerinde hazırlanan karışım TC-3000 Peronel Thermal Cycler (Techne, ABD) cihazına konuldu ve kalıp DNA Çizelge 3.2'de verilen PZR koşullarına uygun olarak çoğaltıldı.

**Çizelge 3.2.** Primer listesi ve PZR şartları

Primer ismi	Primer dizisi 5'....-3'	T <sub>m</sub> (°C)	Kullanılan PZR Programı	Ürün Boyu	Kullanım Amacı
FTO F	<u>AAGCTTAAGCTTAT</u> Hind III	58.2	94 °C 5 dk	1518 bp	FTOgenini çoğaltmak
	GAAGCGCACCCCG		94 °C 30s		
ACTG	59 °C 60s				
FTO R	<u>CTCGAGCTCGAGCT</u> Xho I	57.6	72 °C 1 dk		
	AGGGTTTTGCTTCCA		72 °C 10 dk		
	GAAGCTG				

### 3.2.4. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezini Kullanılarak Yürütülmesi

Etidyum bromür içeren % 1'lik agaroz hazırlamak için 30 ml 0,5 X TBE çözeltisi içerisine 0.3 g agaroz (Prona Basica le Agarose, EU) eklenerek karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyinceye kadar kaynatıldı. Erimiş agaroz çözeltisi oda sıcaklığında bir süre soğutuldu ve içerisine 10 ng/ml stok etidyum bromür çözeltisinden 1 µl eklenerek elektrofrez tankına döküldü. Agar katılaştıktan sonra jelde oluşturulan kuyucukların ilkine

1 kb DNA belirteci (Fermentas, ABD) diğerk kuyucuklara ise PZR ürünü yükleme boyası ile karıştırılarak yüklendi. PZR ürünlerinin ve belirtecin yüklendiğı agaroz jel 0,5 X TBE tamponu içerisinde, 400 mA akım uygulanarak 30 dakika boyunca yürütüldü. Oluşan DNA bantları moleküler ağırlık belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

### **3.2.5. DNA Parçalarının Agaroz Jelden İzolasyonu ve Saflaştırılması**

Agaroz jelden izolasyon, ticari olarak satılan QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, ABD) kullanılarak üreticinin tavsiyesine uygun olarak yapıldı. İzlenen yöntem şu şekilde gerçekleştirildi. PZR ile çoğaltılan *fto* genini içeren karışımından bir kuyucuğa 2 µl, kalan PZR ürününün tamamı ise başka bir kuyucuğa olmak üzere % 0.8'lik etidyum bromürsüz agaroz jele yüklendi ve 400 mA akım verilerek yürütüldü. Agaroz jel, sözü geçen bu iki kuyu arasından boydan boya kesildi ve 2 µl *fto* PZR ürününü yüklenen parça etidyum bromür ile harici olarak 15 dakika boyunca boyandı. Ardından boyanan jel parçası ile etidyumsuz jel parçası uv ışık altında yan yana getirildi ve boyanan *fto* bandından hiza alınarak yüksek miktarda PZR ürünü yüklenen kuyudaki *fto* bandı kesildi. Kesilen bant tartılarak protokol uygulandı. Protokole göre, kesilen jel parçası üzerine jelin çözünürlüğünü arttırıcı ajan eklenerek 50 °C'de bekletildi. Ardından izopropanol eklenerek hidrofobik etkileşimlerin arttırılması sağlandı ve bu şekilde DNA'nın sıvı içerisindeki çözünürlüğü düşürüldü. Kolona yüklenen karışım santrifüj edilerek DNA kolona bağlandı ve ultra saf su kullanılarak kolondan indirildi.

### **3.2.6. DNA parçalarının Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi**

Agaroz jelden izole edilen *fto* bandı ve ticari olarak alınan pcDNA4/TO (Invitrogen, ABD) vektörü Xho I ve Hind III endonükleazları (Fermentas, ABD) ile kesildiler. Kesimler üreticinin tavsiye ettiği tampon çözeltiler içerisinde 37°C'de gece boyu yapıldı.

### **3.2.7. DNA Parçalarının Etanol Çöktürmesi ile Temizlenmesi**

DNA parçaları restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra 1:10 oranında 3M pH 5.5 sodyum asetat ve 1ml soğuk 200 proof etanol eklenerek kuru buzda 20 dakika bekletildi. Bekleme süresi onunda tüpler 16000 xg 'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edildi ve üst faz pellete zarar verilmeden uzaklaştırıldı. Ardından pellet üzerine %70 soğuk etanol eklendi ve aynı koşullarda 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz atıldı ve etanol tamamen uçuruldu. Çöken DNA uygun hacimdeki ultra saf su içerisinde çözüldü.

### 3.2.8. DNA Parçalarının (Insert) Vektör DNA'ya Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu vektör ve insert DNA'ları 1:3 oranında kullanılarak gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonu karışımı Çizelge 3.3'te verilen şekilde hazırlanarak 16°C'de gece boyu gerçekleştirildi.

**Çizelge 3.3.** 1:3 oranında kurulan ligasyon reaksiyonu karışımı

Kullanılan Kimyasallar ve Örnekler	Kullanılan Miktarlar
FTO geni	150 ng
Vektör (pcDNA4/TO)	500 ng
10 X T4 DNA ligaz tamponu	1 µl
dH <sub>2</sub> O	8 µl
Toplam	10 µl

### 3.2.9. Elektrokompotent *Escherichia coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Agar besiyerleri üzerinde tek koloni düşürülerek üretilen *Escherichia coli* (*E. coli*) DH10B hücreleri 3 ml'lik LB besiyerinde gece boyu 37°C'de 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edildikten sonra 600 ml LB besiyerine ekildi. 600 ml'lik bu bakteri kültürü 600 nm dalga boyundaki OD'si (optik dansite) 0.5 olana kadar (OD<sub>600</sub> =0.5) 37 °C'de 250 rpm'de

çoğalmaya bırakıldı. Buz üzerine alınan hücreler 10 dakika bekletildi ve +4 °C’de 4000 xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 3 kez soğuk %10’luk gliserol solüsyonu ile hacim her seferinde bir önceki hacmin yarısına indirilerek yıkanıp santrifüj işlemi tekrarlandı. Üçüncü yıkamanın sonunda hücre pelleti %10 gliserol solüsyonu ile çözülüp 40 µl’lik porsiyonlar halinde kuru buzda donduruldu. Dondurulan porsiyonlar -80 °C’de saklandı.

### **3.2.10. Elektrokompotent *E. coli* Hücrelerine Transformasyon (Elektroporasyon)**

Elektroporasyon, Elektroporator 2510 (Eppendorf, ABD) kullanılarak 10 µf ve 1700 V akım verilerek gerçekleştirildi. Sıvı azot içerisinde saklanan 40 µl *E. coli* DH10B hücreleri buz üzerinde eritilerek 2 µl ligasyon reaksiyonu ile karıştırıldı ve önceden soğutulmuş 1 mm çaplı elektroporasyon küveti (Eppendorf, ABD) içerisine konuldu. Karışıma akım uygulandıktan sonra üzerine 500 µl zengin sıvı besiyeri eklendi. Zengin besiyeri ve hücrelerin olduğu karışım yeni bir tüpe alındı ve 37 °C’de 250 rpm’de çalkalanarak 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler uygun antibiyotiği içeren LB agar besiyerine ekildi ve 37 °C’de gece boyu inkübe edildi. Antibiyotikli besiyerine büyüeyebilen bakteriler aranan klonlar olduğundan gece boyu inkübasyon sonrası gözlenen koloniler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltılarak ve 850 µl zengin besiyeri ve 150 µl %60 gliserol karışımı içerisinde -80 °C’de saklandı.

### **3.2.11. Plazmit İzolasyonu**

Bakterilerden plazmit izolasyonu Qiagen Miniprep Kit ile üreticinin önerdiği şekilde yapıldı (Qiagen Spin Miniprep Kit 250, ABD). İzolasyon kısaca şu şekildedir. LB agar petrilerinde büyütülen hücreler toplandı ve temiz bir tüp içerisinde liziz tamponunda parçalandı ve ortam nötral pH’ya getirildikten sonra hücre debrisleri santrifüj ile çöktürüldü. Plazmit DNA’sını içeren faz silika bir kolona yüklendi ve santrifüj edilerek DNA’nın kolona bağlanması sağlandı. Kolona bağlanan saf plazmit DNA’sı düşük iyonik güç koşullarında kolondan ayrıldı.

### **3.2.12. *E.coli* Hücrelerinden Endotoksin İçermeyen Plazmit İzolasyonu**

Transfeksiyon işlemi için *E. coli* hücrelerinden endotoksin içermeyen plazmit izolasyonu Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, ABD) ile üreticinin tavsiyesine uygun olarak



yapıldı. Rekombinant plazmiti taşıyan hücre antibiyotik içeren 100 ml LB besiyerinde 37°C'de 250 rpm'de çalkalanarak gece boyu büyütüldü. Büyüyen hücreler, 6000 xg'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Çöken hücreler P1 (süspansiyon tamponu) tamponunda çözüldükten sonra patlatma tamponu ile patlatılarak oda ısısında bekletildi. Üzerine soğuk nötralizasyon tamponu eklenerek karıştırılan hücreler QIAFilter Kartuşa yüklenerek oda ısısında bekletildi. Süre sonunda kartuştan geçirilen hücre lizatı temiz bir tüpte toplandı, üzerine ER tamponu (isopropanol, polyethylene glycol octylphenyl) eklenerek karıştırıldı ve buz üzerinde bekletildi. Bu süre içerisinde QIAGEN-tip 500 kolonu QBT tamponu (dengeleme tamponu) ile yıkandı ve lizat kolona yüklenerek kolondan geçirildi. Lizat tamamen geçtikten sonra kolon yıkama tamponu tamponu ile 2 kere yıkandı. Endotoksin içermeyen DNA kolondan temiz tüp içerisine kolondan indirme tamponu ile indirildi. DNA oda ısısındaki izopropanol ile karıştırılarak 30 dakika 15000 xg'de +4°C'de santrifüj edildi. Üst faz atıldı. Çöken DNA üzerine oda ısısındaki endotoksin içermeyen %70 etanol eklendi ve 10 dakika 15000 xg'de santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldı. DNA pelleti etanol tamamen uzaklaştırılarak uygun hacimdeki endotoksin içermeyen distile su içerisinde çözüldü. DNA konsantrasyonu ölçüldü ve transfeksiyon çalışmalarını yapmak üzere -20°C'de saklandı.

### **3.2.13. DNA Konsantrasyonunun Ölçümü**

DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, ABD) cihazında ölçüldü. İzole edilen endotoksin içermeyen plazmit DNA'sı distile suda çözüldüğü için cihaz distile su ile körlendi ve 260 nm dalga boyunda 2 µl DNA örneği ile ölçüm yapıldı.

### **3.2.14. Dizileme ve Dizi Analizi**

Klonlanan DNA'ların dizileri İontek firması (İontek Inc., Türkiye) tarafından yapıldı. Elde edilen işlenmemiş veriler Vector NTI (Invitrogen, ABD) programına atılarak analiz edildi.

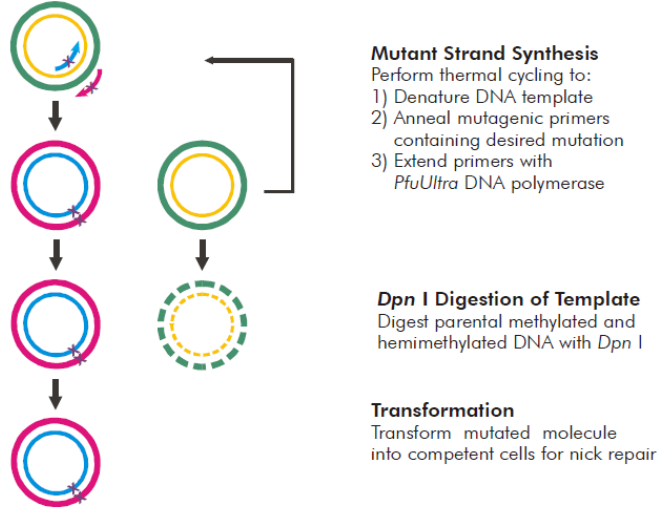
### 3.3. Klonlamalar

#### 3.3.1. Yabancı Tip Rekombinant Vektör Klonunun Eldesi

Yabancı tip *fto* genini çoğaltmak üzere tasarlanan primerler kullanılarak PZR kuruldu. PZR ürünü etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yütülerek UV ışık altında görüntülendi. Doğru büyüklükte olduğu belirlenen PZR ürünü % 0.8'lik etidyum bromürsüz jelde yürütülerek QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, ABD) ile jelden izole edildi. Jelden izole edilen *fto* geninin pcDNA4/TO vektörüne ligasyonu yapıldı. Gece boyu 16 °C'de gerçekleştirilen reaksiyon sonunda karışımın 2 µl'si sıvı azot tankından çıkarılan elektrokompotent *E. coli* DH10B suşuna transforme edildi. Transformasyon sonrası hücreler 500 µl zengin sıvı besiyerinde 37 °C'de 250 rpm hızda çalkalanarak 1 saat büyümeye bırakıldı. Süre sonunda besiyeri içerisindeki hücreler 4000 Xg 'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst faz atıldı ve hücreler (100 µg/µl) ampisilin içeren LB agar petrilere ekildi. Agar petri üzerinde büyüyen hücrelerden tek koloni seçimi yapıldı ve bu koloniler büyütülerek plazmit DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitlerin aranan klonlar olduğu Hind III ve Xho I kesimleri yapılarak belirlendi. Rekombinant pcDNA4/TO-FTO vektörünü içeren koloni çoğaltılarak % 25 gliserol içeren zengin besiyeri içerisinde çözüldü ve -80 °C'de saklamaya alındı.

