

T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HİPOTALAMİK ARKUAT ÇEKİRDEKTE FAM163A  
PROTEİNİNİN ve MİTOKONDRIYAL AKTİVİTENİN  
BESLENME DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
FARELERDE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

CİHAN SÜLEYMAN ERDOĞAN, MSc.

İSTANBUL-2023

T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HİPOTALAMİK ARKUAT ÇEKİRDEKTE FAM163A  
PROTEİNİNİN ve MİTOKONDRIYAL AKTİVİTENİN  
BESLENME DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
FARELERDE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

CİHAN SÜLEYMAN ERDOĞAN, MSc

TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. BAYRAM YILMAZ

İSTANBUL-2023

## TEZ ONAYI FORMU

Enstitü : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program : Fizyoloji Doktora Programı  
Tez Başlığı : Hipotalamik Arkuat Çekirdekte FAM163A Proteininin ve Mitokondriyal Aktivitenin Beslenme Davranışı Üzerine Etkilerinin Farelerde Araştırılması  
Tez Sahibi : Cihan Süleyman Erdoğan  
Sınav Tarihi : 02/06/2023

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

|                | Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)                               |
|----------------|-----------------------------------------------------------|
| Jüri Başkanı:  | Prof. Dr. Bayram YILMAZ<br>(Yeditepe Üniversitesi)        |
| Tez danışmanı: | Prof. Dr. Bayram YILMAZ<br>(Yeditepe Üniversitesi)        |
| Üye:           | Prof. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL<br>(Yeditepe Üniversitesi)   |
| Üye:           | Prof. Dr. Selim KUTLU<br>(Necmettin Erbakan Üniversitesi) |
| Üye:           | Prof. Dr. Mehtap KAÇAR<br>(Yeditepe Üniversitesi)         |
| Üye:           | Prof. Dr. Süleyman SANDAL<br>(İnönü Üniversitesi)         |

### ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram Yılmaz

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **BEYAN**

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Cihan Süleyman Erdoğan



## İTHAF

Hiç unutmamak üzere hatırlamaya, unuttuğunu düşünüp daha fazla öğrenme ve gelişmeye,  
Mutluluk ve huzura,  
Bilgiye,  
Araştırmaktan vazgeçmemeye...

*EREN'e...*

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, doktora eğitimi süreci dışında da desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Bayram YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Eğitimci kişiliklerinin yanında, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Mehtap KAÇAR ve Prof. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL'a destekleri için çok teşekkür ederim.

İlk olarak, her anımda, her sıkıntıda ve mutluluğumda yanımda olan, ilk ofis arkadaşım, sırdaşım ve abim olan Dr. Volkan Adem BİLGİN olmak üzere, yalnızca çalışma arkadaşı olmayıp, yardımlarını asla esirgemeyen değerli insanlar Dr. Yavuz Yavuz, Ecz. Hüseyin Buğra ÖZGÜN ve Dr. Sami AĞUŞ'a en başta dostlukları için, tez süresince gösterdikleri destekler için teşekkür ederim. Aramıza yaklaşık iki sene önce katılan dostum ve kardeşim Yunus KOSİF'e ve birlikte çalışmaktan son derece mutlu olduğum Ar. Gör. Deniz Öykü ÖZEN, Meltem YALÇIN, Uğur KALKAN, Özge BAŞER, Zehra Yağmur EROL, Dr. Tuvana US ve Habibe GÖREN'e arkadaşlıklarından ve desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Geçirdiğim sürece dostluğunu ve desteğini her an hissettiğim ve bir abla olan Prof. Aylin YABA UÇAR ve beraber çalışmaktan ve vakit geçirmekten son derece keyif aldığım Dr. Tuğçe ÖNEL ve Dr. Ecem YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Değerli arkadaşlarım, hep yanımda olan ve bana abla/abi/kardeş olan Dr. Erdem SÖZTUTAR, Doç. Dr. Alev CUMBUL Prof. Soner DOĞAN, Dr. Vet. Engin SÜMER ve tüm YÜDETAM ekibine, benim için bir kardeşten farksız olan Yasin DELİBAŞ'a ve ayrıca enstitü sekreterimiz Hasan KOÇ'a ve ekibine teşekkür ederim.

“Jeg vil gerne udtrykke min dybeste tak til Ole Vang og Vibeke Vang, som altid har været der for mig og behandlet mig som familie.”

Üzerimde emekleri çok olan sayın Prof. Dr. Selim KUTLU, Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU, Prof. Dr. Süleyman Sandal, Prof. Arzu KARABAY KORKMAZ katkıları için teşekkür ederim. Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'ndeki tüm hocalarım, meslektaşlarım ve arkadaşlarıma da ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen başta annem Fazıla ERDOĞAN, kardeşim Turan ERDOĞAN, babam Ali Haydar ERDOĞAN tüm aimleme...

Cihan Süleyman Erdoğan

## İÇİNDEKİLER

|                                                                            |       |
|----------------------------------------------------------------------------|-------|
| TEZ ONAYI FORMU .....                                                      | ii    |
| BEYAN.....                                                                 | iii   |
| İTHAF.....                                                                 | iv    |
| TEŞEKKÜR.....                                                              | v     |
| İÇİNDEKİLER .....                                                          | vi    |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                      | ix    |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                     | x     |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                                      | xiii  |
| ABSTRACT.....                                                              | xviii |
| ÖZET .....                                                                 | xix   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                      | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                    | 2     |
| 2.1. Hipotalamus .....                                                     | 2     |
| 2.1.1. Hipotalamusun Anatomik Yapısı ve Bağlantıları.....                  | 2     |
| 2.1.2. Hipotalamik Fonksiyonlar .....                                      | 3     |
| 2.2. Enerji Homeostazı ve Besin Alımının Düzenlenmesinde Hipotalamus ..... | 3     |
| 2.2.1. Besin Alımının Hormonal Kontrolü .....                              | 4     |
| 2.2.2. Arkuat Çekirdek NPY/AgRP Nöronları .....                            | 7     |
| 2.3. Mitokondri.....                                                       | 9     |
| 2.3.1. Mitokondri ve Enerji Üretimi .....                                  | 9     |
| 2.3.2. Mitokondrinin Enerji Üretimi Dışındaki Rollerı .....                | 11    |
| 2.3.3. Mitokondriyal Dinamikler .....                                      | 20    |
| 2.4. Rotenon .....                                                         | 25    |
| 2.5. FAM163A .....                                                         | 25    |
| 2.6. Hipotalamik Mitokondriyal Dinamikler, Besin Alımı ve FAM163A.....     | 27    |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                    | 29    |

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Kullanılan Deney Hayvanları, Transgenik Hayvan Üretim Stratejisi ve Genotipleme .....                                         | 29 |
| 3.2. Stereotaktik Cerrahi ve İntrakraniyal Enjeksiyonlar .....                                                                     | 30 |
| 3.2.1. Yabanıl Tip Hayvanların Enjeksiyonları .....                                                                                | 31 |
| 3.2.2. Transgenik Hayvanların Enjeksiyonları .....                                                                                 | 31 |
| 3.3. Besin Tüketimi ve Vücut Ağırlığı Takibi .....                                                                                 | 32 |
| 3.4. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması ve Elektrofizyolojik Kayıtlar .....                                                           | 32 |
| 3.5. Davranış Testleri .....                                                                                                       | 33 |
| 3.5.1. Açık Alan Testi .....                                                                                                       | 33 |
| 3.5.2. Yükseltilmiş Artı Labirenti Testi .....                                                                                     | 33 |
| 3.6. Kan Glukoz ve Serum İnsülin Seviyelerinin Belirlenmesi .....                                                                  | 34 |
| 3.7. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) .....                                           | 34 |
| 3.7.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi .....                                                                                        | 34 |
| 3.7.2. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) .....                                                                         | 35 |
| 3.8. Konfokal Mikroskopi .....                                                                                                     | 38 |
| 3.9. İstatistiksel Analiz .....                                                                                                    | 39 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                                                  | 40 |
| 4.1. <i>Fam163a</i> 'nın Sessizleştirilmesinin Etkileri .....                                                                      | 40 |
| 4.1.1. Yabanıl Tip Hayvanlarda Besin Tüketimi ve Vücut Ağırlığı .....                                                              | 40 |
| 4.1.2. Yabanıl Tip Hayvanlarda Lokomotor Aktivite ve Anksiyete Benzeri Davranışlar .....                                           | 41 |
| 4.1.3. Yabanıl Tip Hayvanlarda Kan Glukoz ve Serum İnsülin Seviyeleri .....                                                        | 42 |
| 4.1.4. Yabanıl Tip Hayvanlarda Mitokondriyal Kalite Kontrol ve Mitokondriyal Dinamikler ile İlişkili Transkriptlerin İfadesi ..... | 43 |
| 4.1.5. Konfokal Mikroskopi .....                                                                                                   | 46 |
| 4.1.6. Transgenik Hayvanlarda AgRP Nöron Aktivitesi .....                                                                          | 51 |
| 4.2. Rotenon Uygulamasının Etkileri .....                                                                                          | 52 |