#### 3.3.2. Mutant Rekombinant Plazmit Klonunun Eldesi

pcDNA4/TO-FTO R316Q plazmiti pcDNA4/TO-FTO plazmitine QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, ABD) kullanılarak bölgeye yönlendirilmiş mutagenез yapılarak elde edilmiştir. Deney üreticinin tavsiye ettiği şekilde yapılmıştır. Deney kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir. Plazmit denatüre edilerek istenilen mutasyonu taşıyan primerler bağlanır. Replikasyon sırasında hata yapma olasılığı Taq polimerazdan 18 kat daha düşük olan *Pfu* DNA polimeraz kullanılarak uzama reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon gerçekleştirildikten sonra plazmitte metile edilmiş halde bulunan eski DNA iplikçığı metile olmuş (parental DNA) DNA'yı kesen *Dpn I* enzimi kullanılarak kesildi. Sentezlenen ve mutasyonu bulunduran yeni DNA iplikçığı *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Kiti vermiş olduğu deneyin basit görsel çizim 3.1'de verilmiştir.



**Çizim 3.1.** Bölgeye yönlendirilmiş mutagenез deneyinin basit gösterimi

### 3.4. Hücre Kültürü

#### 3.4.1. Hücrelerin Büyütülmesi

3T3-L1 hücreleri (ATCC Biological Resource Center, ABD) standart kültür büyüme şartlarında kültüre edildi. Hücreler DMEM Earle's (Biochrome, İngiltere), %10 tetrasiklin içermeyen FBS (GIBCO, Invitrogen, ABD), 0.1 µg/µl penisilin/streptomisin (Biochrome, İngiltere), 2.8 mM L-Glutamin (Biochrom, İngiltere) karışımından oluşan besiyerinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> atmosfer nemde büyütüldü. Hücrelerin besyerler her üç günde bir yenilendi ve hücre yoğunluğu % 80'e vardığında hücreler subkültüre edildi.

#### 3.4.2. Hücrelerin Dondurulması

Hücreleri dondurmak için, %70 DMEM (içerisinde dondurulacak hücrelerin büyütüldüğü), %20 FBS ve % 10 DMSO karışımı kullanıldı. Dondurma işlemi öncesi tüm taban yüzeyini kaplamış (%80- 90 confluent) hücreler üzerindeki besiyeri ayrı bir tüpte toplandı ve hücreler steril PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırılarak kültür kabındaki hücreler üzerine ~1 ml %0.25 Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi ve tüm hücreler ile temas etmesi sağlandı. Tripsin enziminin daha iyi çalışması için kültür kabı 37°C'deki inkübatöre konuldu. Hücrelerin kültür kabının tabanından ayrılıp ayrılmadıkları birkaç dakikalık aralıklarla mikroskop altında gözlemlendi. Kültür kabının tabanından ayrılan hücreler steril PBS

ile toplanarak 483 xg'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan solüsyon uzaklaştırıldı ve hücrelerin bulunduğu çökelti dondurma besiyeri ile çözüldü. Çözülen hücreler inkübasyonlar sırasında hazırlanan ve isimlendirilen kriyotüpler içerisine bölündü. Tüpler -80°C'de kriyo-freezer saklama kabında (Nalgene, ABD) bir gece aşama bekletilerek aşama aşama donmaları sağlandıktan sonra sıvı azot tankında saklandı.

### **3.4.3. Hücrelerin Çözülmesi**

Kriyotüp sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra doğrudan 37°C'deki su banyosuna alınarak hücrelerin çözülmesi sağlandı. Ardından hücreler damla damla çözme besiyerine eklendi ve 483 xg'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek DMSO uzaklaştırıldı. Çözme besiyeri gradient halindeki 10 ml %20 FBS %80 DMEM'den oluşmaktadır. Santrifüj sonrası sıvı faz uzaklaştırıldı ve hücreler antibiyotik içermeyen besiyeri bulunan kültür kabına ekildi. Bir gece büyütülen hücrelerin besiyerleri daha sonra uygun antibiyotikleri içeren besiyeri ile değiştirildi. Hücrelerin besiyerleri her üç günde bir yeni besiyeri ile değiştirildi.

### **3.4.4. Hücrelerin Pasajlanması**

Hücre yoğunluğu yaklaşık %80'e vardığında hücreler buldukları kültür kabından kaldırılarak daha büyük ya da daha fazla sayıda kültür kabına ekildi. Bu işlem kısaca şu şekilde gerçekleştirildi. Hücrelerin olduğu kültür kabındaki besiyeri döküldü ve steril PBS (Biochorome, ABD) ile nazikçe yıkanarak %0.25 Trypsin/EDTA muamelesi ile kaldırıldı. PBS ile toplanan hücreler santrifüj edildi ve sıvı kısım tamamen uzaklaştırıldıktan sonra hücreler taze besiyerinde çözülerek uygun kültür kaplarına ekildi.

### **3.4.5. Lipofectamin 3000 ile Transient Ekspresyon Yapan Hücrelerin Oluşturulması**

Hücreler %70 yoğunluğa ulaşıncaya transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyon işlemi için kitin önerdiği şekilde 2 karışım hazırlandı (Çizelge 3.4). Oluşturulan karışımlar birbirleriyle karıştırılarak oda ısısında 5 dakika bekletildi. Karışım hücrelerin üzerine damla damla damla eklenerek hafifçe karıştırıldı. Etüve kaldırılan hücreler 48 saat boyunca

ekspresyonun sağlanması için inkübe edildi. Transfeksiyonile oluşturulan hücre hatları şunlardır:

- 1- 3T3-L1 FTO-R316Q mutanı
- 2- 3T3-L1 FTO-WT
- 3- 3T3-L1 pcDNA4/TO (gen taşımayan vektör, Kontrol)

**Çizelge 3.4.** Transfeksiyon için hazırlanan karışımlar

Karışım-1	Karışım-2
1250 µl Optimem	25 µg DNA
37,5 µl Lipofectamine 3000	1250 µl Optimem
-	100 µl P3000

### 3.5. Protein Analizleri

#### 3.5.1. 3T3-L1 Hücrelerinden Protein Özütlerinin Hazırlanması

Ökaryotik hücrelerden protein özütlerinin hazırlanması için fiziksel ve kimyasal parçalama yöntemleri birlikte kullanıldı. Kimyasal parçalama için DIGE Buffer (7M Üre, 2M Tioüre, 30mM Tris, 5mM Magnezyum Asetat pH 9.0) kullanılırken fiziksel parçalama için 0.2 mm çelik boncuklar (Stainless Beads Next Advance, ABD) ile Bullet Blender (Next Advance, ABD) kullanıldı.

İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler 2 kez yıkama tamponu (250 mM sükröz, 10 mM TRIS pH 7) ile yıkandı ve yıkama tamponu varlığında hücre kazıyıcı ile kaldırılarak 483 xg'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı ve çöken hücrelerin üzerine iğne ucu ile proteaz inhibitör kokteyli (Roche, Almanya) ve 1:3 oranında M-PER ya da 2DE-Rehirsasyon tamponu eklendi. Karışım vortex ile homojen hale getirilerek safe-lock tüpe (Eppendorf, ABD) alındı ve üzerine 0.2 mm çelik boncuklar konuldu. Tüpler Bullet Blender cihazında hız kademesi 9 olacak şekilde 3 dakikalık aralıklarla 6 dakika boyunca +4°C'de parçalandı. Parçalanmış hücreler 10000 xg'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek çelik

boncuklar çöktürüldü. Sıvı faz yeni bir tüpe alını ve 30000 xg'de +4 °C'de 40 dakika santrifüj edilerek hücre debrisinin tamamen çökmesi sağlandı. Süre sonunda sıvı faz çökeltiye dokunulmadan yeni bir tüpe alındı. Protein özütleri sıvı azotta dondurularak -80 °C'de saklandı.

### **3.5.2. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi**

Protein miktarlarını ölçmek için Bradford Assay (Bradford, 1976) kullanıldı. Ölçülecek protein özütünden 1 µl alınarak 19 µl standart tamponu ile karıştırıldı. Karışım üzerine 1ml 1X Bradford Reagent (Bio-Rad, ABD) eklenerek vortexlendi ve karanlıkta 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örnekler Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) ile 595 nm'de ölçüldü. Örneklerin ölçülen protein konsantrasyonları daha önce 595 nm'ye göre hazırlanmış BSA standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplandı.

### **3.5.3. SDS-PAGE Protein Jel Elektroforezi**

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kesintili SDS-PAGE protein jeli kullanıldı. Yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan bu jel sistemi Çizelge 3.5'te verilen bileşenler kullanılarak hazırlandı. Çizelge 3.5'te verilenden farklı jel yüzdesi kullanılacak ise bu konsantrasyonların hesaplanması için <http://www.changbioscience.com/calculator/sdspc.htm> web adresinden faydalanıldı.

**Çizelge 3.5. SDS-PAGE İçeriği**

<b>Kullanılan Kimyasallar</b>	<b>Ayrırma Jeli (% 12, ml)</b>	<b>Yükleme Jeli (% 4, ml)</b>
ddH <sub>2</sub> O	3.3	3
1.5 M Tris.HCl pH 8.8	2.5	-
0.5 M Tris.HCl pH 6.8	-	1.25
37.5:1 Akrilamit/Bis	4	0.67
% 10 SDS	0.1	0.05
% 10 APS	0.1	0.05
TEMED	0.005	0.005
Toplam Hacim	10	5

Ayrırma jeli hazırlandıktan sonra hazırlanan cam plakalar arasına döküldü ve üzerine nazikçe izopropanol konularak jelin havayla teması engellendi. Bu şekilde polimerizasyon hızlandırıldı ve aynı zamanda pürürsüz bir yüzey elde edildi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol döküldü ve jelin yüzeyi saf su ile yıkandı. Jel üzerinde cam plakalar arasında kalan su kurutma kağıdı yardımıyla tamamen uzaklaştırıldı. Yüklem jeli hazırlanarak polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine konuldu ve cam plakalara uygun 1 mm genişliğindeki tarak yerleştirildi. Yüklem jeli de polimerize olduktan sonra içinde jel bulunan cam plakalar elektrotların olduğu tetracellere oturtuldu ve tetraceller içerisinde 1X SDS-PGE yürütme tamponu olan tanklara yerleştirildi. Yüklenmek istenen protein özütlerinin üzerlerine 5'er µl 6X yüklem boyası eklenerek 95°C'deki su banyosunda 4 dakika bekletilerek denatürasyon sağlandı. Bekleme süresi sonunda örnekler buza alındı ve

kısa bir santrifüj sonrası mikropipet yardımıyla inkübasyon sırasında temizlenen kuyucuklara yüklendi. Jel, 180 V gerilim verilerek 60 dakika boyunca yürütüldü. Yürümesi biten jel cam plakalar arasından çıkarılarak yapılacak çalışmaya göre ya % 40 metanol % 10 asetik asit fiksasyonu ardından boyandı ya da western işlemi için kullanıldı.

### 3.5.4. Western Blotlama

Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı ve nitroselüloz membrana transfer edilerek hedef protene özgü antikorlarla analiz edildi. Western transferi için yarı kuru sistem olan Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponun içerisine alınarak yaklaşık 10 dakika bekletildi. Bekleme esnasında nitroselüloz membran ve Whatman kağıtları da transfer tamponunda ıslatıldı. Süre sonunda transfer cihazının demir levhaları arasına alttan üste doğru sırasıyla 2 kat Whatman kağıdı, nitroselüloz membran, jel, 2 kat whatman kağıdı olmak üzere (-) ve (+) kutuplara dikkat edilerek katmanlar halinde yerleştirildi. Katlar arasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek 25 V sabit gerilimde 30 dakika boyunca transfer edildi. Transferin ardından membran proteinleri boyayan Ponceau S boyası ile boyanarak western transferinin kalitesi kontrol edildi. Protein bantları gözlemlendikten sonra boya saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve %5 bloklama tamponu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bloklama tamponu uzaklaştırılarak sırasıyla 15, 5, 5 dakika olmak üzere 3 kez TBS-T ile yıkandı. Üreticinin tavsiye ettiği dilüsyonda birincil (Çizelge 3.6) antikor TBS-T içerisinde hazırlandı ve membran bu tampon içerisinde +4°C’de gece boyu nazikçe çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün önceki yıkama işlemi tekrarlandı ve üreticinin tavsiye ettiği ikincil antikor TBS-T içerisinde seyreltildi ve membran bu tampon içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Görüntüleme yüksek duyarlılıkta sinyal üretebilen kemilüminesans (Biorad, ABD) kullanıldı. Kemilüminesans görüntüleme için Immun-Star HRP Peroxide çözeltisi ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak membran yüzeyine konuldu ve yüzeyin tamamının çözelti karışımı ile temas etmesi sağlandı. Membran streç film arasına alınarak fazla sıvı peçete yardımı ile uzaklaştırıldı. Görüntüleme için hazırlanan membran Hypercasette (Amersham, Biosciences) içerisine sabitlendi. Karanlık odada membran üzerinde oluşan ışığı algılayabilecek hiper duyarlı bir X-Ray filmi yerleştirildi. Sinyalin



filmi yakması için 10 dakika beklendi. Bekleme süresi sonunda film membran üzerinden alınarak HyperFilm developer solüsyonunda 1 dakika yıkanarak oluşan bantlar izlendi. Ardından saf su ile yıkandı ve HyperFilm fiksasyon solüsyonunda 1 dakika bekletilerek görüntü sabitlendi. Fiksasyon sonrası film saf su ile yıkanarak gözlenen bantlar analiz edildi.

**Çizelge 3.6.** Western Blot analizinde kullanılan birincil ve ikincil antikorların listesi

<b>1° Antikor</b>	<b>2° Antikor</b>
$\beta$ -Aktin Mouse, (Santa Cruz, ABD)	Goat Anti-Mouse HRP Conjugate, (Biorad, ABD)
FTO (Fatso), Mouse (Santa Cruz Biotechnology, ABD)	

### 3.6. Kullanılan Proteomiks Yöntemler

#### 3.6.1. DIGE (Difference Gel Electrophoresis) ve 2DE- Jel Elektroforezi

Ökaryotik hücreler toplanıp protein özütleri hazırlandıktan sonra konsantrasyonları ölçülerek 2DE jel elektroforezi ile ayırma tabii tutuldu. DIGE deneyi için protein örnekleri DIGE Labelling Kit (Amersham, ABD) kullanılarak Cy2, Cy3 ve Cy5 floresan boya ile ayrı ayrı işaretlendi. Deney, üreticinin tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirildi. Özetle, örneklerin pH'sı işaretleme reaksiyonunun gerçekleşmesi için 8.0-8.5 aralığında olacak şekilde pH stripleriyle ayarlandı. Cy boyası çalışma solüsyonu hazırlanarak 50  $\mu$ g örnekle karıştırılarak karanlıkta, buz üzerinde 30 dk bekletildi. Bekleme süresinin ardından 10mM lizin eklenerek reaksiyon durduruldu. İşaretli örneklerden bir protein havuzu oluşturuldu ve DIGE buffer kullanılarak hacimleri 200  $\mu$ l olacak şekilde ayarlandı. Bu protein havuzuna % 1 TBP ve striplerin pH aralığına uygun %1 amfolit (Biorad, ABD) eklenerek karışım vortexlendi. İşaretli olan ve işaretli olmayan örneklerin birinci boyuttaki ayrımları 11 cm'lik pH 3-10 IPG stripler (pH 3-10 ReadyStrip Biorad, ABD) kullanılarak yapıldı. İşaretli

olmayan her bir örnekten 1000 µg alınarak 2DE-Rehidrasyon tamponu ile toplam hacim 200 µl olacak şekilde karıştırıldı. Bu karışıma son konsantrasyonları % 1 TBP ve striplerin pH aralığına uygun %1 amfolit (Biorad, ABD) eklenerek vortexlendi. Birinci boyutta ayırma hazır hale getirilen örnekler rehidrasyon *tray*lerindeki kuyucuklara yayılarak üzerlerine stripler yerleştirildi. Tray PROTEAN IEF (Biorad, ABD) cihazına yerleştirilerek 20°C ısıda 1 saat bekletildi. Ardından kuyucuklardaki striplerin üzerine kurumayı önlemek amacıyla 2-3 ml mineral yağ (Biorad, ABD) eklendi ve gece boyu inkübasyona bırakılarak striplerin örnekleri tamamen çekerek şişmesi sağlandı. Rehidrasyonun ardından stripler üzerlerinde kalan mineral yağ mümkün olduğunca uzaklaştırılarak odaklama *tray*ine alındı. Striplerin üstü mineral yağ ile kapatılarak *tray* tekrar IEF cihazına yerleştirilerek 20°C’de odaklamaya tabi tutuldu. Odaklama için, 250 V’de 20 dakika, 8000 V’de 2 saat 30 dakika ve ardından 32000 Vhr programı kullanıldı. Odaklama sonrasında 2DE yıkama tamponu I (6M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 gliserol, %2.5 (w/v) DTT) ve yıkama tamponu II (6 M üre, 0.375 M Tris.HCl pH 8.8, % 2 SDS, %20 gliserol, %2 iodoasetamid) kullanılarak 20’şer dakika çalkalanarak yıkandı. İzoelektrik noktasına göre birinci boyutta ayrımları tamamlanan örneklerin ikinci boyuttaki ayrımları %12 Bis-Tris precast jel (Biorad, ABD) kullanılarak yapıldı. Elektroforez sonrasında jeller en az bir gece fikse edilerek Colloidal Coomassie Blue G250 ile çalkalanarak boyandı. Jeller VersaDoc MP4000 (Bio-Rad, ABD) cihazı ile görüntüledi. DIGE jellerinin görüntüleri kullanılan floresan boyalara uygun filtrelerle alındı. Görüntülenen jellerin analizi PDQuest Advanced programı kullanılarak yapıldı. İstatiksel olarak anlamlı bulunan spotların kesimi otomatize robotik bir sistemle EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Kesim sırasında otomatize sistem her protein spotlarını 96 kuyucuklu tabaklara yerleştirdi.

### 3.6.2. Jel İçindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi (In-Gel Digestion)

Spot-cutter cihazında 96 kuyucuklu tabaklardan alınan protein spotları 0.6 ml’lik tüplere alındı ve *In-gel Tryptic Digestion Kit* (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde gerçekleştirildi. Kesim işlemi kısaca şu şekilde gerçekleştirildi. Protein spotları 150 µl %40 asetonitril ve %60 amonyum bikarbonat (50mM ph 8.0) çözeltisi (yıkama tamponu) ile 15 dakikalık periyotlarla renksiz hale gelene kadar yıkandı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra spotlar üzerine 50mM’lık TCEP çözeltisi eklendi ve 60°C’de 10 dakika inkübe edilerek disülfid bağlarının kırılması sağlandı. Ardından çözelti pipet

yardımla çekilerek atıldı ve bağların tekrar kurulmaması için oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat alkilleme reaksiyonu gerçekleştirildi. Alkilleme reaksiyonu için 10mM'lık IAA kullanıldı. Bu işlemin ardından spotlar yıkama tamponu ile 15 dakika yıkandı. Ardından yıkama tamponu uzaklaştırıldı ve spotların üzerine asetonyril eklenerek 15 dakika boyunca dehidrasyon sağlandı. Dehidrasyonun sonunda asetonyril pipet yardımla uzaklaştırıldı ve spotlar üzerine 10ng/ µl Tripsin solüsyonu eklenerek 37°C'de geceboyu kesim yapıldı. Kesim işleminin ardından üst sıvılar temiz tüplere aktarıldı. Tüplerde kalan spotların üzerine %10'luk TFA çözeltisi eklenerek tüpteki sıvının tamamı kesim reaksiyonunun alındığı tüplerle birleştirildi. Peptit parçalarının bulunduğu kesim reaksiyonu speed-vakum cihazı ile yaklaşık 45 dakika 60°C'de 2500 xg hızda çevrilerek kurutuldu. Çökelti %1'lik 10 µl TFA solüsyonu ile çözüldü ve peptit parçaları üreticinin tavsiye ettiği şekilde ziptip kolonuna bağlandı. Temizlenen peptitler % 1'lik sinaminik asit (%50 TFA solüsyonu, %50 Asetonyril) ile kolondan alınarak MALDI Plate'e spotlandı.

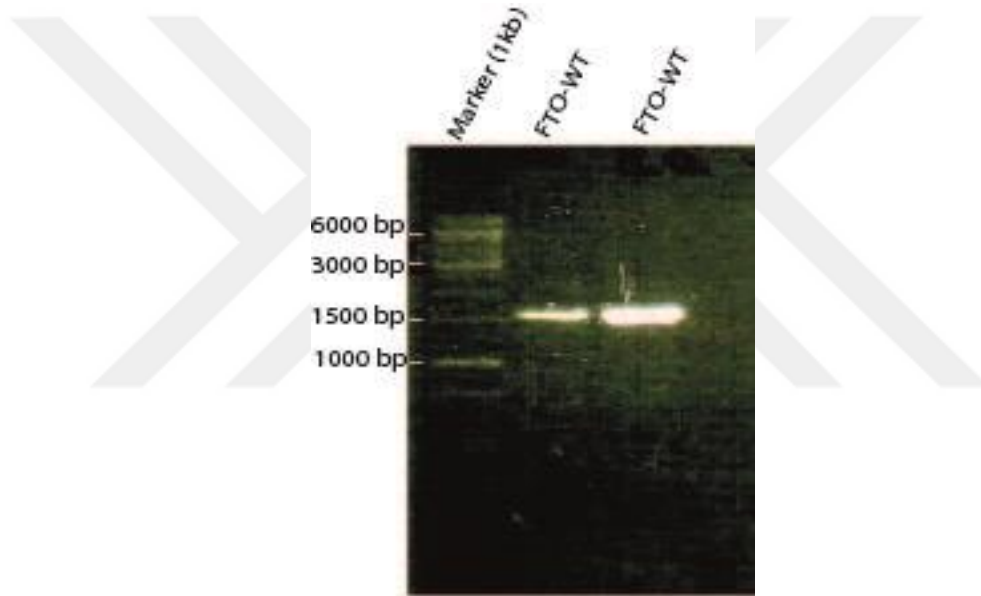
### 3.6.3. Analizlerde Kullanılan Programlar

*fto* geni istenilen vektöre rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak klonlandıktan sonra dizilendi. Dizilenen genin analizi ve gene özgü primerlerin tasarımı Vector NTI programı kullanılarak yapıldı. Western Blot analiz sonuçları ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, ABD) programı ile analiz edildi. 2DE jellerin analizinde PD Quest Advanced programı (Bio-Rad, ABD) kullanıldı. Proteinlerin kesimi ile elde edilen peptit parçaları MALDI-TOF/TOF (AB Sciex TOF/TOF 5800, ABD) cihazı ile okundu. MALDI-TOF/TOF cihazından alınan okumalar SwissProt veritabanına karşı arandı (<http://web.expasy.org/>). Belirlenen proteinler Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) ve Mascot programı ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) kullanılarak farklı hücresele yolaklarla ilişkilendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Yabancıl Tip *fto* Geninin Eldesi, Görüntülenmesi ve Dizi Analizi

Ticari olarak satılan RNA izolasyon kiti (Qiagen, ABD) ile sağlıklı bir bireyin lökositlerinden total RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyondan hemen sonra RNA'lar oligodT ve random hegzamer primer karışımı kullanılarak cDNA'ya (Fermentas, ABD) çevrildi. cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı ve *fto* genine özgü tasarlanan primerler kullanılarak tam boy *fto* geni PZR ile çoğaltıldı. Elde edilen *fto* gen ürünü agaroz jelde görüntülendi (Çizim 4.1) . Sağlıklı bireye ait PZR ürünü PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) ile temizlenerek dizi analizi için firmaya (Iontek Inc, Türkiye) gönderildi.

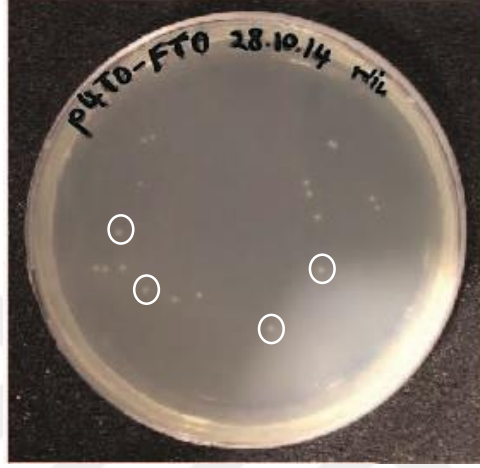


**Çizim 4.1.** PZR ile çoğaltılan *fto* geninin agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen jel görüntüsü

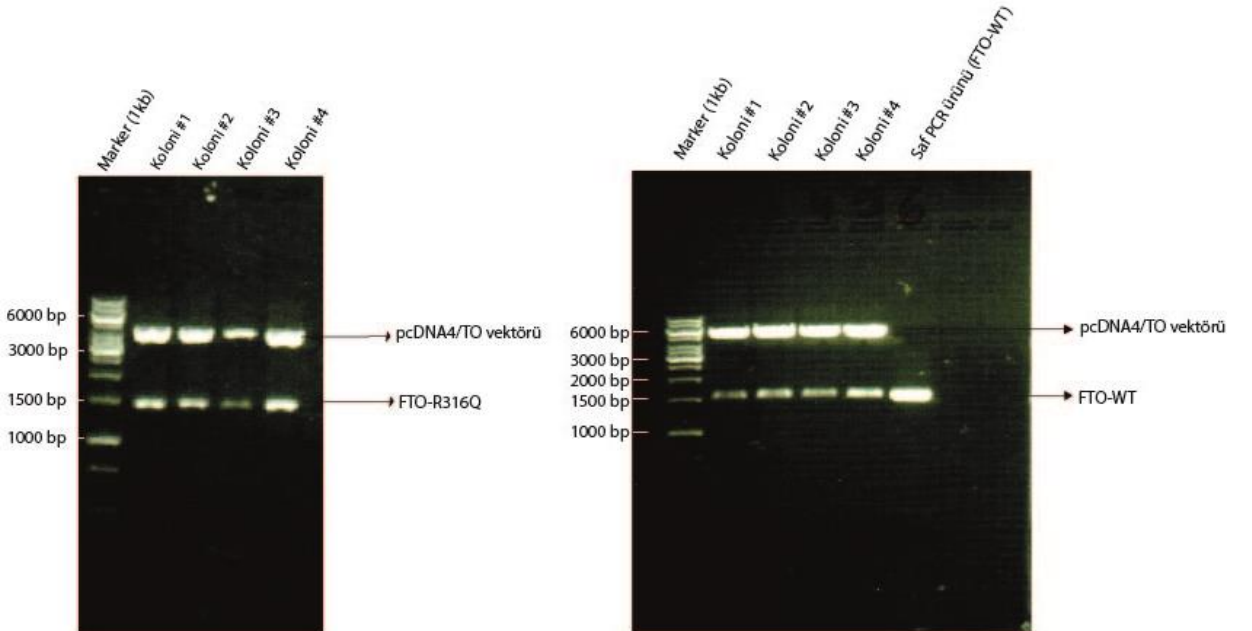
Dizilenen yabancıl tip *fto* nükleotit dizisi *in siliko* olarak protein dizisine çevrildi, çoklu dizi analizi programı kullanılarak orijinal *fto* gen dizisi ile karşılaştırılarak isteğimiz dışında bir değişim olmadığı gösterildi.