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.1. Yabanıl Tip Hayvanlarda Besin Tüketimi ve Vücut Ağırlığı .....                                                                               | 52  |
| 4.2.2. Yabanıl Tip Hayvanlarda Lokomotor Aktivite ve Anksiyete Benzeri Davranışlar .....                                                            | 53  |
| 4.2.3. Yabanıl Tip Hayvanlarda Kan Glukoz ve Serum İnsülin Seviyeleri.....                                                                          | 55  |
| 4.2.4. Yabanıl Tip Hayvanlarda <i>Fam163a</i> , Mitokondriyal Kalite Kontrol ve Mitokondriyal Dinamikler ile İlişkili Transkriptlerin İfadesi ..... | 55  |
| 4.2.5. Konfokal Mikroskopi .....                                                                                                                    | 58  |
| 4.2.6. Transgenik Hayvanlarda AgRP Nöron Aktivitesi .....                                                                                           | 61  |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                                                                          | 63  |
| 6. KAYNAKLAR .....                                                                                                                                  | 68  |
| 7. EKLER.....                                                                                                                                       | 109 |
| 7.1. ETİK KURUL KARARI.....                                                                                                                         | 109 |
| 7.2. ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                                 | 111 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Genotiplenmede kullanılan primer dizileri .....                                                                             | 29 |
| <b>Tablo 2.</b> PCR döngüleri.....                                                                                                          | 30 |
| <b>Tablo 3.</b> Bir reaksiyon tüpü için (10 µL) qPCR reaksiyon içeriği .....                                                                | 35 |
| <b>Tablo 4.</b> qPCR deneylerinde kullanılan primerlerin dizileri.....                                                                      | 36 |
| <b>Tablo 5.</b> <i>Fam163a</i> , <i>Pgc1-α</i> , <i>Pgc1-β</i> , <i>Tfam</i> , <i>Ucp2</i> , <i>Nrf2</i> ve <i>ERRα</i> için qPCR döngüleri | 37 |
| <b>Tablo 6.</b> <i>LC3</i> , <i>P62</i> , <i>Parkin</i> , <i>Keap1</i> ve <i>HO-1</i> için qPCR döngüleri.....                              | 37 |
| <b>Tablo 7.</b> <i>Pink1</i> , <i>Mfn1</i> ve <i>Mfn2</i> için qPCR döngüleri.....                                                          | 37 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Hipotalamik çekirdeklerin sagittal kesitte şematik gösterimi (Pop vd., 2018'den düzenlenmiştir) <sup>21</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 3  |
| <b>Şekil 2.</b> Besin alımı hipotalamus tarafından homeostatik olarak düzenlenirken haz hissi ve lezzet gibi uyarılara cevap olarak hedonik olarak düzenlenir (Minokoshi 2020'den düzenlenmiştir) <sup>73</sup> .....                                                                                                                                                                | 4  |
| <b>Şekil 3.</b> ARC'de enerji homeostazının düzenleyen nöronal yollar ve hormonlar. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 7  |
| <b>Şekil 4.</b> ARC <sup>NPY/AgRP</sup> nöronlarından köken alan projeksiyonların şematik gösterimi <sup>176</sup> . 9                                                                                                                                                                                                                                                               | 9  |
| <b>Şekil 5.</b> <i>Homo sapiens</i> ve <i>Mus musculus</i> NDSP (FAM163A; Cebelin) protein dizilerinin benzerliği, Clustal O çoklu dizi hizalama biyoinformatik aracıyla <sup>423</sup> gösterilmiştir. “*”, “:” ve “.” sırasıyla, tamamen korunan rezidüleri, yüksek miktarda benzer özellik taşıyan rezidüleri ve düşük miktarda benzerlik taşıyan rezidüleri belirtmektedir. .... | 26 |
| <b>Şekil 6.</b> Kontrol grubuna kıyasla <i>Fam163a</i> ifadesi (her grupta n=4 hayvan). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 40 |
| <b>Şekil 7.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların (A) vücut ağırlıkları, (B) günlük besin tüketimleri, (C) 25 günlük kümülatif besin tüketimleri ve (D) 10 günlük kümülatif besin tüketimleri (*p<0,05 ve **p<0,01; n.s.: anlamlı değil). ....                                                                                                                    | 41 |
| <b>Şekil 8.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların açık alan testinde (A) toplam katettikleri mesafe, (B) ortalama hız ve (C) merkezde geçirdikleri süre.....                                                                                                                                                                                                      | 41 |
| <b>Şekil 9.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların yükseltilmiş artı labirent testinde (A) kapalı kola giriş sayıları, (B) kapalı kolda geçirdikleri süre, (C) açık kola giriş sayıları, (D) açık kolda geçirdikleri süre (E) toplam katettikleri mesafe ve (F) ortalama hızları. ....                                                                             | 42 |
| <b>Şekil 10.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların (A) kan glukoz ve (B) serum insülin seviyeleri. ....                                                                                                                                                                                                                                                           | 43 |
| <b>Şekil 11.</b> <i>Fam163a</i> sessizleştirmesinin mitofaji ile ilişkili transkriptlere etkisi. (A) <i>LC3</i> , (B) <i>P62</i> , (C) <i>Pink1</i> ve (D) <i>Parkin</i> seviyeleri (*p<0,05 ve **p<0,01). ....                                                                                                                                                                      | 43 |
| <b>Şekil 12.</b> <i>Fam163a</i> sessizleştirmesinin mitokondriyal biyogenez, füzyon ve oksidatif stres ile ilişkili transkriptlere etkisi. (A) <i>Pgc-1α</i> (B) <i>Pgc-1β</i> , (C) <i>Tfam</i> , (D) <i>Nrf1</i> , (E) <i>Errα</i> , (F) <i>Ucp2</i> , (G), <i>Mfn1</i> , (H) <i>Mfn2</i> , (I) <i>Keap1</i> ve (J) <i>HO-1</i> seviyeleri (*p<0,05).....                          | 45 |
| <b>Şekil 13.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu yabanıl tip hayvanlarda FAM163A ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) <i>Fam163a</i> KD grubu                                                                                                                                                                                                             |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| hayvanların ARC'de FAM163A ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül).....                                                                                                                                                                                                                           | 46 |
| <b>Şekil 14.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu yabancı tip hayvanlarda ATP5H ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların ARC'de ATP5H ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). .....                                                    | 47 |
| <b>Şekil 15.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu yabancı tip hayvanlarda PGC-1α ifadesi. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların ARC'de PGC-1α ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). .....                                                                   | 48 |
| <b>Şekil 16.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu yabancı tip hayvanlarda AgRP ifadesi. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların ARC'de AgRP ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). .....                                                                       | 49 |
| <b>Şekil 17.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu yabancı tip hayvanlarda POMC ifadesi. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların ARC'de POMC ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). .....                                                                       | 50 |
| <b>Şekil 18.</b> Kontrol shRNA ve <i>Fam163a</i> KD grubu transgenik hayvanlarda FAM163A ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) Kontrol shRNA ve (D ve E) <i>Fam163a</i> KD grubu hayvanların ARC'de FAM163A ifadesi (Ok başları: AgRP nöronlarındaki FAM163A ifadesi. Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C ve E) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). ..... | 51 |
| <b>Şekil 19.</b> <i>Fam163a</i> sessizleştirmesinin AgRP nöronlarının ateşleme frekansına etkisi. (A) Temsili elektrofizyolojik kayıt görüntüsü. (B) Temsili elektrofizyolojik aktivite trasesi. (C) AgRP nöronlarının ateşleme frekansı (*p<0,05). .....                                                                          | 52 |
| <b>Şekil 20.</b> DMSO ve Rotenon grubu hayvanların (A) vücut ağırlıkları, (B) günlük besin tüketimleri, (C) 25 günlük kümülatif besin tüketimleri ve (D) 10 günlük kümülatif besin tüketimleri. ....                                                                                                                               | 53 |
| <b>Şekil 21.</b> DMSO ve Rotenon grubu hayvanların açık alan testinde (A) toplam katettikleri mesafe, (B) ortalama hız ve (C) merkezde geçirdikleri süre (*p<0,05). .....                                                                                                                                                          | 53 |
| <b>Şekil 22.</b> DMSO ve Rotenon grubu hayvanların yükseltilmiş artı labirent testinde (A) açık kola giriş sayıları, (B) açık kolda geçirdikleri süre, (C) kapalı kola giriş sayıları, (D) kapalı kolda geçirdikleri süre (E) toplam katettikleri mesafe ve (F) ortalama hızları. ....                                             | 54 |
| <b>Şekil 23.</b> DMSO ve Rotenon grubu hayvanların (A) kan glukoz ve (B) serum insülin seviyeleri. ....                                                                                                                                                                                                                            | 55 |
| <b>Şekil 24.</b> Rotenon uygulamasının <i>Fam163a</i> ifadesine olan etkisi. ....                                                                                                                                                                                                                                                  | 55 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 25.</b> Rotenon uygulamasının mitofaji ile ilişkili transkriptlere etkisi. (A) <i>LC3</i> , (B) <i>P62</i> , (C) <i>Pink1</i> ve (D) <i>Parkin</i> seviyelerine etkisi (*p<0,05).....                                                                                                                                                 | 56 |
| <b>Şekil 26.</b> Rotenon uygulamasının mitokondriyal biyogenez, füzyon ve oksidatif stres ile ilişkili transkriptlere etkisi. (A) <i>Pgc-1α</i> (B) <i>Pgc-1β</i> , (C) <i>Tfam</i> , (D) <i>Nrf1</i> , (E) <i>Erra</i> , (F) <i>Ucp2</i> , (G), <i>Mfn1</i> , (H) <i>Mfn2</i> , (I) <i>Keap1</i> ve (J) <i>HO-1</i> seviyeleri (*p<0,05)..... | 57 |
| <b>Şekil 27.</b> DMSO ve rotenon grubu yabancı tip hayvanlarda FAM163A ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) DMSO ve (D-F) Rotenon grubu hayvanların ARC'de FAM163A ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). ....                                                                                                   | 58 |
| <b>Şekil 28.</b> DMSO ve rotenon grubu yabancı tip hayvanlarda AgRP ve ATP5H ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) DMSO ve (D-F) Rotenon grubu hayvanların ARC'de AgRP ve ATP5H ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). ....                                                                                       | 59 |
| <b>Şekil 29.</b> DMSO ve rotenon grubu yabancı tip hayvanlarda PGC-1α ifadesi. (A-C) DMSO ve (D-F) Rotenon grubu hayvanların ARC'de PGC-1α ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). ....                                                                                                                      | 60 |
| <b>Şekil 30.</b> DMSO ve rotenon grubu yabancı tip hayvanlarda POMC ifadesi. (A-C) DMSO ve (D-F) Rotenon grubu hayvanların ARC'de POMC ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül). ....                                                                                                                          | 61 |
| <b>Şekil 31.</b> Rotenon uygulamasının AgRP nöronlarının ateşleme frekansına etkisi. (A) Temsili elektrofizyolojik kayıt görüntüsü. (B) Temsili elektrofizyolojik aktivite trasesi. (C) AgRP nöronlarının ateşleme frekansı (**p<0,01).....                                                                                                    | 62 |

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

|                   |                                                          |
|-------------------|----------------------------------------------------------|
| 3V                | 3. ventrikül                                             |
| aCSF              | Yapay beyin-omurilik sıvısı                              |
| ADP               | Adenozin Difosfat                                        |
| AgRP              | Aguti-ilişkili protein                                   |
| AHN               | Anterior hipotalamik çekirdek                            |
| AIF               | Apoptozu indükleyen faktör                               |
| AMP               | Adenozin monofosfat                                      |
| AMPK              | AMP ile aktive olan protein kinaz                        |
| ARC               | Hipotalamusun arkuat çekirdeği                           |
| ARE               | Antioksidan yanıt elementi                               |
| ATP               | Adenozin Trifosfat                                       |
| BNIP3             | BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa protein etkileşimli protein 3 |
| BNST              | Stria terminalis                                         |
| CCK               | Kolesistokinin                                           |
| cDNA              | Komplementer DNA                                         |
| CRH               | Kortikotropin salıcı hormon                              |
| DAMP              | Hasarla ilişkili moleküler örüntü                        |
| DMH               | Dorsomedial hipotalamus                                  |
| DMSO              | Dimetil sülfoksit                                        |
| Drp1              | Dinaminle ilişkili protein 1                             |
| ER                | Endoplazmik retikulum                                    |
| ERK               | Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz                     |
| ERR               | Östrojenle ilişkili reseptör                             |
| ETZ               | Elektron taşıma zinciri                                  |
| FADH <sub>2</sub> | Flavin adenin dinükleotid                                |

|        |                                          |
|--------|------------------------------------------|
| FUNDC1 | FUN14 alan içeren 1                      |
| GFP    | Yeşil floresan proteini                  |
| GHSR   | Büyüme hormonu sekretogog reseptörü      |
| GLP-1  | Glukagon benzeri peptit-1                |
| GTPaz  | Guanozin trifosfataz                     |
| HIF    | Hipoksi ile indüklenebilir faktör        |
| HO-1   | Hem oksijenaz-1                          |
| ICV    | Intraserebroventriküler                  |
| IL     | İnterlökin                               |
| IP3R   | İnositol 1,4,5-trisfosfat reseptörleri   |
| IR     | İnsülin reseptörü                        |
| IκB    | İnhibitör kappa B                        |
| KBB    | Kan beyin bariyeri                       |
| kDa    | Kilodalton                               |
| KEAP-1 | Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 |
| LHA    | Lateral hipotalamik alan                 |
| LIR    | LC3 etkileşimli bölge                    |
| LS     | Lateral septal çekirdek                  |
| MAPK   | Mitojen ile aktive olan protein kinaz    |
| MAVS   | Mitokondriyal antiviral sinyal proteini  |
| MC3R   | Melanokortin 3 reseptörü                 |
| MC4R   | Melanokortin 3 reseptörü                 |
| ME     | Median eminens                           |
| Mfn1   | Mitofusin 1                              |
| Mfn2   | Mitofusin 2                              |
| MKU    | Mitokondriyal kalsiyum uniporter         |

|                  |                                                                                         |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| MLKL             | Karışık soy kinaz alanı benzeri proteinin                                               |
| MOMP             | Mitokondriyal dış zar geçirgenliği                                                      |
| MPA              | Medial preoptik alan                                                                    |
| MPN              | Medial preoptik çekirdek                                                                |
| mPTP             | Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneği                                                |
| MSS              | Merkezi sinir sistemi                                                                   |
| mtDNA            | Mitokondriyal DNA                                                                       |
| mTOR             | Rapamisinin mekanik hedefi                                                              |
| mtRNA            | Mitokondriyal RNA                                                                       |
| NAD <sup>+</sup> | Nikotinamid adenin dinükleotit                                                          |
| NADH             | Nikotinamid-adenin-dinükleotid                                                          |
| NDSP             | Nöroblastoma-kaynaklı salgı proteini                                                    |
| NF-κB            | Nükleer faktör kappa B                                                                  |
| NGF-β            | Sinir büyüme faktörü-beta                                                               |
| NLRP             | Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı, lösin açısından zengin tekrar içeren protein |
| NPY              | Nörpopeptit Y                                                                           |
| NRF1             | Nükleer solunum faktörü 1                                                               |
| NRF2             | Nükleer solunum faktörü 2                                                               |
| NRF2             | Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2                                         |
| NTS              | Nükleus traktus solitarius                                                              |
| OPA1             | Dinaminle ilişkili GTPaz optik atrofi 1                                                 |
| OXM              | Oksintomodulin                                                                          |
| OXPHOS           | Oksidatif fosforilasyon                                                                 |
| P90RSK           | 90 kilodalton ribozomal protein S6 kinaz                                                |
| PAG              | Periaqueductal gray                                                                     |

|                     |                                                                                  |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| PAMP                | Patojenle ilişkili moleküler örüntü                                              |
| PBN                 | Parabrakiyal çekirdek                                                            |
| PBS                 | Fosfat tamponlu salin                                                            |
| PDH                 | Pirüvat dehidrojenazı                                                            |
| PDK1                | Pirüvat dehidrojenaz kinaz 1                                                     |
| PFA                 | Paraformaldehit                                                                  |
| PGC-1 $\alpha$      | Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatörü 1- $\alpha$ |
| PI3K                | Fosfatidilinositol 3-kinaz                                                       |
| PINK1               | PTEN ile indüklenen kinaz 1                                                      |
| PN                  | Paranigral çekirdek                                                              |
| POMC                | Proopiomelanokortin                                                              |
| PON                 | Preoptik çekirdek                                                                |
| PTEN                | Fosfataz ve tensin homologu                                                      |
| PVH                 | Paraventriküler hipotalamus                                                      |
| PVN                 | Paraventriküler çekirdek                                                         |
| PVT                 | Talamik paraventriküler çekirdek                                                 |
| PYY <sub>3-36</sub> | Peptit YY                                                                        |
| PZR                 | Polimeraz zincir reaksiyonu                                                      |
| RIPK1               | Reseptörle etkileşime giren protein kinaz 1                                      |
| RLR                 | RIG-I benzeri reseptör                                                           |
| RNA                 | Ribonükleik asit                                                                 |
| ROS                 | Reaktif oksijen türevleri                                                        |
| SCN                 | Suprakiazmatik çekirdek                                                          |
| SON                 | Supraoptik çekirdek                                                              |
| T3                  | Triiyodotironin                                                                  |

|                   |                                          |
|-------------------|------------------------------------------|
| TFAM              | Transkripsiyon faktörü A                 |
| TKA               | trikarboksilik asit                      |
| TRH               | Tirotropin salgılatıcı hormon            |
| UPR <sup>mt</sup> | Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı |
| VTA               | Ventral tegmental alan                   |
| $\alpha$ -MSH     | $\alpha$ -melanosit uyarıcı hormon       |
| $\Delta\psi_m$    | Mitokondriyal membran potansiyeli        |



## ABSTRACT

**Erdoğan, Cihan Süleyman. (2023) Investigation of the Effects of FAM163A Protein and Mitochondrial Activity in the Arcuate Nucleus of Hypothalamus on Food Intake in Mice, Yeditepe University, Institute of Health Sciences, Department of Physiology, PhD thesis, İstanbul.**

Mitochondrial function has important roles in neuronal activity and plays a role in the regulation of the activities of agouti-related protein (AgRP) and proopiomelanocortin (POMC) neurons located in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus that regulates food intake. FAM163A is a recently discovered protein, its function and intracellular localization are not clear. The aim of our study is to examine the effect of *Fam163a* knockdown and mitochondrial dysfunction on AgRP neuron activity and mitochondrial activity in ARC. While *Fam163a* silencing increased cumulative food consumption in the short term, it did not effect on cumulative food consumption in the long term. *Fam163a* knockdown in ARC did not change the locomotor activity and anxiety-like behavior, while rotenone administration significantly increased the time spent in the center in the open field test ( $p<0.05$ ). *Fam163a* silencing and rotenone administration significantly decreased AgRP activity ( $p<0.05$ ). Blood glucose and serum insulin levels were not affected by rotenone administration and *Fam163a* silencing. *Fam163a* silencing dysregulated the expression of genes associated with mitophagy, mitochondrial health, and mitochondrial fusion ( $p<0.05$ ). Similarly, rotenone administration significantly altered the expression of mitochondria-associated transcripts in ARC. The results of our study suggest that FAM163A has roles in hypothalamic mitochondrial activity and the regulation of mitochondria-related genes.