## 4.2. Yabancıl Tip *fto* PZR Ürününün Vektöre Klonlanması

Overekspresyonun sağlanabilmesi için yabancı tip *fto* geni pcDNA4/TO vektörüne klonlandı. Klonlama sonrası elde edilen transformantlar Çizim 4.2’te gösterilmiştir. Klonlama için PZR’de kullanılan primerler HindIII ve BamHI kesim bölgelerini bulundurmaktaydı. Yabancıl ve mutant *fto* genini içeren pcDNA4/TO vektörleri restriksiyon enzimleriyle kesilerek agaroz jelde yürütüldü ve transformantlar doğrulandı (Çizim 4.3).



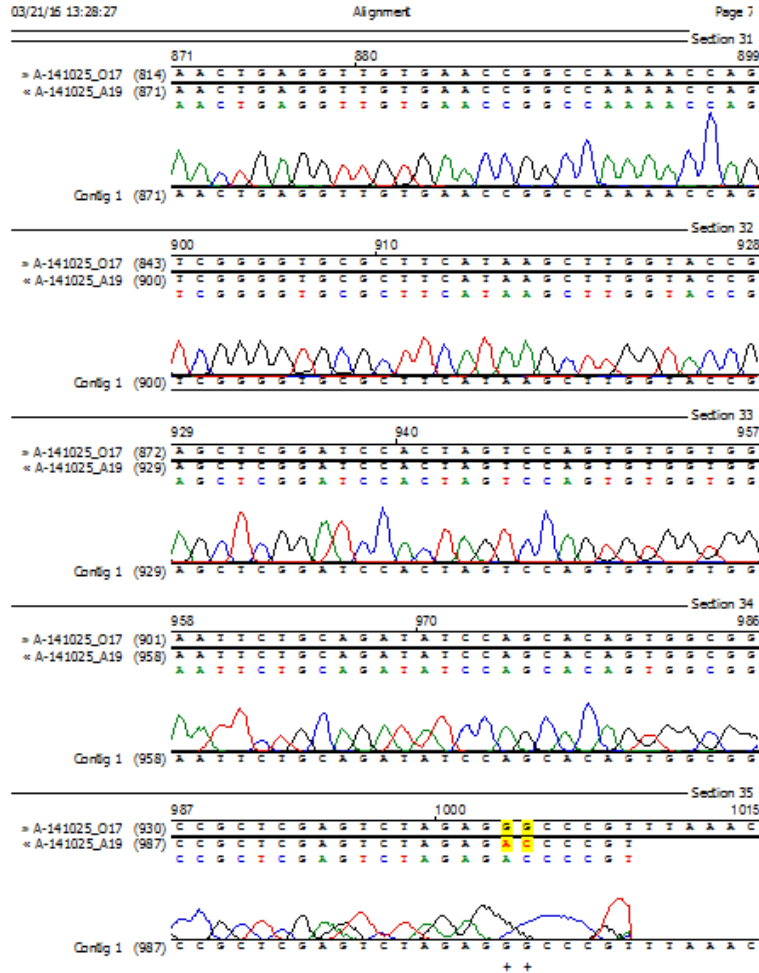
**Çizim 4.2.** Klonlama sonrası elde edilen transformantların 24 saat agar plate üzerinde büyütülmesi ile elde edilen koloniler



**Çizim 4.3.** Restriksiyon enzim kesimi sonrası insert ve vektörü görüntüleme amaçlı yürütülen agaroz jel görüntüleri.

### 4.3. Mutant *fto* Geninin Eldesi

*Fto* geni, sağlıklı bireylerden alınan kandan sırasıyla total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve PZR kullanılarak elde edildi. *fto* geninde mutasyon taşıyan örnek ise oluşturulan pcDNA4/TO-FTO WT rekombinant vektöründe yönlü mutagenез yapılarak oluşturuldu. Mutant FTO proteinini, proteinin katalitik bölgesinde [947 (G>A)] transisyonu ile elde edilmiştir. Bu değişim proteinde 316. pozisyonda pozitif yüklü arjinin amino asidi (R) yerine polar glutamin amino asidinin (Q) bağlanmasına sebep olmuştur. Bu mutasyonun FTO proteininde fonksiyon kaybına neden olduğu yapılan literatür araştırmasında görülmüştür. Yabani tip *fto* genine ait diziler ve sonuçların analizine ait detaylar aşağıda verilmiştir (Çizim 4.4).

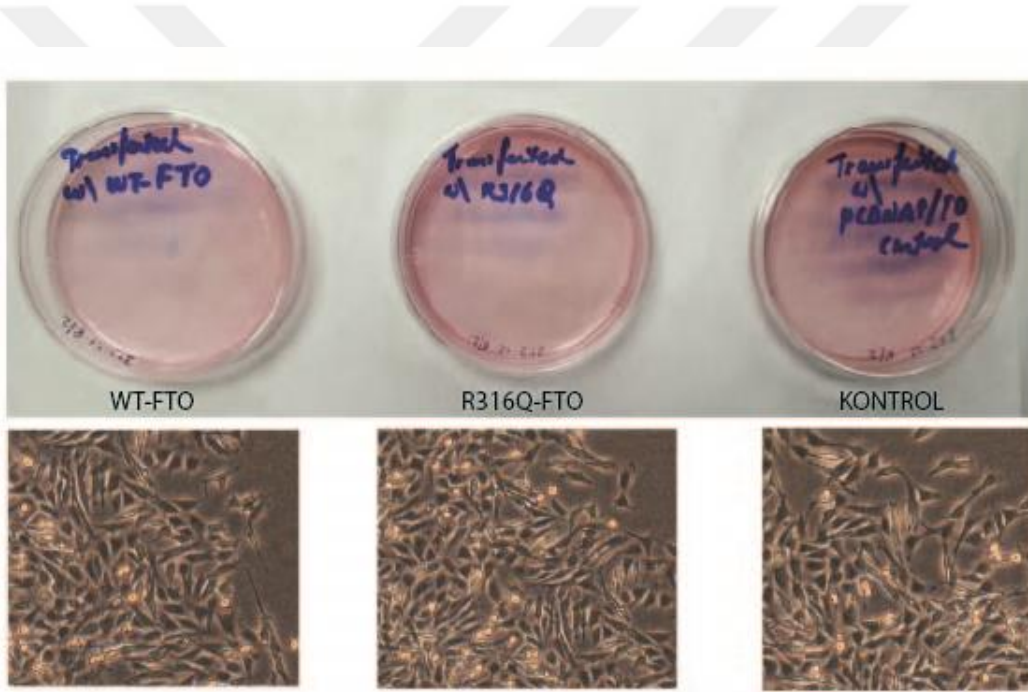


Çizim 4.4. *fto* genine ait Vector NTI programı ile align edilerek elde edilen dizileme sonuçları

#### 4.4. Yabancıl ve Mutant (R316Q) FTO Proteinini Eksprese Eden Hücrelerin

##### Oluşturulması

Transfeksiyon ile pcDNA4/TO (insert içermeyen boş vektör, kontrol) , pcDNA4/TO-FTO WT ve pcDNA4/TO-FTO R316Q rekombinant vektör yapılarını içeren üç farklı 3T3-L1 hücre oluşturuldu (Çizim 4.5). Konstitütif ekspresyon sağlayan CMV promotor altına klonlanan *fto* geni 48 saat eksprese edildi. İnsert içermeyen vektörün transfekte edildiği hücreler de eşit koşullarda tutulmuş, proteom çalışmalarında kontrol olarak kullanılmış ve protein profillerindeki karşılaştırmalar bu hücre hattından elde edilen protein özütü ile yapılmıştır.



**Çizim 4.5.** Rekombinant vektörlerle oluşturulan hücrelerin petri tabaklarındaki ve ışık mikroskopundaki görüntüleri

#### 4.5. Mutant ve Yabancıl Tip FTO Ekspresyonunun Gösterilmesi

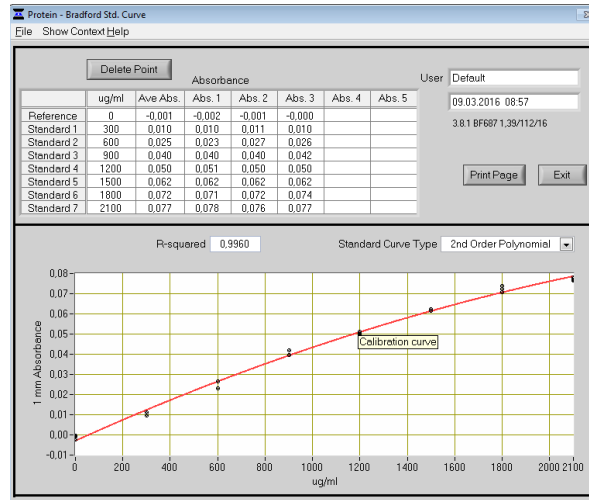
Transfeksiyon sonrası petri kaplarından toplanıp lizize uğratarak protein özütleri hazırlanan örneklerin protein konsantrasyonları ölçülmüştür. Protein konsantrasyonları Çizim 4.6 de verilen BSA (Bovine Serum Albumin) ile oluşturulmuş standart eğriye göre

hesaplandı. Çizelge 4.1’de örneklerin hesaplanan protein konsantrasyonları verilmiştir. Protein konsantrasyonları verilen örneklerin her birinden 15 µg protein alınarak %12’lik SDS-PAGE yapılarak protein konsantrasyonlarının doğru ölçüldüğü jel üzerinde doğrulandı (Çizim 4.7).

Konsantrasyonları doğrulanan örneklerle FTO ekspresyonu Western Blotlamada anti-FTO antikorunu kullanılarak gösterildi. Aynı anda β-Aktin (Beta Aktin) antikorunu da internal kontrol olarak kullanıldı (Çizim 4.8.A). Western Blotlamayla elde edilen FTO bantlarının yoğunluk değerleri Çizim 4.8.B’de verilmiştir.

#### 4.5.1. 3T3-L1 Hücrelerinde Endojen FTO Ekspresyonu

FTO pozitif olduğu bilinen bir protein örneği, transfekte edilmemiş 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen protein örneği ile beraber %12 SDS-PAGE jelinde yürütülmüştür. Moleküler büyüklüklerine göre ayrılan proteinler nitroselüloz membrana aktarılarak anti-FTO antikorunu ile Western Blotlamaya tabi tutulmuştur. Belirtilen zaman aralıklarında (5dk, 10 dk, 20 dk, 40 dk) görüntü alınarak endojen FTO ekspresyonu gösterilmiş ve anti-Beta Aktin antkorunu internal kontrol olarak kullanılmıştır (Çizim 4.9).

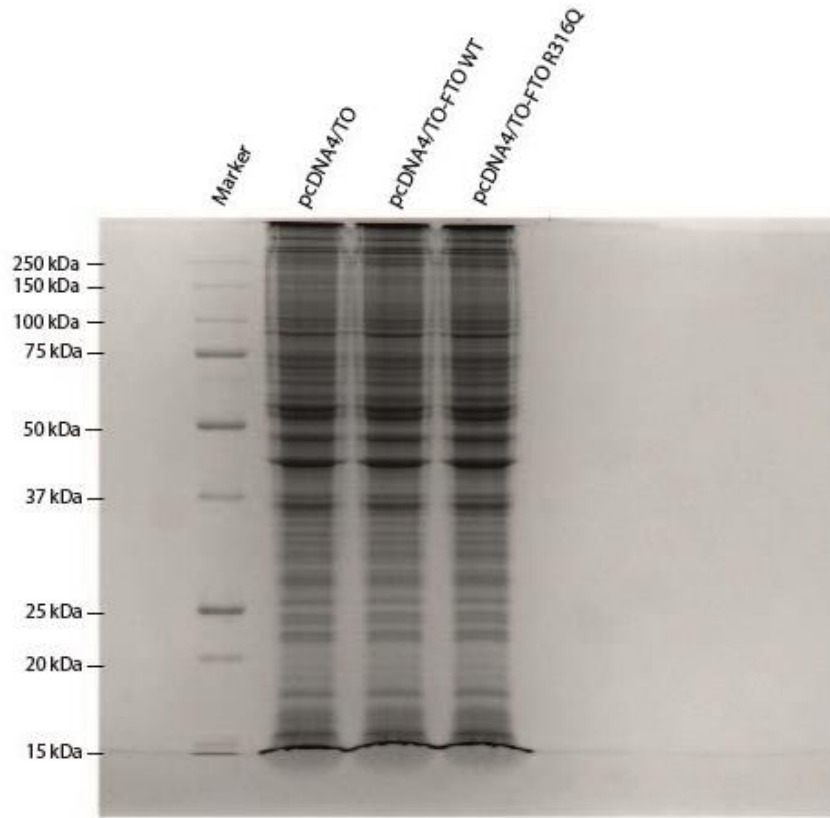


**Çizim 4.6.** BSA ile oluşturulmuş standart eğri. Transfekte edilmiş hücrelerden 48 saat ekspresyon sonrası elde edilen lizatların protein konsantrasyonu bu eğri üzerinden hesaplanmıştır.

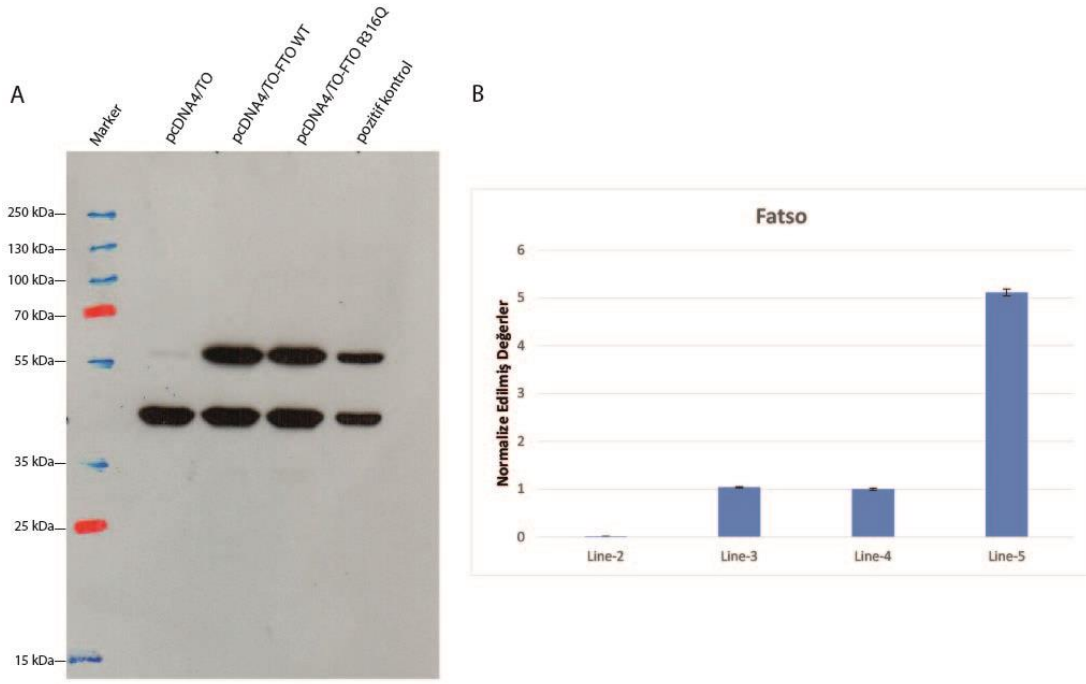


**Çizelge 4.1.** Hazırlanan protein özütlerinin protein konsantrasyonları

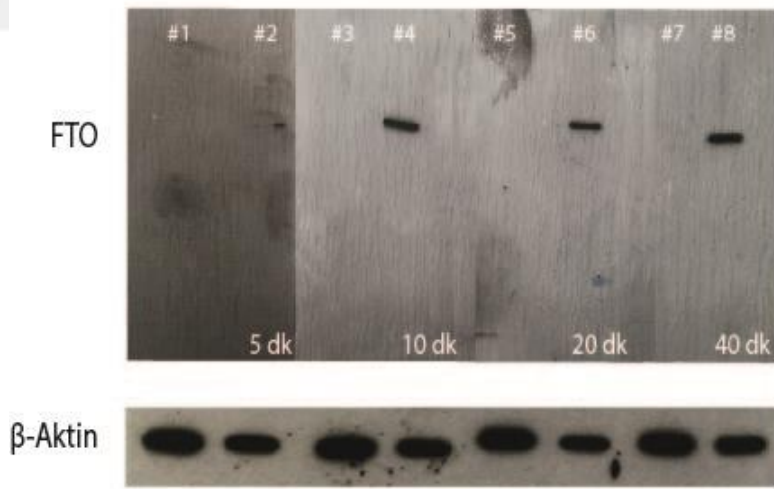
Örnek Adı	Protein Konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
3T3-L1-pcDNA4/TO	5.98
3T3-L1-pcDNA4/TO-FTO WT	5.68
3T3-L1-pcDNA4/TO-FTO R316Q	5.99



**Çizim 4.7.** Protein konsantrasyon ölçümlerinin doğruluğunu verifiye edildiği SDS-PAGE jeli. Her bir kuyucuğa 15  $\mu\text{g}$  protein yüklenmiştir.



**Çizim 4.8** (A). anti-FTO ve anti- $\beta$ -aktin antikorları kullanılarak yapılan Western Blotlama sonucu elde edilen film görüntüsü (B). FTO bantlarının yoğunluk değerlerini gösteren kolon grafiği



**Çizim 4.9.** Transfekte edilmemiş 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen lizatlarla anti-FTO ve anti- $\beta$ -aktin antikorlarına karşı yapılan WB görüntüsü. 5, 10, 20 ve 40 dakika görüntülenen membran endojen FTO ekspresyonunu göstermektedir (#1 3T3-L1 protein özütü #2 FTO+ kontrol protein özütü, #3 3T3-L1 protein özütü, #4,...)

#### 4.6. Yabani ve Mutant FTO Proteinini Eksprese Eden Hücrelerin Proteom Analizi

Mutant ve yabani tip FTO formalarının hücre üzerindeki etkilerin moleküler seviyede gözlemlenebilmesi için Proteomiks çalışmaları yapıldı.

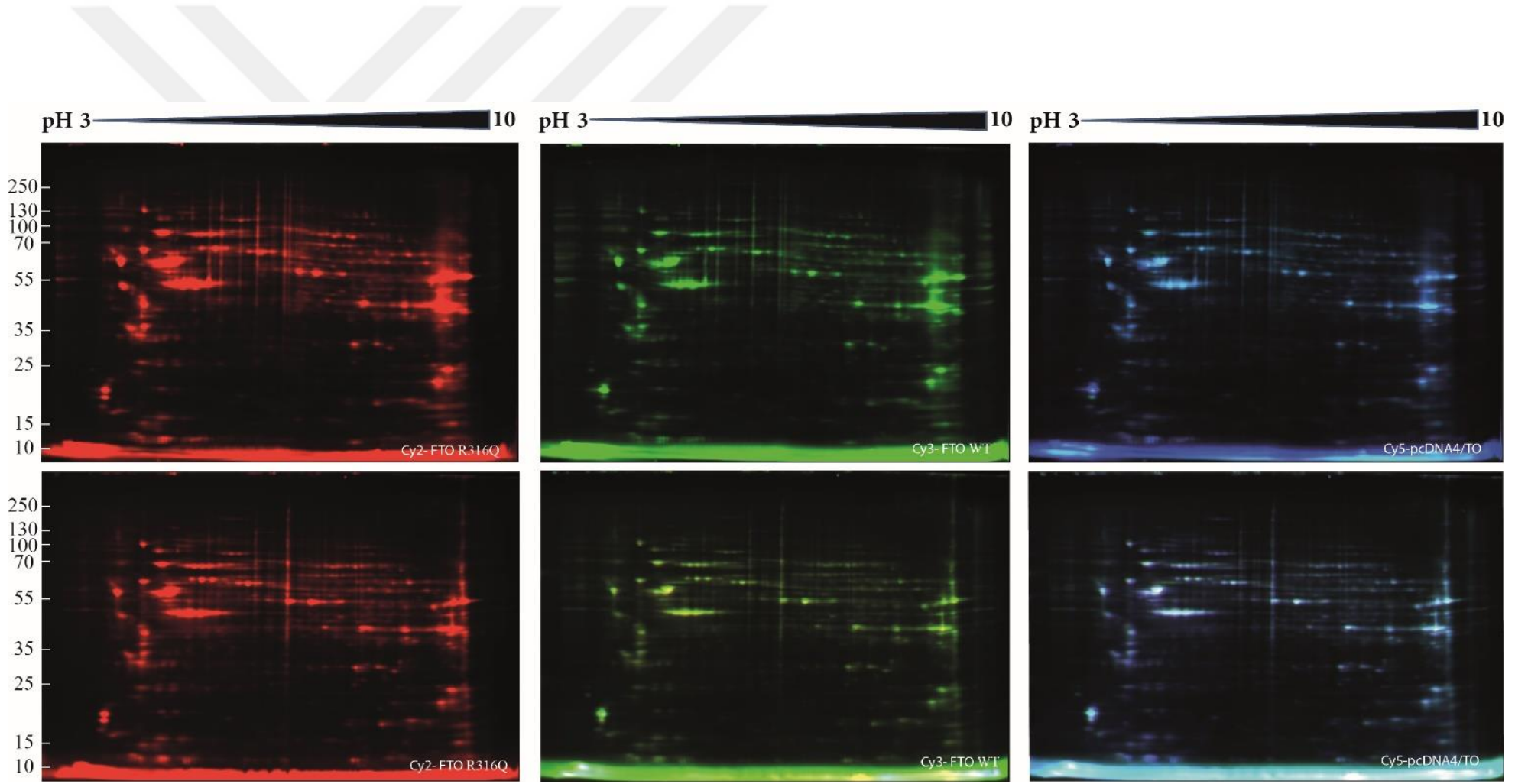
##### 4.6.1. Yabani ve Mutant FTO Proteinlerini Eksprese Eden Hücrelerin Proteom Profillerinin 2DE-DIGE Metodu Kullanılarak Karşılaştırmalı Analizleri

Çalışmanın bu kısmında yabani tip ve mutant FTO ekspresyonları yapan 3T3-L1 hücrelerinin protein profilleri DIGE (Difference Gel Electrophoresis) tekniği kullanılarak karşılaştırıldı. DIGE tekniği 2DE temelli bir tekniktir ve bu teknikte proteinler üç farklı renkte floresan boya (Cy2, Cy3, Cy5) ile işaretlenip 2DE jel üzerinde ayrı tabi tutulur. Bu tekniğin klasik 2DE tekniğine olan avantajı, farklı floresan boylarla işaretlenen proteinlerin tek bir havuzda toplandıktan sonra ayrımının tek bir strip ve jel üzerinde yapılmasıdır. Böylelikle klasik 2DE jel elektroforezinde görülen jeller arası varyasyon engellenmiş olur ve alınan sonuçlar çok daha güvenilirdir. Tasarlanan deneyde hangi protein örneğinin hangi floresan boya ile işaretlendiği Çizelge 4.2’de verilmiştir. İki tekrarlı olarak tasarlanan deneye ait detaylar şu şekildedir:

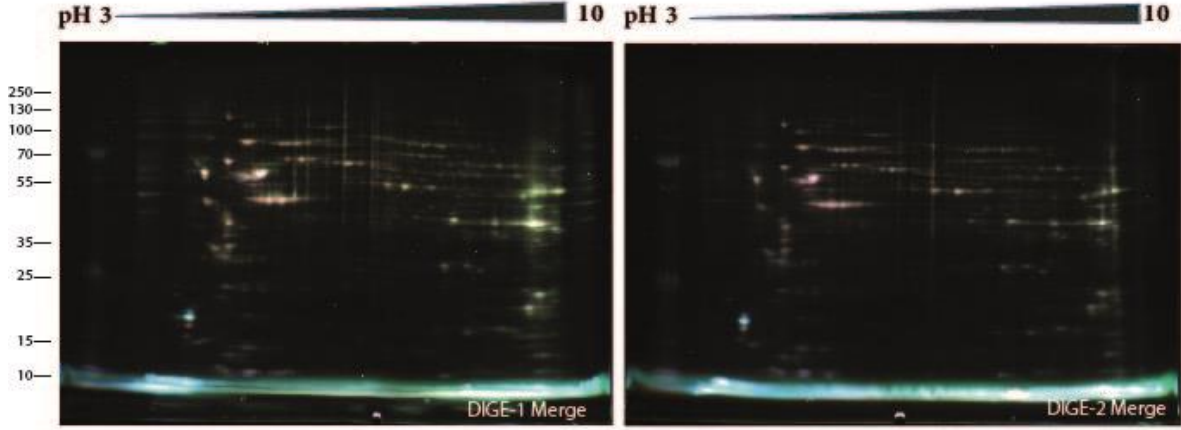
Her bir protein özütünden 50 µg protein alınarak pH’sı 8.0 olacak şekilde ayarlanmış ve ayrı ayrı Cy2, Cy3 ve Cy5 floresan boyları ile işaretlenerek birleştirilmiştir. İşaretli protein karışımı 2DE jel elektroforezine tabi tutularak yürütme sonrası floresan boylara uygun farklı filtrelerle görüntülenmiştir (Çizim 4.10). Daha sonra farklı filtrelerle alınan görüntüler üst üste konularak protein profillerindeki farklılıklar analiz edilmiştir (Çizim 4.11).