**Key words:** AgRP, FAM163A, Hypothalamus, Mitochondria, Rotenone.

## ÖZET

**Erdoğan, Cihan Süleyman. (2023). Hipotalamik Arkuat Çekirdekte FAM163A Proteininin ve Mitokondriyal Aktivitenin Beslenme Davranışı Üzerine Etkilerinin Farelerde Araştırılması, Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul.**

Mitokondriyal fonksiyonun nöronal aktivitede önemli rollere sahip olup hipotalamusun arkuat çekirdeğinde (ARC) bulunan ve beslenme davranışını düzenleyen aguti-ilişkili protein (AgRP) ve proopiomelanokortin (POMC) nöronlarının aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. FAM163A yakın dönemde keşfedilen bir protein olmakla birlikte fonksiyonu ve hücre içindeki lokalizasyonu net değildir. Çalışmamızın amacı ARC’de *Fam163a* sessizleştirilmesinin ve mitokondriyal disfonksiyonun AgRP nöron aktivitesi ve mitokondriyal aktiviteye olan etkisini incelemektir. *Fam163a* sessizleştirilmesi, kısa dönemde kümülatif besin tüketimini arttırırken uzun dönemde kümülatif besin tüketimine etkisi olmamıştır. ARC’de *Fam163a*’nın sessizleştirilmesi lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışta anlamlı bir değişikliğe sebep olmazken, rotenon uygulaması açık alan testinde merkezde geçirilen süreyi anlamlı şekilde arttırmıştır ( $p<0,05$ ). ARC’de *Fam163a* sessizleştirilmesi ve rotenon uygulaması AgRP aktivitesini anlamlı şekilde düşürmüştür ( $p<0,05$ ). Kan glukoz ve serum insülin seviyeleri rotenon uygulaması ve *Fam163a* sessizleştirilmesinden etkilenmemiştir. *Fam163a* sessizleştirilmesi mitofaji, mitokondriyal sağlık ve mitokondriyal füzyon ilişkili genlerin ifadelerinde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). Benzer şekilde rotenon uygulaması da ARC’de mitokondri ilişkili transkriptlerin ifadesinde değişime sebep olmuştur. Çalışmamızın sonuçları FAM163A’nın hipotalamik mitokondriyal aktivitede ve mitokondriyal genlerin düzenlenmesinde rolleri olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** AgRP, FAM163A, Hipotalamus, Mitokondri, Rotenon.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipotalamus, enerji alımı ve harcanımı gibi otonom fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan nöronları barındıran çekirdekleri içermektedir <sup>1-4</sup>. Mitokondriyal aktivite enerji metabolizmasında en önemli organellerden olup hücrelerin ihtiyacı olan adenosin trifosfat'ın (ATP) büyük kısmı mitokondride üretilmektedir <sup>5</sup>. Yapılan çalışmalarda mitokondriyal fonksiyonun nöronal aktivitede önemli olduğu belirtilmiş <sup>6,7</sup> ve hipotalamusun arkuat çekirdeğinde (ARC) bulunan ve beslenme davranışını düzenleyen aguti-ilişkili protein (AgRP) ve proopiomelanokortin (POMC) nöronlarının aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir <sup>8,9</sup>.

FAM163A nispeten yeni keşfedilen bir protein olmakla birlikte <sup>10,11</sup> fonksiyonu ve hücre içindeki lokalizasyonu tam olarak bilinmemektedir <sup>10-17</sup>. SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında mitokondri proteomunda bulunması <sup>17</sup> beyinde mitokondriyal aktivite üzerinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte FAM163A'nın hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) / 90 kilodalton (kDa) ribozomal protein S6 kinaz (P90RSK) yolağını aktive ettiği <sup>17</sup>, artmış ERK aktivitesinin nöronlarda mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğu <sup>18</sup> ve ERK inhibisyonunun nöronal mitokondri hasarını azalttığı bildirilmiştir <sup>19</sup>. Bu bilgiler ışığında, FAM163A tarafından düzenlenen ERK aktivitesinin hipotalamik nöronlarda mitokondriyal aktivite değişikliğine sebep olarak nöronal aktivitede değişime ve yeme davranışında farklılığa sebep olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı FAM163A proteininin hipotalamustaki rolünü, yeme davranışı üzerindeki etkilerini, ARC nöronlarındaki mitokondriyal aktiviteyi ve AgRP nöron aktivitesini davranışsal, moleküler ve elektrofizyolojik yöntemlerle araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

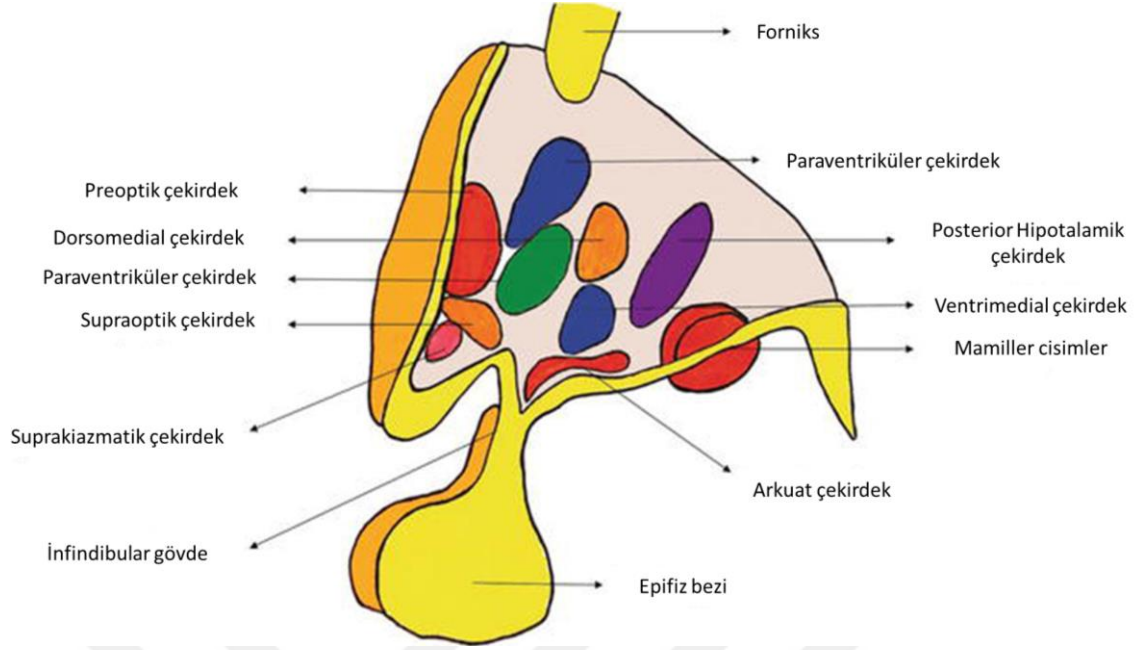
### 2.1. Hipotalamus

Hipotalamus, beynin tabanında, hipofiz bezinin yakınında bulunan küçük bir bölgedir <sup>20</sup> ve sinir sistemi ve endokrin sistem arasındaki bağlantıyı düzenleyen bir komuta merkezi olarak kabul edilmektedir <sup>21</sup>. Beynin farklı bölgelerinden alınan sinyaller sonucunda hipotalamustan salgılanan salıverici ve inhibe edici hormonlar hipofize etki eder ve bunun sonucunda adrenal bez <sup>22</sup>, tiroid bezi <sup>23</sup>, gonadlar <sup>24</sup> ve meme bezlerinin <sup>25</sup> aktivitelerini düzenleyerek büyüme, sıvı homeostazı, seksüel gelişim ve laktasyonun düzenlenmesinde rol alır <sup>26</sup>. Endokrin fonksiyonların düzenlenmesinin yanında termal homeostaz <sup>27</sup>, otonom sinir sistemi kontrolü <sup>28,29</sup>, enerji homeostazı <sup>30,31</sup> ve iştah düzenlenmesi <sup>31</sup> ise hipotalamusun endokrin olmayan fonksiyonlarını içermektedir.

#### 2.1.1. Hipotalamusun Anatomik Yapısı ve Bağlantıları

Hipotalamus, fornixin anterior boynuzları tarafından lateral, medial ve paraventriküler bölge ve infundibulumdan geçen koronal düzlemde anterior ve posterior alanlara bölünmektedir <sup>21</sup>. Anterior bölge optik kiazma üzerinde yer aldığı için prekiazmatik alan olarak da adlandırılırken, posterior alan ise mamiller bölge olarak da adlandırılmaktadır <sup>21</sup>. Infundibular alan ise anterior ve posterior alanlar arasında bulunmaktadır <sup>21</sup>.