**Çizelge 4.2.** DIGE deneyine ait deney tasarımı

Floresan Boyanın Çeşidi	Protein Örneği
Cy2	FTO-R316Q
Cy3	FTO-WT
Cy5	Gen içermeyen vektör (KONTROL)



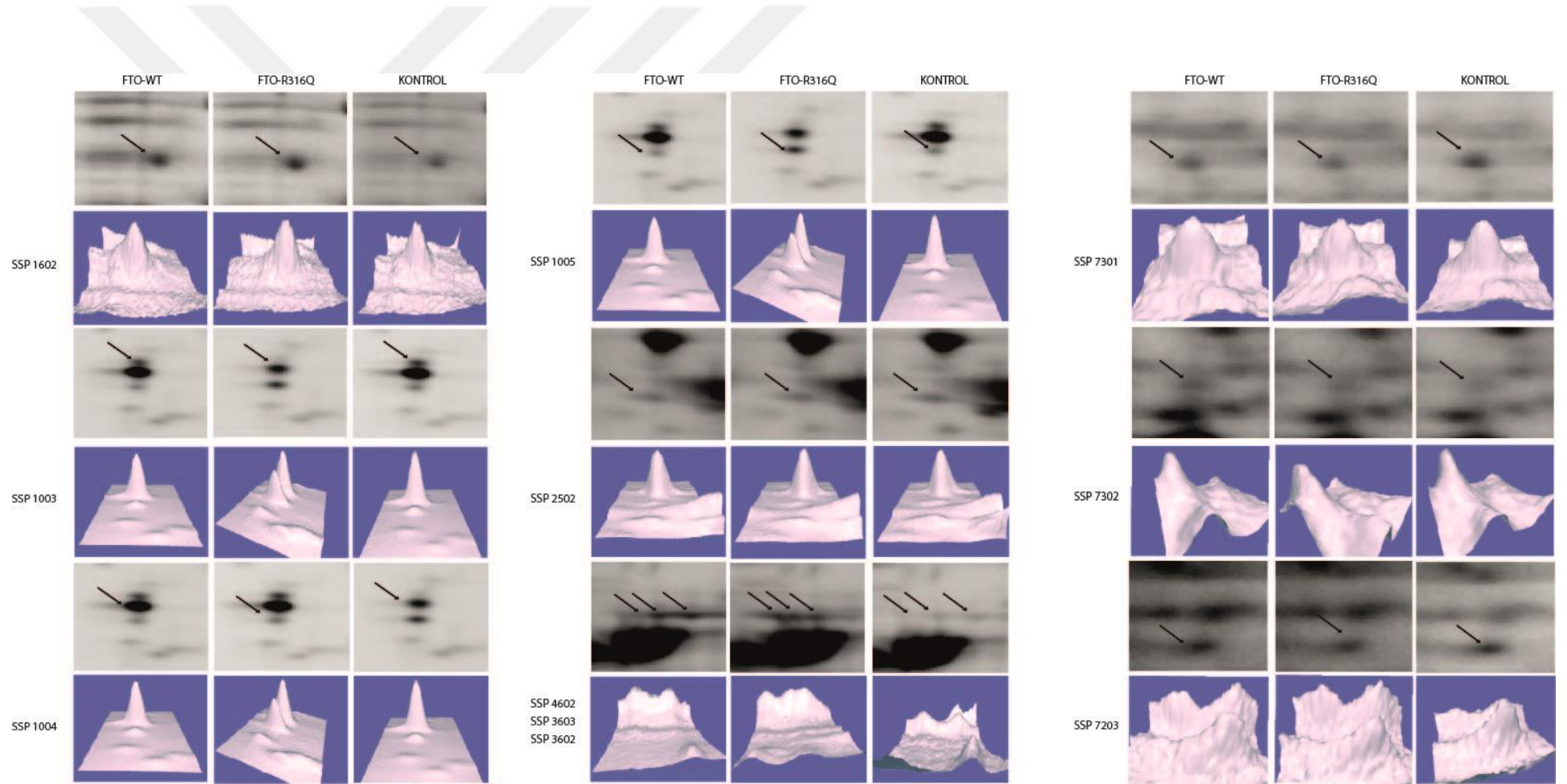
**Çizim 4.10.** DIGE jellerinin Cy2, Cy3 ve Cy5 filtreleriyle alınan görüntüleri. VersaDoc görüntüleme sistemi ile 100 saniye görüntülenmiştir.



**Çizim 4.11.** Cy boylarına uygun filtrelerle alınmış 2D jel görüntülerinin çakıştırılmasıyla elde edilen DIGE jeli görüntüsü

#### **4.6.2. Geleneksel 2DE-PAGE Metodu ile Regüle Olan Spotların Belirlenmesi ve Kesilmesi**

Yapılan DIGE deneyinde FTO WT için 50 µg, FTO R316Q için 50 µg ve kontrol pcDNA4/TO için 50 µg olmak üzere toplam 150 µg protein kullanılmıştır. Fakat DIGE deneyinin doğasına uygun olarak bu protein miktarı, protein tanımlanması için yeterli değildir. Bu nedenle DIGE deneyiyle paralel olarak; elde edilen 3 protein özütünden eşit miktarlarda alınarak yüksek miktarda protein içeren (250 µg) bir karışım hazırlanmış ve 2DE jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Preparatif jelleri oluşturan bu deney iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. Elde edilen görüntüler PDQuest Advance yazılımı ile analiz edilmiştir. Jeller üzerinde yaklaşık 300 adet protein spotu belirlenmiştir. Kontrol örneğini oluşturan pcDNA4/TO vektörü haricinde yabancı tip ve R316Q değişimini bulunduran mutant FTO ekspresyonunun 3T3-L1 hücrelerinde anlamlı olarak 11 proteinin ekspresyonunu değiştirdiği öngörülmüştür. Düzenlendiği düşünülen bu 11 protein spotunun DIGE jelleri üzerinde 3 boyutlu görüntüleri çıkarılmış ve (Çizim 4.12) preparatif jellerden otomatize spot kesim cihazı (Exquest Spot Cutter, BioRad, ABD) ile kesilmiştir. Kesilen spotların jel üzerindeki yerleri Çizim 4.13’de verilmiştir.



**Çizim 4.12.** Regüle olduğu belirlenen spotların 3D görüntüleri.



**Çizim 4.13.** Kesilen spotların jel üzerindeki yerleri SSP numaralarıyla beraber verilmiştir.

#### 4.6.3. Kesilen Protein Spotlarının MALDI-TOF/TOF ve IPA Analizleri

Kesilen spotlara jel içi tripsin kesimi yapılarak elde edilen peptit karışımları MALDI-TOF/TOF analizine tabi tutulmuştur. Swiss Prot veri bankasına karşı yapılan aramayla tanımlanan bu proteinler Çizelge 4.3'te SSP numaraları, erişim numaraları, kütleleri, skorları, izoelektrik noktaları, "expect" değerleri, iyon skorları/"coverage" yüzdeleri ve eşleşen peptit dizileri ayrıntılarla verilmiştir. Tanımlanan proteinlerden 1005 ve 1602 SSP numaralı proteinler keratin olarak tanımlanmıştır. Keratin proteinlerinin "expect" değerleri sırasıyla 0,059 ve 4,2E-005 olarak verilmiştir. Düşük "expect" değerleri tanımlanan proteinler yüksek doğrulukla tanımlandığını göstermektedir. Sekans "coverage" ları düşük olmasına rağmen iyon skorları oldukça yüksektir. "Sekans coverage", *in siliko* olarak data bankasındaki peptitlerle eşleşen peptit dizilerinin data bankasındaki yüzdelerini ifade etmektedir. SSP numarası 2502 olarak verilen protein düşük "expect" değeri ile vimentin olarak tanımlanmıştır. Yüksek coverage ve yüksek iyon skoru ile tanımlanan bu protein altında desmin proteini de hit vermiştir. Vimentin için 5 ve desmin için 2 peptit dizisi databankasındaki peptit dizileriyle eşleşmiştir. SSP numarası 1003 olarak verilen parathymosin hariç geri kalan proteinlerin düşük "expect" değerleri baz alınarak yüksek doğrulukla tanımlandıkları söylenebilir. %17 ila %42 arasında değişen sekans "coverage"ları da deneysel verinin databankasındaki teorik veri ile yüksek oranda eşleştiğini verifiye etmektedir. Parathymosin ise düşük "coverage" vermesine rağmen iyon skoru ile tanımlanmıştır.

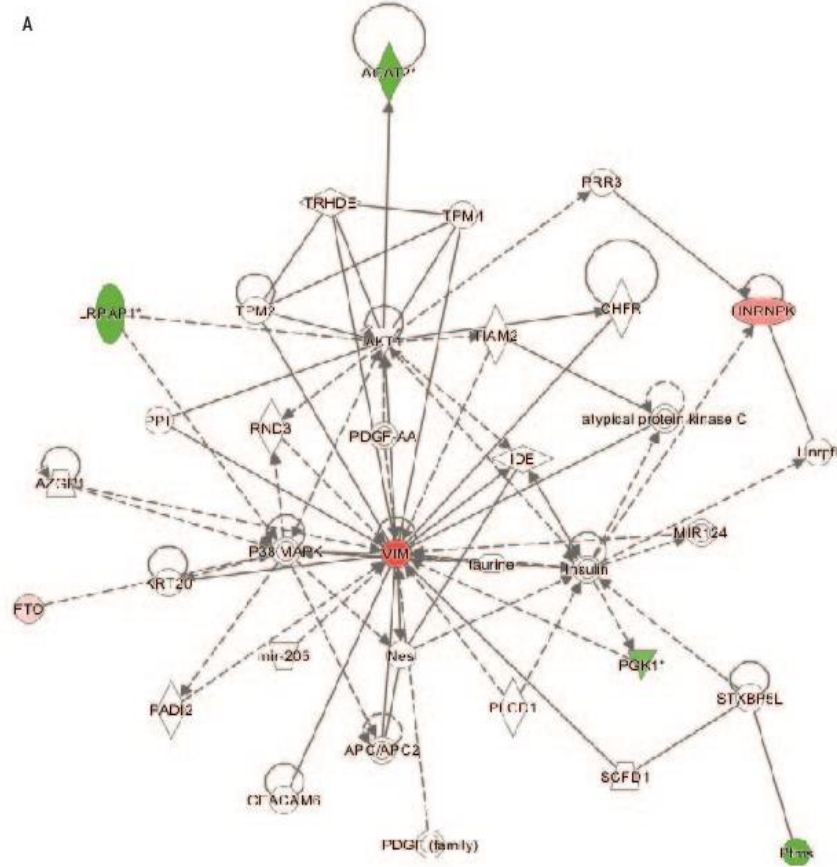
Proteinlerin jellerdeki spot yoğunluğu PDQuest yazılımı (BioRad, ABD) kullanılarak kontrole oranlanmış ve yoğunluklarında kaç katlık bir değişim olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). Regüle olan proteinler arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarabilmek için IPA analizleri yapıldı. IPA analizi sonuçları bulunan proteinlerin tek bir yolakla ilişkili olduğunu göstermiştir (Çizim 4.13).



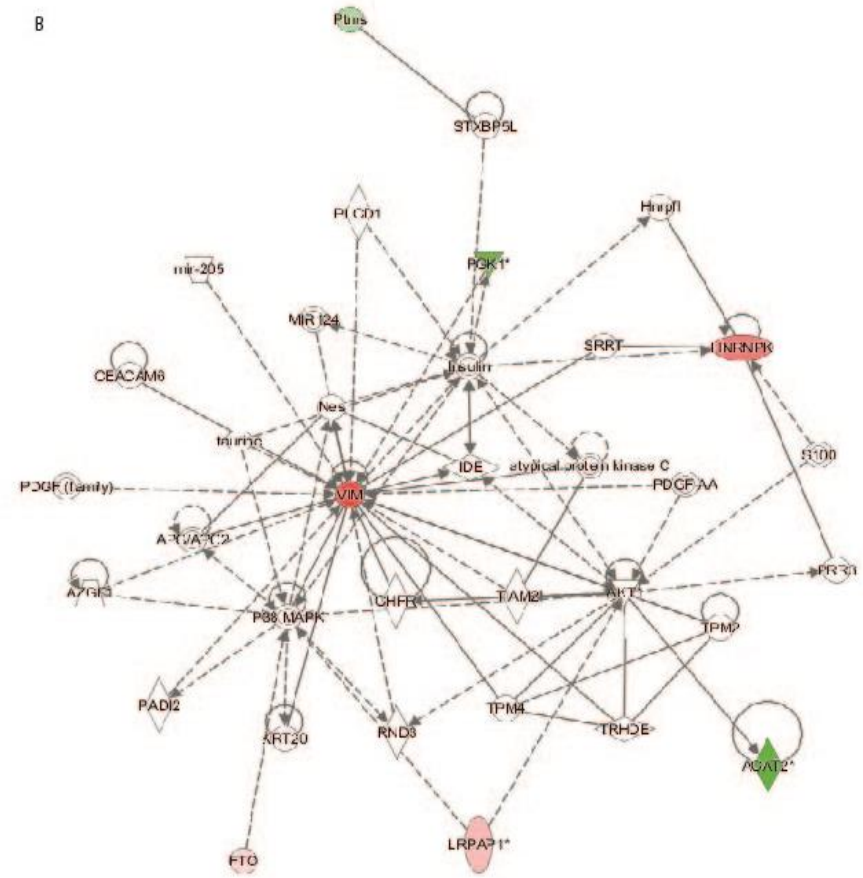
**Çizelge 4.3. MALDI-TOF/TOF ile tanımlanan proteinler**

SSP Numbers	Accession Number	Gene Name	Best Protein Mass	Best Protein Score	Protein Description	Calculated pI	Expect	Observed Mr(calc)	Ion Score/Coverage (%)	Peptide
1005	Q4FZU2	K2O6A_RAT	59213	56	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus	8,06	0.059	1179,61 1178,59	50/5	K.YEELQITAGR.H
1602	Q4FZU2	K2O6A_RAT	668	88	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Rattus norvegicus	8,06	4.2e-005	1179,63 1178,59	80/7	K.YEELQITAGR.H
2502	P20152	VIME_MOUSE	53655	668	Vimentin OS=Mus musculus	5,06	4,00E-63	1296,64 1295,6	86/53	R.EEAESTLQSF.R.Q
								1587,83 1586,79	85	R.TNEKVELQELNDR.F
								1734,85 1733,81	76	R.LQDEIQNMKEEMAR.H
	P48657	Des	53424	192	Desmin OS=Rattus norvegicus	5,21	1.6e-015	1587,83 1586,79	85/23	R.TNEKVELQELNDR.F
								1115,58 1114,56	53	K.VELQELNDR.F
7203	Q8CAY6	THIC_MOUSE	41271	250	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic OS=Mus musculus	7,16	2,50E-21	1753,98 1752,95	69/29	K.AGHDFKIEVPLVSSR.K
								2667,39 2666,31	50	K.VAPEEVSEVIFGHVLTAGCGQNPT.R.Q
								944,545 943,535	36	K.APHLTHLR.T
								1935,02 1933,98	35	K.VNIDGGAIALGHPLGASGCR.I
								1307,8 1306,8	23	R.ILVTLHLTLR.V
7302	P55302	AMRP_MOUSE	42189	230	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated pprotein OS=Mus mus	7,35	2.5e-019	1563,86 1562,83	69/36	K.IQEYNVLLDLSR.A
								1823,86 1822,81	55	K.VSHQGYGSTTEFEPR.V
								1475,75 1474,72	26	K.HVESIGDPEHISR.N
3602	P20152	VIME_MOUSE	53655	390	Vimentin OS=Mus musculus	5,06	2.5e-035	1587,82 1586,79	59/42	R.TNEKVELQELNDR.F
								1254,58 1253,56	59	R.LGDIYEEEMR.E
								1296,63 1295,6	59	R.EEAESTLQSF.R.Q
1003	Q9D0J8	PTMS_MOUSE	11423	69	Parathyrosin OS=Mus musculus	4,17	0.003	1389,63 1388,61	66/11	R.TAEEDDEADPKR.Q
1004	Q9C0B1	FTO_MOUSE	58245	427	Protein fto OS=Homo sapiens	5,1	1,00E-37	1914,94 1913,89	79	K.QGEEIHNEVEFEWLR.Q
								927,488 926,482	52	R.EGLPVEQR.N
								1708,82 1707,78	50	K.MAVSWHHDENLVDR.S
								1792,84 1791,79	44	K.ANEDAVPLCMSADFP.R.V
								1725,88 1724,84	36	R.VAECSTGLDYILQR.C
3603	P61979	HNRPK_MOUSE	50944	255	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Mus musculus	5,39	1.3e-020	1194,7 1193,69	94/17	R.NLPLPPPPPR.G
								1549,67 1548,65	63	K.LFQECPPHSTDR.V
								1780,83 1779,79	55	R.TDYNASVSPDSSGPER.I
								1098,47 1097,44	23	K.GSDFDCELR.L
4602	P61979	HNRPK_MOUSE	50944	316	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Mus musculus	5,39	6.4e-028	1780,78 1779,79	82/25	R.TDYNASVSPDSSGPER.I
								1194,68 1193,69	60	R.NLPLPPPPPR.G
								1098,48 1097,44	52	K.GSDFDCELR.L
								1053,62 1052,63	45	R.VVLIIGGKPR.V
								1549,63 1548,65	32	K.LFQECPPHSTDR.V
7301	P09411	PGK1_MOUSE	44522	277	Phosphoglycerate kinase 1 OS=Mus musculus	8,02	5,00E-24	2782,38 2781,34	84/34	K.DCVGPEVENACANPAAGTVILLENLR.F
								1634,79 1633,78	66	K.LGDVYYNDAFGTAHR.A
								1769,01 1767,99	39	K.ALESPPFLAILGGAK.V
								2023,03 2022,03	28	K.ITLPVDFVTADKFDENAK.T

A



B



**Çizim 4.14.** IPA analizi sonucu düzenlendiği belirlenen yollar. (Kırmızı: ekspresyonu azalmış, yeşil ekspresyonu artmış) (A) R316Q mutant FTO proteini (B) Yabanıl tip FTO proteini

**Çizelge 4.4.** Mutant ve yabancı FTO'nun overeksprese edildiği örneklerde düzenlendiği belirlenen proteinlerin kontrol örneğine olan oranları

<b>Tanımlanan Proteinler</b>	<b>FTO-R316Q/KONTROL</b>	<b>FTO-WT/KONTROL</b>
VIME_MOUSE	5,75	5,07
THIC_MOUSE	0,865	0,675
PTMS_MOUSE	0,255	0,76
FTO_MOUSE	5,84	5,73
HNRPK_MOUSE	3,775	2,6
PGK1_MOUSE	0,64	0,51
AMRP_MOUSE	1,545	0,76
K2C6A_MOUSE	0,87	0,885

## 5. TARTIŞMA

Santral dogma olayı ile DNA'daki genetik bilgi RNA aracılığıyla proteine aktarılır. Bu aktarım DNA ve histon proteinleri üzerinde meydana gelen reversible epigenetik modifikasyonlar tarafından düzenlenmektedir. Bu modifikasyonlardan biri olan metilasyonun, biyolojik süreçler süresince bir genin proteine dönüşeceği ya da susturulacağı kararının verilmesinde yani gen ekspresyonunun dozajının ayarlanmasında önemli rol aldığı artık bilinmektedir. Biyolojik sistemlerde RNA'nın genetik bilgiyi sadece proteine çevirmek olmadığı, DNA ve histon modifikasyonlarında olduğu gibi mRNA modifikasyonlarının da 'tuning' yaptığı ileri sürülmüştür (He, 2010). Bu modifikasyonların en yaygını olan mRNA'larda adenin bazının 6. pozisyonundaki C atomuna bağlanan metil grubu (N<sup>6</sup>metiladenozin), transkriptin proteine çevrilip çevrilmeyeceği ya da ne zaman veya ne kadar çevrileceği kararının verilmesinde anahtar rol oynamaktadır. Bu karar m<sup>6</sup>A üzerindeki kodun "reader" proteinler tarafından bağlanarak okunması ile verilmektedir. Overeksprese ettiğimiz FTO proteinin bu tablo içerisinde m<sup>6</sup>A modifikasyonunu yapan proteinlerden biri olarak rol aldığı bilinmektedir (Fu ve diğ., 2013). Bu çalışmada FTO proteininin m<sup>6</sup>A üzerinde yaptığı oksidatif demetilasyonun protein profiline etkisi 3T3-L1 hücrelerinde soluble proteom çalışılarak araştırıldı. FTO overekspresyonu sonrasında ekspresyon seviyeleri değişen 8 protein saptandı. Bu proteinlerden biri FTO proteinin kendisi olup, overeksprese edildiği 2DE jel elektroforezinden bağımsız olarak WB çalışmasıyla da gösterilmiştir. Yüksek duyarlılıktaki FTO antikoru kullandığımız 3T3-L1 hücre hattında protein düzeyinde tespit edilebilir endojen FTO ekspresyonu olmadığını göstermiştir. Gözardı edilemeyecek seviyede endojen FTO ekspresyonu tespit edilse dahi, hücre hatlarını bir proteini overeksprese edecek şekilde indüklemek hala bir proteinin fizyolojik rolünün araştırılması için yaygın şekilde kullanılan bir yaklaşımdır.

Çalışmada kullanılan deneysel tasarım, mutant (R316Q) ya da yabancı tipteki FTO proteinlerini 3T3-L1 preadiposit hücre hatlarında eksprese edilerek soluble proteom profillerinin karşılaştırılmasıdır.

Bu çalışmada FTO overekspresyonunu takiben ekspresyon seviyeleri değişen soluble proteinler hücre içerisindeki biyolojik fonksiyonlarıyla beraber aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır.

## **VIME\_MOUSE**

Omurgalılarda bulunan intermediate filamentlerin major tiplerinden biridir. Vimentin sınıf-III intermediate filamentlerden olup özellikle mezenkimal kökenli hücrelere mekanik destek sağlarlar. Yüksek derecede dinamik yapıda olan bu proteinlerin fosforilasyonu normal koşullarda birbirlerinden ayrılmalarına neden olur. Nükleus, endoplazmik retikulum ve mitokondriye bağlı halde bulunurlar.

## **DESM\_MOUSE**

Desmin sınıf-III intermediate filamentlerdendir. Kas hücrelerinde bulunarak hücreye mekanik destek sağlarlar. Özellikle çizgili kaslarda miyofibrillerle bağlantılı fibröz ağı oluşturmaktadırlar.

## **K2C6A\_RAT**

Epidermis-spesifik tip-I keratin yara iyileşmesinde rol oynamaktadır. Yaralanmaların ardından keratinositlerin çoğalmasında ve göçünde majör rol oynamaz fakat foliküler keratinositlerin aktifleştirilmesine ve SRC aktivitesini inhibe ederek epitelyal göçün düzenlenmesine katılır.

## **THIC\_MOUSE**

Tiolaz olarak da bilinen Asetil-CoA asetil transferaz dual foksiyonu olan bir enzimdir. Bu fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir; yağ asidi metabolizmasında son basamağı olan  $\beta$  oksidasyon basamağında görev alır ve koenzim A'yı kofaktör olarak kullanarak keton cisimciklerinin oluşumunu düzenler.

## **PGK1\_MOUSE**

Fosfogliserat kinaz 1, 1,3-difosfogliseratın 3-fosfogliserata dönüşümünü katalizleyen glikolitik bir enzimdir. Bu aktivitesine ek olarak bu protein, tümör hücrelerinden salınarak anjiyogenesisise katılır.

## **AMRP\_MOUSE**

Glikoprotein yapıdaki LDL-receptor- related protein-associated protein LDL-receptor-related proteinlerle etkileşir ve endoplazmik retikulumda reseptörün ligandı ile bağlanmasını engelleyerek reseptör birikimini ve degradasyonu engeller. Proteinin uygun katlanmasına ve lokalizasyonuna yardımcı olarak moleküler şaperon gibi davranır. Bu protein LRP1 ve LRP2 proteinlerini de içeren LDL reseptör ailesinin trafiğine katılır.

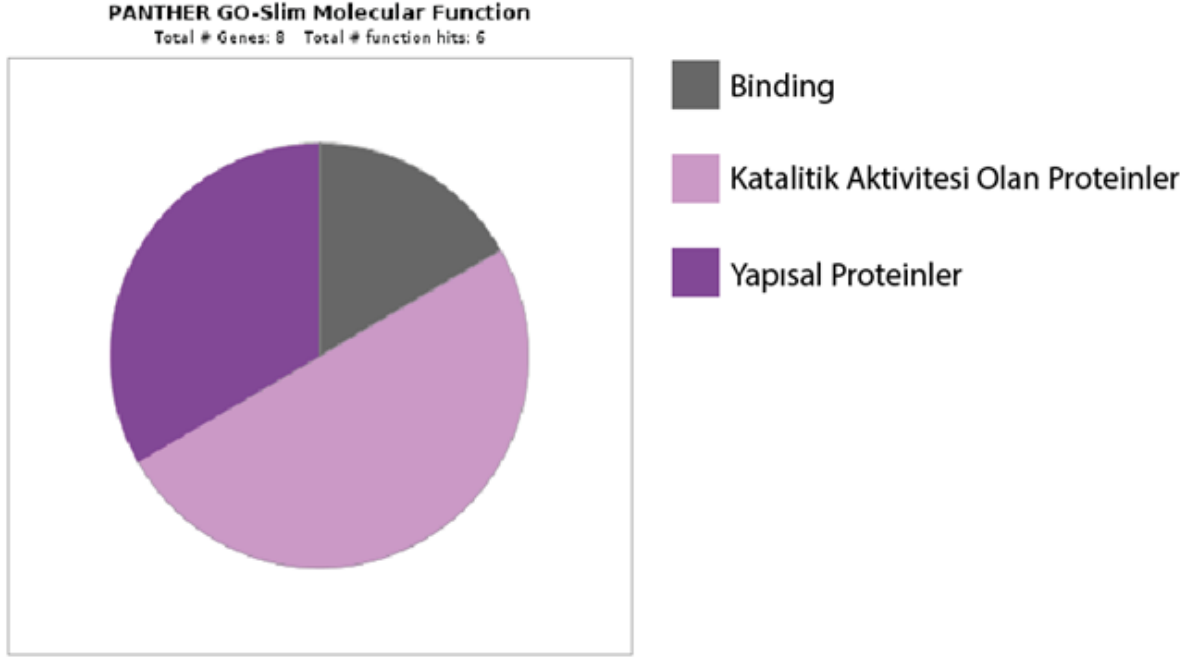
## **PTMS\_MOUSE**

Parathymosin, enfeksiyonlara karşı direnç sağlayan prothymosin alfanın etkisini bloke ederek immün fonksiyonlara aracılık eden bir proteindir.

## **HNRPK\_MOUSE**

Majör pre-mRNA binding proteinlerden biri olup pre-mRNA'da ve tek iplikli DNA'da poly(C) dizilerine bağlanır. hnRNA'ya bağlanarak nüklear metabolizmada önemli rol oynamaktadır. A, B, C, G, K, U altgrupları olan bu protein üzerinde fosforilasyon, ubiquitinasyon, ve metilasyon meydana gelebildiği ileri sürülmüştür (Dreyfuss ve diğ., 1993).

FTO proteinin fizyolojik olarak etkileştiğini düşündüğümüz proteinleri PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) analizi ile moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırıldığında pastanın büyük bir bölümünü yapısal proteinlerin (VIM, K2C6A), geri kalan kısmını ise "binding" (HNRPK) ve katalitik aktivitesi olan proteinlerin (HNRPK, THIC, PGK1) oluşturduğunu görüldü (Çizim 5.1).



**Çizim 5.1.** Proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre sınıflandırılmasını gösteren pasta grafiği

Bu çalışmada tanımlanan yapısal ve katalitik aktivitesi olan proteinlere bu tarz 2DE proteom çalışmalarında oldukça sık rastlanmaktadır. Ekspresyon seviyesindeki farklılıkların düşük seviyede olduğu da göz önüne alındığında; gözlemlenen farklılıkların FTO'dan bağımsız bir şekilde, çevre şartlarındaki küçük değişikliklerden kaynaklandığı düşünüldü. Bu nedenle yaptığımız literatür araştırmasına da dayanarak tanımlanan bu proteinlerin FTO ekspresyonu ile doğrudan ilişkilendirilemeyeceğini düşünmekteyiz. Tanımladığımız katalitik aktivitesi olan proteinler özellikle glikoliz ile ilişkili proteinlerdir. Bu proteinlerin hücrelerin oksijensiz kalmış olmasından kaynaklanabileceğini ileri sürebiliriz.