Hipotalamusun anterior bölgesi optik kiazma üzerinde bulunur ve bu alanda supraoptik (SON), preoptik (PON), medial preoptik (MPN), suprakiazmatik (SCN), anterior hipotalamik (AHN) ve paraventriküler çekirdekler (PVN) bulunur (Şekil 1) <sup>21</sup>. Hipotalamusun orta bölgesi, tuberal bölge, tuber cinereumun üzerinde bulunur ve anterior ve lateral olmak üzere ikiye ayrılır <sup>21</sup>. Tuberal alanda dorsomedial, ventromedial, paraventriküler, supraoptik ve ARC bulunmaktadır (Şekil 1) <sup>21</sup>. Posterior hipotalamus ise medial ve lateral bölgelerden oluşup mamiller, posterior hipotalmik, supramamiller ve tuberomamiller çekirdekleri içermektedir <sup>21</sup>.



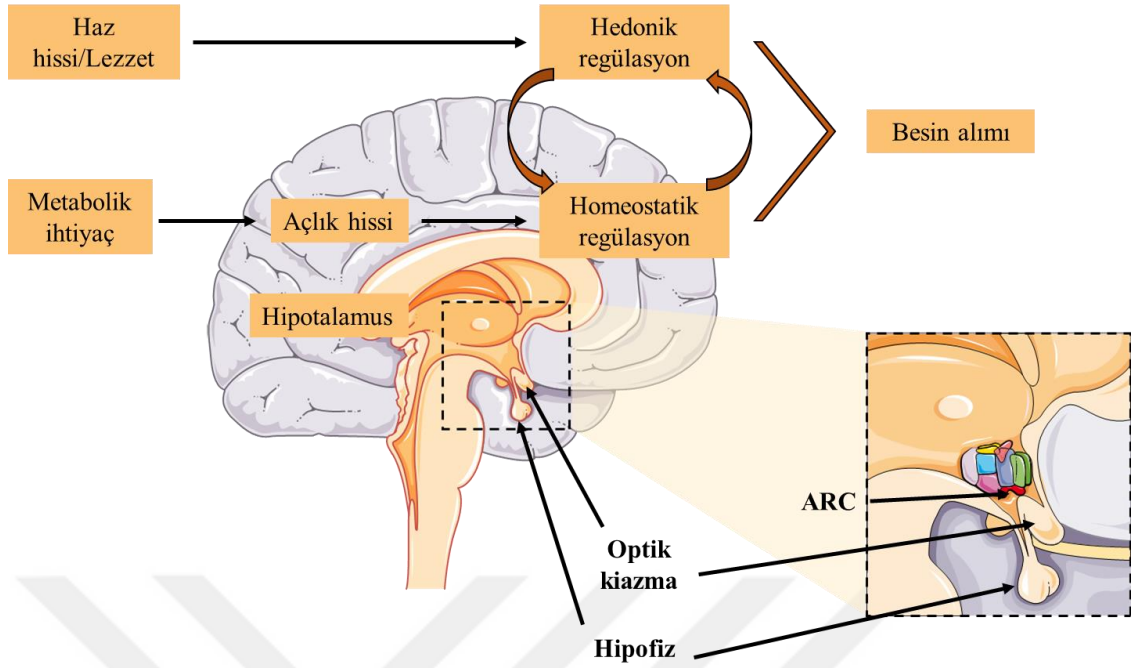
**Şekil 1.** Hipotalamik çekirdeklerin sagittal kesitte şematik gösterimi (Pop vd., 2018'den düzenlenmiştir) <sup>21</sup>.

### 2.1.2. Hipotalamik Fonksiyonlar

Hipotalamus, homeostazın düzenlenmesinde önemli rollere ve endokrin sistem, metabolizma, stres kontrolü üzerinde önemli görevlere sahiptir. Bunun yanında hipotalamus orta beyin <sup>32</sup>, serebellum <sup>33</sup>, beyin sapı <sup>34</sup>, talamus <sup>35</sup>, amigdala <sup>36,37</sup>, hipokampüsün farklı bölgeleri <sup>38,39</sup>, olfaktör soğan <sup>40</sup>, retina <sup>41,42</sup>, korteks <sup>43,44</sup> ve omurilik <sup>45,46</sup> ile çeşitli bağlantılara sahiptir <sup>21,26</sup>. Bu bağlantılarla birlikte hipotalamik çekirdekler çeşitli efektörler aracılığıyla (otonom sistem veya nöropeptitler) sıvı homeostazı <sup>47-49</sup>, maternal davranış <sup>50</sup>, cinsel davranış <sup>51</sup>, sosyal davranış <sup>52-54</sup>, otonom <sup>55,56</sup>, noisepsiyon <sup>57</sup>, besin alımı <sup>58-66</sup>, termoregülasyon <sup>27</sup>, cinsel gelişim <sup>67-70</sup> ve sirkadyen ritmin <sup>71</sup> düzenlenmesinde rol almaktadır.

### 2.2. Enerji Homeostazı ve Besin Alımının Düzenlenmesinde Hipotalamus

Besin alımı vücudun enerji homeostazının sağlanmasındaki en önemli davranışlardan biri olmakla birlikte besin alımının düzenlenmesi genel olarak homeostatik ve homeostatik olmayan (hedonik) olarak ikiye ayrılan mekanizmalar tarafından gerçekleştirilir <sup>72</sup>. Homeostatik besin alımı temel metabolik süreçlerin sürdürülmesi ve hayatta kalma için gerekliyken, hedonik besin alımı, fiziksel bir açlık durumu olmaksızın haz amaçlı besin alımı durumudur ancak bu ayrıma karşın her iki mekanizma, fonksiyonel ve anatomik olarak çakışmaktadır (Şekil 2) <sup>72</sup>.



**Şekil 2.** Besin alımı hipotalamus tarafından homeostatik olarak düzenlenirken haz hissi ve lezzet gibi uyarılara cevap olarak hedonik olarak düzenlenir (Minokoshi 2020'den düzenlenmiştir) <sup>73</sup>.

Enerji homeostazı, özellikle ARC'de bulunan karmaşık nöral bağlantılar tarafından düzenlenmektedir <sup>74</sup>. ARC'de bulunan ve nöropopeptit Y (NPY) ve AgRP peptitlerini birlikte eksprese eden nöronlar ve POMC eksprese eden nöronların hem besin alımını hem de enerji homeostazının takibinde rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir <sup>75</sup>. NPY/AgRP nöronları, bu iki peptit dışında inhibitör etkili  $\gamma$ -aminobütirik asit (GABA) salgılar ve besin alımını indükler <sup>60,76,77</sup>. Oreksijenik AgRP aynı zamanda, POMC'den derive bir hormon olan  $\alpha$ -melanosit uyarıcı hormon ( $\alpha$ -MSH) reseptörleri olan melanokortin 3 reseptörü (MC3R) ve melanokortin 4 reseptörüne (MC4R) bağlanan endojen bir antagonisttir <sup>78-80</sup>. POMC nöronlarından salgılanan  $\alpha$ -MSH ise MC4R ve MC3R'yi aktive ederek besin alımını baskılar <sup>75</sup>.

### 2.2.1. Besin Alımının Hormonal Kontrolü

Besin alımı çeşitli hormonların hipotalamus üzerindeki etkileri ile de düzenlenmektedir. Büyük oranda beyaz adipoz dokuda üretilip salgılanan anoreksijenik hormon leptin <sup>81,82</sup>, aktivitesini tek bir leptin reseptör (*Ob-R*; *LepR*) geninden sentezlenen altı tip reseptör (*Ob-Ra*, *-Rb*, *-Rc*, *-Rd*, *-Re*, ve *-Rf*) üzerinden gerçekleştirir <sup>83</sup>. Leptin reseptörü, hipotalamusta yoğun bir şekilde ifade edilir ve leptin sinyalleşmesinin

gerçekleşmesi için gereklidir <sup>84-86</sup>. ARC, leptinin tokluk etkilerinin gözlemlenmesindeki primer bölgedir <sup>87</sup>. Kan dolaşımında serbest şekilde dolaşan leptin, besin alımını, vücut ağırlığını ve glikoz metabolizmasını temel olarak hipotalamus üzerinden düzenler <sup>88</sup>. Leptinin metabolizma düzenlenmesinde beyin üzerine olan direkt etkisi, nöron spesifik olarak *Ob-R* eksik (*db/db*) farelerde silinmesi, farelerde obez fenotipe sebep olurken hepatosit spesifik (*db/db*) farelerde fenotip normal olarak gözlemlenmiştir <sup>89,90</sup>. Bunun yanında, POMC-spesifik, AgRP-spesifik veya POMC/AgRP kombine *db/db* farelerde vücut ağırlığı ve yağ kütlesinde artış gözlemlenmiştir <sup>91,92</sup>. Yapılan çalışmalar, leptinin POMC nöronlarını aktive ederken, AgRP nöronlarını inhibe ettiğini göstermiştir <sup>93</sup> (Şekil 3). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışma ise, hipoleptineminin besin alımını hipotalamus-hipofiz-adrenal aks yoluyla, AgRP nöronlarının aktive olması ile gerçekleştiğini göstermiştir <sup>94</sup>.

Metabolik düzenlenmede önemli rolleri olan insülinin sistemik uygulanması sonucu besin alımını baskıladığı belirtilmiştir <sup>95,96</sup>. Yapılan ilk çalışmalarda insülinin ARC *NPY* ifadesinde azalmaya sebep olduğu belirtilirken <sup>97,98</sup> *POMC* ifadesinde artış gözlemlenmiştir <sup>99</sup>. Bunun yanında, global insülin reseptörü (IR) eksikliği obeziteye sebep olurken <sup>100</sup>, AgRP veya POMC nöronlarındaki insülin reseptörü eksikliği farelerin total besin alımı ve enerji homeostazında herhangi bir değişime neden olmamaktadır <sup>101</sup> (Şekil 3). Diğer bir çalışma ise insülinin besin alımı ve enerji homeostazını *NPY* nöronları üzerinden kontrol ettiğini göstermiştir <sup>102</sup> (Şekil 3). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise, AgRP nöronlarındaki insülin sinyal yolağı aktivasyonunun toplam diüurnal kalori alımını etkilemeden besin alımını dönemsel düşürdüğünü gösterilmiştir <sup>103</sup>.

Grelın oreksijenik bir hormon olup çoğunlukla midede bulunan özelleşmiş endokrin hücreler tarafından üretilip salınır <sup>83,104</sup> ve oreksijenik etkilerini büyüme hormonu sekretogog reseptörü (growth hormone secretagogue receptor (GHSR)) üzerinden gerçekleştirir <sup>105</sup>. Hipotalamustaki yoğun ifadesinin yanında GHSR'nin *NPY*/AgRP nöronlarında POMC nöronlarına kıyasla daha fazla ifade edildiği <sup>106</sup> ve sistemik veya intraserebroventriküler (ICV) grelin uygulanmasının *NPY*/AgRP nöronlarındaki *c-fos* ifadesini arttırdığı gözlenmiştir <sup>107,108</sup>. Ayrıca grelin, *NPY*/AgRP nöronlarının elektriksel aktivitesini, *NPY* ve *AgRP* ifadesini de arttırmaktadır <sup>109-114</sup>. Diğer yandan, GHSR'nin POMC nöronlarındaki ifadesinin az olduğu belirtilmiş olup <sup>106</sup>, grelinin POMC nöronları üzerindeki inhibitör etkisinin AgRP nöronlarının POMC

nöronları üzerindeki inhibitör GABAerjik sinaptik akımlar üzerinden olduğu düşünülmüştür <sup>111</sup> (Şekil 3). Ancak başka bir çalışma ise grelinin GHSR-bağımsız olarak POMC nöronlarını aktive edebildiğini göstermiştir <sup>114</sup>. Hem NPY hem de AgRP'nin eksik olduğu hayvanlarda grelinin beslenme davranışını arttırıcı etkisinin bloke olduğu gösterilmiştir <sup>115</sup>.

Tiroit hormonları metabolizmanın düzenlenmesinde neredeyse tüm organlarda önemli rol oynamaktadır. Tiroit bezinde üretilen tiroksin (T<sub>4</sub>) 5' deiyodinyasyon reaksiyonu ile aktif tiroit hormonu olan triiyodotironin'e (T<sub>3</sub>) dönüştürülür. Her iki hormon da metabolizmayı enerji harcanması ve besin alımına etki ederek düzenler <sup>116,117</sup>. Sıçanlarda sistemik T<sub>3</sub> uygulaması besin alımını arttırırken hipotalamik *NPY* ifadesini yükseltmiş ve *POMC* ifadesini azaltmıştır <sup>118</sup>. Açlık durumunda ise hipotalamik T<sub>3</sub> seviyelerinde artış gözlemlenmiştir <sup>119,120</sup>.

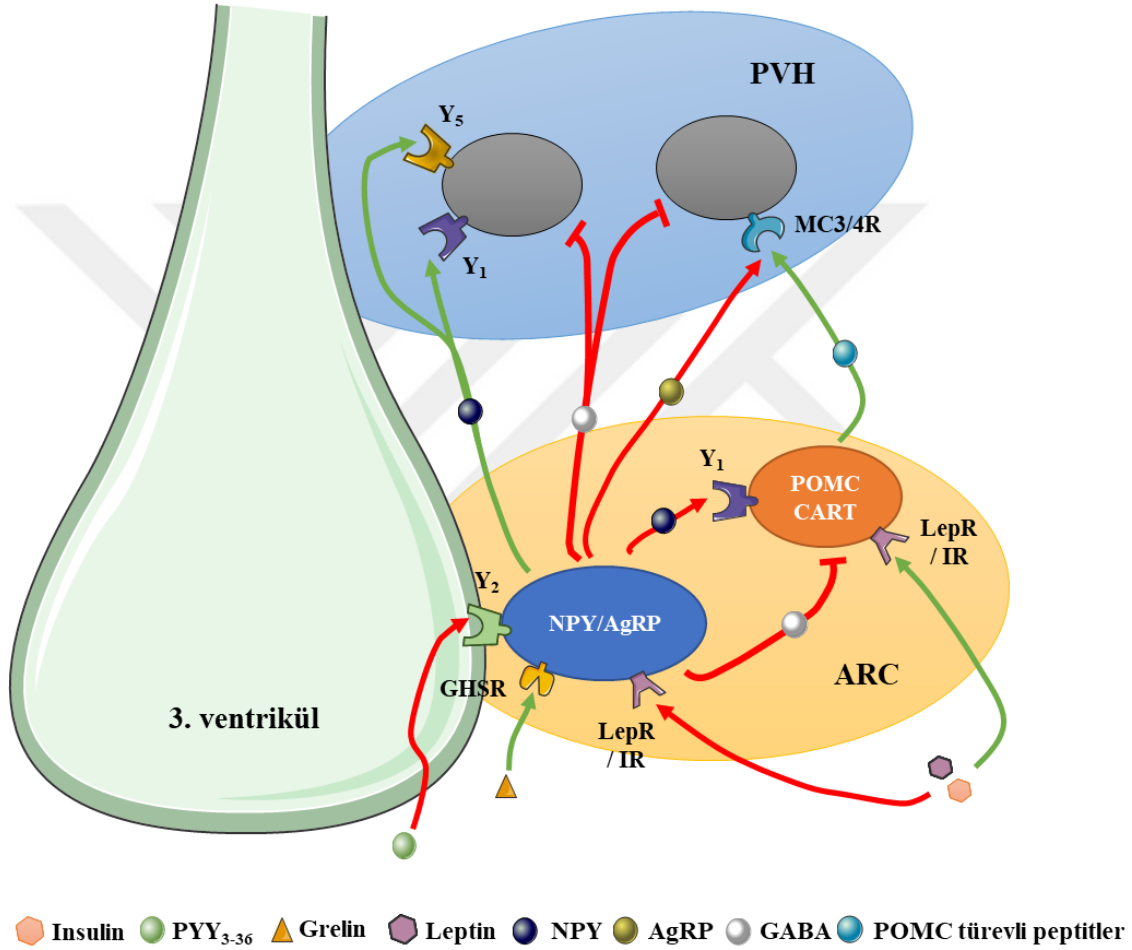
Peptit YY (PYY<sub>3-36</sub>) bağırsakta üretilen bir protein olup <sup>121</sup> besin alımı sonrası lümende bulunan besinlere cevap olarak salınır ve pankreatik ve gastrik sekresyonlar <sup>122</sup> ve gastrointestinal motiliteyi düzenler <sup>123</sup>. PYY<sub>3-36</sub> besin alımını azaltan bir hormon olup <sup>124-127</sup> bu etkilerini NPY/AgRP nöron aktivitesini baskılayarak <sup>128,129</sup> gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Şekil 3). Ancak PYY<sub>3-36</sub>'nın POMC üzerindeki etkileri ile ilgili yayınlar çelişkilidir: bazı yayınlarda PYY<sub>3-36</sub>'nın POMC nöronlarını inhibe ettiği raporlanırken <sup>129,130</sup>, diğer yayınlarda ise POMC nöron ateşlemesini <sup>124</sup> ve *POMC* ifadesini yükselttiği belirtilmiştir <sup>131</sup>.

Glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) besin sindirimi sonrası ince bağırsaktaki L hücreleri tarafından salınan anoreksijenik bir hormondur <sup>132</sup>. GLP-1'in ICV olarak uygulanmasının kalori alımını <sup>133</sup>, kronik olarak ICV uygulanmasının ise besin alımını ve vücut ağırlığını azalttığı belirtilmiştir <sup>134</sup>. Bir GLP-1 reseptörü agonisti olan liraglutide uygulaması farelerde POMC nöron aktivitesini arttırırken, NPY/AgRP nöron aktivitesini <sup>135,136</sup> ve besin alımını azalttığı belirtilmiştir <sup>136</sup>. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise, bir GLP-1 analogu olan exendin 4'ün POMC nöron ateşlemesini arttırdığı belirtilmiştir <sup>137</sup>.