Tanımladığımız proteinler arasında HNRPK (Heterogenous Nuclear Protein K) proteini dikkat çekmektedir. Hem katalitik aktivitesi olan hem de bir RNA binding protein olan HNRP proteinlerinin hnRNP'lerle karmaşık ve çeşitli ilişkilerinin olması onları çok yönlü birer protein haline getirmiştir. Üstelik bu protein, hnRNA'nın (nüklear RNA) olgun mRNA'lara dönüşmesine katılmakla kalmayıp aynı zamanda gen ekspresyonunu düzenleyen trans-acting bir protein olarak da görev yapmaktadır. Bu belirleyici faktör splicing (Chou ve diğ., 1999; Mourelatos ve diğ., 2001), mRNA'nın nükleustan sitoplazmaya taşınması (Gallouzi and Steitz, 2001), lokalizasyonu (Carson ve diğ., 2001), translasyonu (Habelhah ve diğ., 2001) ve stabilitesi (Xu ve diğ., 2001) gibi mRNA

proseslerini de kapsamaktadır (Alarcon ve diğ., 2015; Dreyfuss ve diğ., 2002). hnRNP'ler hnRNA ile etkileşir ve hnRNA'nın yapısını değiştirerek pre-mRNA işlenmesi için gerekli diğer bileşenlerin hnRNA ile olan ilişkisini de etkiler (Dreyfuss ve diğ., 1993). Diğer bir deyişle hnRNP'ler RNA metabolizmasına hem nükleusta hem de sitoplazmada dahil olmaktadır.

DNA'nın transkripsiyonu ile oluşan hnRNA'lara bir RNA metiltransferaz heterokompleksi olan METT14-METTL3/WTAP tarafından metil ( $m^6A$ ) bağlanır (Fu ve diğ., 2014; Liu ve diğ., 2014). Bu bağlanma hnRNA'nın bir anlamda kaderine karar verir. Sentezlenen ve işlenen RNA nükleusta tutularak translasyon geciktirilecek midir yoksa bu RNA sitoplazmaya mı geçecektir?  $m^6A$  bu geçişe üzerine bağlanan bir protein aracılığıyla katılır. Nükleusta kümeler halinde bulunan FTO proteini mRNA'nın sitoplazmaya geçişinde rol oynayan bu metil grubunu sitoplazmaya geçişinden önce modifiye eder (Fu ve diğ., 2014). FTO'nun  $m^6A$ 'da oksidatif demetilasyonla gerçekleştirdiği modifikasyonlar sonucu  $f^6A$  ( $N^6$ -formiladenosin),  $hm^6A$  ( $N^6$ -hidroksimetiladenozin) gibi "short lived" modifikasyonları taşıyan RNA'lar oluşmaktadır (Jia ve diğ., 2013). Gen ekspresyonu dozajının RNA üzerindeki bu modifikasyonların "reader" proteinler tarafından okunarak gerçekleştiği ve bunun için de üç farklı seçici "reader" mekanizmasından bahsedilmiştir. Bunlardan ilki  $m^6A$  modifikasyonunun RNA'nın sekonder yapısını değiştirerek protein-RNA etkileşimini değiştirmesiyle gerçekleşen mekanizma. İkincisi,  $m^6A$  modifikasyonunun RNA içerisinde spesifik bir bölgede yapılması sonucu benzer RNA-binding proteinlerin etkileşimini zayıflatmasıyla gerçekleşen mekanizma ve üçüncüsü ise "reader" proteininin  $m^6A$  modifikasyonunu bulunduran RNA'ya bağlanması ile gerçekleşen mekanizma (Fu ve diğ., 2014).

hnRNP'lerin potansiyel  $m^6A$  selektif binding proteinler olduğu düşünülmektedir (Alarcon ve diğ., 2015; Dominissini ve diğ., 2012). "Reader" oldukları düşünülen bu proteinler diğer mRNA'lara bağlı RNA-binding proteinlerle etkileşir. Bu durum P-cisimciklerinin ve stres granüllerinin oluşumuna neden olarak translasyonu etkilemektedir (Fu ve diğ., 2014). Bu süreçte görev alan "reader" proteinler hala tam anlamıyla ortaya konulamamıştır. Yaptığımız bu çalışmada HNRPK proteininin FTO overekspresyonuna bağlı ekspresyon artışı; FTO'nun pre-mRNA'da yaptığı  $m^6A$  oksidasyonunu/modifikasyonunu farklı bir şekilde okuyarak protein ekspresyonunu spesifik olmaksızın değiştirebileceğini ileri sürmekteyiz.



## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

*İn vitro* ortamda RNA'larda metilasyon seviyelerinin çalışılması ve transkriptom düzeyinde bir yaklaşım ile beraber nükleer proteomla da çalışılması bu çalışmanın tamamlanabilmesi ve FTO proteinin hücre içerisindeki biyokimyasal rolünün daha iyi ve geniş çapta anlaşılabilmesi açısından gelecek vadetmektedir.



## KAYNAKLAR

- Alarcon, C.R., H. Goodarzi, H. Lee ve diğ. 2015. HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell*. 162:1299-1308.
- Anselme, I., C. Laclef, M. Lanaud ve diğ. 2007. Defects in brain patterning and head morphogenesis in the mouse mutant Fused toes. *Developmental biology*. 304:208-220.
- Berulava, T., M. Ziehe, L. Klein-Hitpass ve diğ. 2013. FTO levels affect RNA modification and the transcriptome. *European journal of human genetics : EJHG*. 21:317-323.
- Boissel, S., O. Reish, K. Proulx ve diğ. 2009. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *American journal of human genetics*. 85:106-111.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72:248-254.
- Carson, J.H., H. Cui, W. Krueger ve diğ. 2001. RNA trafficking in oligodendrocytes. *Results and problems in cell differentiation*. 34:69-81.
- Cheung, M.K., and G.S. Yeo. 2011. FTO Biology and Obesity: Why Do a Billion of Us Weigh 3 kg More? *Frontiers in endocrinology*. 2:4.
- Chou, M.Y., N. Rooke, C.W. Turck ve diğ. 1999. hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Molecular and cellular biology*. 19:69-77.
- Church, C., S. Lee, E.A. Bagg ve diğ. 2009. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS genetics*. 5:e1000599.
- Church, C., L. Moir, F. McMurray ve diğ. 2010. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nature genetics*. 42:1086-1092.
- Despres, J.P., and I. Lemieux. 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 444:881-887.
- Dina, C., D. Meyre, S. Gallina ve diğ. 2007. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature genetics*. 39:724-726.
- Dominissini, D., S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz ve diğ. 2012. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*. 485:201-206.
- Dreyfuss, G., V.N. Kim, and N. Kataoka. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3:195-205.
- Dreyfuss, G., M.J. Matunis, S. Pinol-Roma ve diğ. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annual review of biochemistry*. 62:289-321.

Fischer, J., L. Koch, C. Emmerling ve diğ. 2009. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature*. 458:894-898.

Frayling, T.M., N.J. Timpson, M.N. Weedon ve diğ. 2007. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 316:889-894.

Fu, Y., D. Dominissini, G. Rechavi ve diğ. 2014. Gene expression regulation mediated through reversible m(6)A RNA methylation. *Nature reviews. Genetics*. 15:293-306.

Fu, Y., G. Jia, X. Pang ve diğ. 2013. FTO-mediated formation of N6-hydroxymethyladenosine and N6-formyladenosine in mammalian RNA. *Nature communications*. 4:1798.

Galassi, A., K. Reynolds, and J. He. 2006. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *The American journal of medicine*. 119:812-819.

Gallouzi, I.E., and J.A. Steitz. 2001. Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science*. 294:1895-1901.

Gao, X., Y.H. Shin, M. Li ve diğ. 2010. The fat mass and obesity associated gene FTO functions in the brain to regulate postnatal growth in mice. *PloS one*. 5:e14005.

Gerken, T., C.A. Girard, Y.C. Tung ve diğ. 2007. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 318:1469-1472.

Guo, J., W. Ren, Y. Ding ve diğ. 2012. Fat mass and obesity associated gene (FTO) expression is regulated negatively by the transcription factor Foxa2. *PloS one*. 7:e51082.

Habelhah, H., K. Shah, L. Huang ve diğ. 2001. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nature cell biology*. 3:325-330.

Han, Z., N. Huang, T. Niu ve diğ. 2010. A loop matters for FTO substrate selection. *Protein & cell*. 1:616-620.

He, C. 2010. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nature chemical biology*. 6:863-865.

Jia, G., Y. Fu, and C. He. 2013. Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation. *Trends in genetics : TIG*. 29:108-115.

Jia, G., Y. Fu, X. Zhao ve diğ. 2011. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature chemical biology*. 7:885-887.

Lantz, K.A., M.Z. Vatamaniuk, J.E. Brestelli ve diğ. 2004. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *The Journal of clinical investigation*. 114:512-520.

Li, P., H.K. Tiwari, W.Y. Lin ve diğ. 2014. Genetic association analysis of 30 genes related to obesity in a European American population. *International journal of obesity*. 38:724-729.

Lin, L., C.M. Hales, K. Garber ve diğ. 2014. Fat mass and obesity-associated (FTO) protein interacts with CaMKII and modulates the activity of CREB signaling pathway. *Human molecular genetics*. 23:3299-3306.

- Liu, J., Y. Yue, D. Han ve diğ. 2014. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature chemical biology*. 10:93-95.
- Loos, R.J., and C. Bouchard. 2008. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 9:246-250.
- Loos, R.J., and G.S. Yeo. 2014. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. *Nature reviews. Endocrinology*. 10:51-61.
- Meyre, D., K. Proulx, H. Kawagoe-Takaki ve diğ. 2010. Prevalence of loss-of-function FTO mutations in lean and obese individuals. *Diabetes*. 59:311-318.
- Mourelatos, Z., L. Abel, J. Yong ve diğ. 2001. SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *The EMBO journal*. 20:5443-5452.
- Pandey, S.C. 2003. Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene. *Trends in pharmacological sciences*. 24:456-460.
- Peters, T., K. Ausmeier, and U. Ruther. 1999. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 10:983-986.
- Pischon, T., P.H. Lahmann, H. Boeing ve diğ. 2006. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Journal of the National Cancer Institute*. 98:920-931.
- Pitman, R.T., J.T. Fong, P. Billman ve diğ. 2012. Knockdown of the fat mass and obesity gene disrupts cellular energy balance in a cell-type specific manner. *PLoS one*. 7:e38444.
- Robbens, S., P. Rouze, J.M. Cock ve diğ. 2008. The FTO gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae. *Journal of molecular evolution*. 66:80-84.
- Sanchez-Pulido, L., and M.A. Andrade-Navarro. 2007. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC biochemistry*. 8:23.
- Scuteri, A., S. Sanna, W.M. Chen ve diğ. 2007. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS genetics*. 3:e115.
- Shen, L., C.X. Song, C. He, and Y. Zhang. 2014. Mechanism and function of oxidative reversal of DNA and RNA methylation. *Annual review of biochemistry*. 83:585-614.
- Stratigopoulos, G., S.L. Padilla, C.A. LeDuc ve diğ. 2008. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 294:R1185-1196.
- Tung, Y.C., and G.S. Yeo. 2011. From GWAS to biology: lessons from FTO. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1220:162-171.

van der Hoeven, F., T. Schimmang, A. Volkmann ve diğ. 1994. Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development*. 120:2601-2607.

Wolfrum, C., E. Asilmaz, E. Luca ve diğ. 2004. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*. 432:1027-1032.

Xu, K., T. Yen, and C.L. Geczy. 2001. Il-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8. *Journal of immunology*. 166:6358-6366.



## ÖZGEÇMİŞ

**1. Adı Soyadı:** Nil GÜZEL

**2. Doğum Yeri ve Tarihi:** HATAY/01.05.1988

**3. Uyruğu:** T.C.

**4. Medeni Durumu:** BEKAR

**5. Çalıştığı Kurum:** Deneysel ve Klinik Araştırmalar Birimi

**6. İletişim Adresi:** Dünya Bankası Evleri 1. Ada No 6/2 İzmit

**7. Telefon:** 05425272807

**8. Mail:** nil.nilguzel@gmail.com

### **9. Eğitimi:**

Lisans/İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji e Genetik Bölümü (2007-2011)

Yüksek Lisans/Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2014-...)

### **10. Mesleki Deneyim:**

2014-... Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans

2014-... Deneysel ve Klinik Araştırmalar Birimi

2011-2014 Gen ve Hücre Tedavi Uygulama ve Araştırma Merkezi Akdeniz Üniversitesi  
Yüksek Lisans

2010 Yaz Dönemi Tıbbi Biyoloji ABD Uludağ Üniversitesi (Stj)

2010 Yaz Dönemi Biyoloji İhtisas Dairesi İstanbul Adli Tıp Kurumu (Stj)

2009 Yaz Dönemi Moleküler Genetik Lab. Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma  
Hastanesi (Stj)

2009 Yaz Dönemi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) İstanbul Üniversitesi (Stj)

**11. Yabancı Dil:** İngilizce

## 12.Bilimsel Yayınlar

Ozgul, S., ve diğ. (2015). "Linking a compound-heterozygous Parkin mutant (Q311R and A371T) to Parkinson's disease by using proteomic and molecular approaches." Neurochem Int **85-86**: 1-13.



Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen ünvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır.).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazımın yönün dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan ünvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü müdürünün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin ve dip yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıraya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.