Oksintomodulin (OXM), GLP-1 gibi ince bağırsaktaki L hücreleri tarafından salınır <sup>138,139</sup>. GLP-1'e benzer olarak, OXM'nin ICV ve periferal yolla uygulanması sonucunda besin tüketiminin akut bir şekilde düştüğü <sup>140,141</sup> ve kronik uygulanmasının vücut ağırlığında ve yağlanmada azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir <sup>141</sup>. OXM'nin şu

anda bilinen bir reseptörü bulunmamaktadır ancak etkilerini glukagon ve GLP-1 reseptörlerini aktive ederek gerçekleştirir <sup>142</sup>.

Kolesistokinin (CCK) ana olarak gastrointestinal sistemde üretilirken <sup>143</sup> merkezi sinir sisteminde (MSS) de ifade edilip nörotransmitter görev yaparak ödül davranışı, anksiyete, hafıza ve tokluk mekanizmalarını düzenler <sup>144,145</sup>. Yakın zamanda yapılan bir çalışma CCK'nin AgRP aktivitesini geçici olarak inhibe ettiğini göstermiştir <sup>146</sup>.



**Şekil 3.** ARC’de enerji homeostazının düzenleyen nöronal yollar ve hormonlar.

### 2.2.2. Arkuat Çekirdek NPY/AgRP Nöronları

ARC 3. ventrikülün komşuluğunda yer alır ve enerji homeostazında merkezi rol oynar. Sıkı bağlantılarla bağlı, yüksek miktarda fenestreli kapiller sistem ve ependimoglia hücrelerden meydana gelen ve kan-beyin bariyeri’n (KBB) median eminens’e (ME) bitişiktir <sup>147</sup>. ME, kan kaynaklı peptitlerin ve özel moleküllerin değişiminden sorumlu olup <sup>148,149</sup>, KBB’nin özelleşmiş fonksiyonlarının da yardımıyla

ARC’de üretilen nöronal peptitlerdeki değişimleri algılayarak metabolizmada meydana gelen değişikliklere yanıt oluşturulmasını kolaylaştırıp hızlandırır <sup>150,151</sup>.

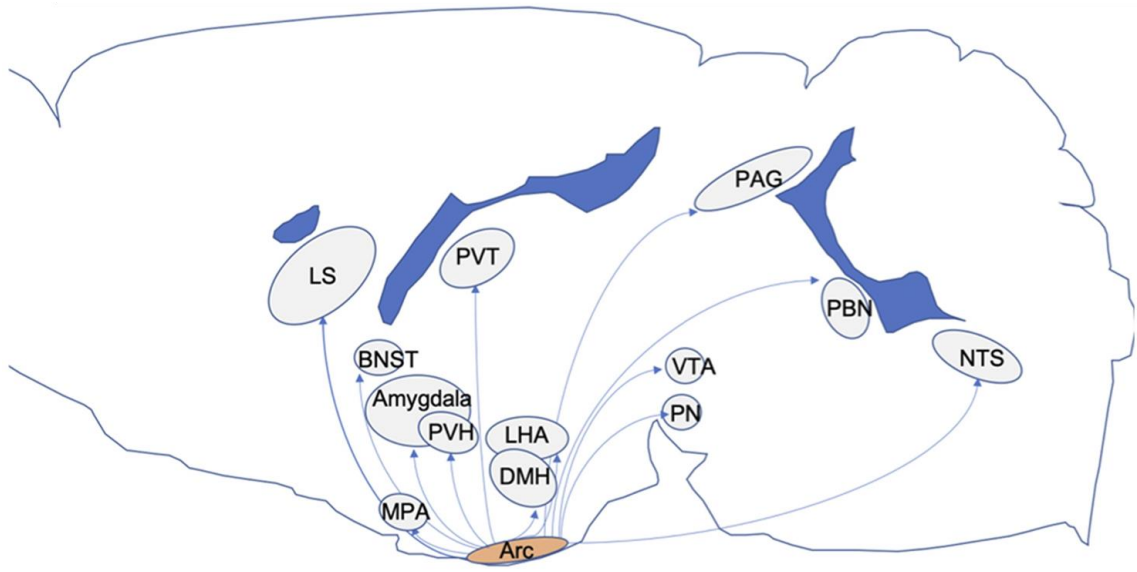
NPY ilk olarak domuz beyninden izole edilmiş olan 36 amino asitlik bir peptit olup pankreatik polipeptit ve PYY’nin de dahil olduğu nöroendokrin peptit ailesine dahildir <sup>152</sup>. Hem periferel hem de merkezi dokularda bulunan NPY, özellikle sinir sisteminde yoğun olarak bulunmaktadır. NPY MSS’de başta hipokampus, hipotalamus, talamus, beyin sapı, serebellum olmak üzere birçok bölgede bulunurken <sup>153,154</sup>, retina, düz kas, bağırsak, kemik iliği ve timüs gibi MSS dışı dokularda bulunmaktadır <sup>155-158</sup>.

NPY, MSS’de en yoğun olarak hipokampusta bulunur ve GABAerjik internöronlar tarafından üretilir <sup>159</sup>. MSS’deki aktivitesini NPY reseptörlerine (Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub>, Y<sub>5</sub> ve Y<sub>6</sub>) bağlanıp aktive ederek gerçekleştirir <sup>160,161</sup>. Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> ve Y<sub>5</sub> reseptörleri memelilerde beslenme davranışının düzenlenmesinde anahtar rol oynarken Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> ve Y<sub>4</sub> reseptörleri anksiyetede ve depresyon davranışlarının regülasyonunda önemli rol oynamaktadır <sup>162</sup>. Y<sub>6</sub> reseptörü ise insanlar da dahil olmak memelilerde fonksiyonel değildir ve fizyolojik fonksiyonları bilinmemektedir <sup>162</sup>.

AgRP ve NPY metabolik eksikliğe cevap olarak iştahı stimüle eden ilk oreksijenik peptit grubudur <sup>163-165</sup>. Leptin, insülin, grelin gibi sirkülasyonda bulunan hormonların reseptörlerinin ARC<sup>NPY</sup> nöronlarındaki yüksek ifadesi periferden gelen sinyallerin bu nöronların aktivitesini direkt olarak düzenlediğini göstermektedir <sup>102,106,166,167</sup>. Bununla birlikte, ARC<sup>NPY</sup> nöronlarına yoğun sinaptik girdiler bu nöronların enerji homeostazında direkt olarak da modüle edilebildiğini göstermektedir <sup>168,169</sup>. NPY, beyinde farklı bölgelerde yoğun olarak ifade edilirken <sup>170</sup>, NPY ve AgRP’nin kolokalize ifadesi yalnızca ARC ile sınırlıdır <sup>171,172</sup>. Her ne kadar NPY ve AgRP ARC’de yoğun olarak birlikte eksprese edilse de NPY nöronlarının bir kısmı AgRP ifade etmez <sup>171,173-175</sup>. Bu nedenle, AgRP’nin belirteç olarak kullanıldığı veya AgRP-Cre hatlar NPY nöronlarının sadece belli bir popülasyonunun incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bunun yanında, ARC NPY nöronlarının enerji metabolizması regülasyonu ve besin alımındaki rolleri üzerine yapılan çalışmalar yine AgRP-Cre hatlarda yapılmaktadır.

AgRP immünreaktif fiberler belirteç olarak kullanıldığında ARC<sup>NPY/AgRP</sup> nöronlarının hem hipotalamik hem de hipotalamus dışı alanlardan innervasyon aldığı görülmüştür <sup>171</sup>. Bu alanlar ön beyinde lateral septal çekirdek (LS), stria terminalis (BNST) ve amigdala, orta beyinde medial preoptik alan (MPA), paraventriküler

hipotalamus (PVH), ARC, dorsomedial hipotalamus (DMH), lateral hipotalamik alan (LHA) ve talamik paraventricüler çekirdek (PVT), arka beyinde paranigral çekirdek (PN), ventral tegmental alan (VTA), parabrakiyal çekirdek (PBN), periaqueductal gray (PAG) ve nükleus traktus solitarius'u (NTS) içermektedir <sup>171,176</sup> (Şekil 4). NPY/AgRP nöronlarının ablasyonu sonucu projeksiyon yaptığı bölgelerdeki c-fos ifadesi gözlemlenerek bu bölgelerdeki nöronal aktivite incelenmiş ve bunun sonucunda ARC, PVH, DMH, MPA, LS ve PAG'yi de içeren bölgelerde nöronal aktivite ciddi oranda yüksek bulunurken, BNST, VTA ve PN'de c-fos immünreaktivitesi çok az gözlenmiş ya da hiç gözlenmemiştir <sup>171,177,178</sup>.



**Şekil 4.** ARC<sup>NPY/AgRP</sup> nöronlarından köken alan projeksiyonların şematik gösterimi <sup>176</sup>.

AgRP'nin transgenik olarak aşırı ifade edildiği veya sistemik olarak verildiği çalışmalarda farelerde obezite ve hiperfajinin indüklendiği gözlemlenirken <sup>79,179,180</sup>, ARC<sup>AgRP</sup> nöronlarının genetik ablasyonunun besin alımını azalttığı belirtilmiştir <sup>177,181-184</sup>. Bunun yanında AgRP nöronlarının optogenetik veya kemogenetik aktivasyonu sonucunda yeme davranışının akut olarak indüklendiği gözlenmiştir <sup>184-186</sup>, ancak kemogenetik uyarım sonrasında artan besin alımının bir hafta sonrasında normale döndüğü bildirilmiştir <sup>186</sup>.

## 2.3. Mitokondri

### 2.3.1. Mitokondri ve Enerji Üretimi

Mitokondriler anneden yavruya aktarılan, kendi genomu bulunan, ökaryotik hücrelerde bulunan çift zarlı, dinamik, yarı otonom organellerdir <sup>187,188</sup>. Mitokondrinin en

bilinen fonksiyonu oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile ATP üretimini gerçekleştirmektedir ve bu nedenle hücrenin enerji santrali olarak tanımlanmaktadır. OXPHOS, mitokondrinin iç membranında bulunan ve elektron taşıma zinciri (ETZ) adı verilen protein kompleksleri tarafından gerçekleştirilen redoks reaksiyon kaskadı yolağıdır <sup>187</sup>. Temel olarak, trikarboksilik asit (TKA) döngüsü enzimleri mitokondriyal matriste nikotinamid-adenin-dinükleotid (NADH) ve flavin adenin dinükleotid (FADH<sub>2</sub>) de dahil olmak üzere çeşitli elektron taşıyıcıları üretir <sup>189</sup>. Bu elektron taşıyıcıları sırasıyla, protein kompleksleri (I-IV) ve iki çözünür faktör olan sitokrom c ve koenzim Q'dan oluşan ETZ'ye elektron bağışlar <sup>190</sup>. Kompleks I, 45 ana alt birimden oluşan komplekslerin ilki ve en büyüğüdür <sup>191</sup>. Kompleks I ve II, sırasıyla NADH ve FADH<sub>2</sub>'den mobil elektron taşıyıcı koenzim Q'ya gerçekleşen iki elektron transferi olayına aracılık eder <sup>190</sup>. Kompleks II ayrıca amino asitler, kolin, yağ asitlerinin oksidasyonu gibi bir dizi besinin degradasyonu sonrasında da elektron alabilir <sup>192</sup>. Kompleks III, indirgenmiş koenzim Q'dan iki elektron alır ve tek elektronları sitokrom c'ye taşır <sup>193</sup>. Kompleks IV, oksijeni tamamen suya indirgemek için sitokrom c'den elektronları kabul ederek solunum zincirini sonlandırır <sup>194</sup>. ETZ'nin gerçekleştirdiği redoks reaksiyonları mitokondriyal transmembran potansiyeli olarak bilinen elektrokimyasal bir gradyan oluşturarak protonları matristen intermembran boşluğa pompalamalarına izin veren komplekslerde konformasyonel değişikliklere neden olarak adenosin difosfatı (ADP) fosforilleyen ve ATP üreten ATP sentaz (Kompleks V) tarafından kullanılan bir proton itici gücü oluşturur <sup>195</sup>. OXPHOS'un yanında enerji üretiminde karbonhidrat, protein ve lipid gibi besin maddelerinin daha küçük moleküllere katabolize edilmesi ve TKA döngüsünde gerçekleşen bir dizi enzimatik reaksiyon sonucunda enerji üretimine katılması, mitokondriyal enerji üretiminde büyük öneme sahiptir <sup>196</sup>.

Mitokondriler katabolizmada ve enerji üretiminde önemli rollerinin bulunmasının yanında gerçekleşen reaksiyonlar sonrasında ortaya çıkan moleküllerle, özellikle lipidler, karbonhidratlar, proteinler, amino asitler ve nükleotidler dahil olmak üzere birçok makromolekülün biyosentezinde öncü olarak kullanıldığı biyosentetik yollarda işlev görür <sup>197</sup>. Mitokondrinin diğer önemli metabolik fonksiyonları arasında ise hem ve Fe-S kümelerini sentezleyerek metal iyonu metabolizmasını ve ketogenezin kontrol adımlarının yanı sıra lipogenez, steroidogenez, glukoneogenez ve amonyum detoksifikasyonunda yer alan reaksiyonları bulunmaktadır <sup>198,199</sup>.

### 2.3.2. Mitokondrinin Enerji Üretimi Dışındaki Roller

#### 2.3.2.1. Kalsiyum Homeostazı

Kalsiyum iyonları ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kas kasılması, nörotransmitter salınımı ve hücre içi sinyalleşme gibi birçok hücresel fonksiyon için gerekli bir iyondur. Uygun kalsiyum homeostazının sürdürülmesi, hücresel fonksiyon ve sağkalım için kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda mitokondri, hücre içi kalsiyum dinamiklerinin ana düzenleyicilerinden biri olarak rol almaktadır <sup>200</sup>.

Mitokondri, mitokondri iç zarında bulunan mitokondriyal kalsiyum uniporter (MKU) kompleksi aracılığıyla sitozolden kalsiyum iyonlarını alabilir <sup>201</sup>. MKU kompleksi, MICU1, MICU2 ve EMRE dahil olmak üzere çeşitli yardımcı proteinler tarafından düzenlenen oldukça seçici bir kalsiyum kanalıdır <sup>202</sup>. Kalsiyumun mitokondri tarafından alımı, ETZ'nin aktivitesi tarafından üretilen iç mitokondriyal membran boyunca oluşan elektrokimyasal gradyan tarafından yürütülür <sup>203</sup>.  $\text{Ca}^{2+}$  mitokondri içine girdikten sonra kalsiyum tamponu görevi gören kalretikülin gibi çeşitli mitokondriyal matris proteinleri ve fosfat iyonları farklı moleküllere bağlanabilir <sup>204,205</sup>. Bu tamponlama kapasitesi, mitokondrinin büyük miktarlarda kalsiyumu ayırmasına ve depolamasına izin verir <sup>205</sup>. Bu sayede hücresel işlev bozukluğuna veya ölüme yol açabilecek sitozolik kalsiyum seviyelerinde aşırı artışları önler <sup>206</sup>. Bunun yanında mitokondri  $\text{Ca}^{2+}$ 'yi bir kalsiyum iyonunu üç sodyum iyonu ile değiştiren mitokondriyal sodyum/kalsiyum değiştiricisi aracılığıyla sitozole geri salabilir <sup>207</sup>. Bu süreç, uygun kalsiyum dinamiklerini sürdürmek ve mitokondri içinde mitokondriyal işlevi bozabilen ve hücre ölümünü tetikleyebilen kalsiyum aşırı yüklenmesini önlemek için gereklidir <sup>208</sup>.

#### 2.3.2.2. Hücresel Sinyalleşme

Mitokondri, iç ve dış uyaranlara hücresel cevapları modüle eden ve böylece hücresel homeostazı koruyan ve uygun hücresel fonksiyonların gerçekleşmesine katkıda bulunan çeşitli sinyal yollarında aktif rol alır.

##### 2.3.2.2.1. Reaktif Oksijen Türevleri

Mitokondri oksidatif fosforilasyon sırasında ETZ'nin yan ürünleri olarak üretilen hücresel reaktif oksijen türevleri (ROS) için önemli bir kaynaktır <sup>209</sup>. Süperoksit anyonları ( $\text{O}_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gibi ROS ürünleri, kinazlar, fosfatazlar ve transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere çeşitli proteinlerin aktivitesini modüle ederek

sinyal iletim basamaklarında ikinci haberciler olarak hareket edebilir <sup>210</sup>. Fizyolojik koşullar altında, mitokondriyal ROS üretimi, hücrel fonksiyon ve hayatta kalma için gerekli olan redoks homeostazını sürdürmek için sıkı bir şekilde düzenlenir <sup>211,212</sup>. Buna karşın çeşitli patolojilerin varlığında veya stres koşullarında artan ROS miktarı antioksidan sistem ve ROS üretimindeki dengede bozulmaya sebep olacağından homeostatik dengeyi bozar ve hücre içi sinyalleşme kaskadlarında deregülasyona sebep olur <sup>213</sup>.

#### **2.3.2.2.2. Retrograd Sinyalleşme**

Mitokondrinin bir başka fonksiyonu mitokondriyal fonksiyondaki veya hücrel stresteki değişikliklere yanıt olarak mitokondriden çekirdeğe sinyallerin iletilmesini içeren ve retrograd sinyalleşme olarak bilinen bir süreç aracılığıyla çekirdekle iletişim kurabilmesidir <sup>214,215</sup>. Retrograd sinyalleşme, hücrenin mitokondriyal işlevi ve hücrel homeostazı sürdürmek için gen ekspresyon profilini düzenlenmesini sağlar <sup>216-218</sup>. Kalsiyum/kalsinörin yolağı, adenosin monofosfat (AMP) ile aktive olan protein kinaz (AMPK) yolağı ve mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağı gibi çeşitli yollar mitokondriyal retrograd sinyalleşmede rol almaktadır <sup>219,220</sup>.

#### **2.3.2.2.3. PI3K/Akt Sinyal Yolağının Mitokondri Tarafından Modülasyonu**

Mitokondri hücre büyümesi, çoğalması, sağkalımı ve apoptoz gibi temel hücrel süreçleri düzenleyen çeşitli sinyal yollarının modülasyonunda rol oynamaktadır. Bu yollardan biri hücre büyümesi, çoğalması ve sağkalımı için gerekli olan fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolağının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Akt'nin, endoplazmik retikulum (ER) üzerindeki inositol 1,4,5-trisfosfat reseptörlerini (IP3R'ler) fosforile ederek, ER'den mitokondriye  $Ca^{2+}$  salınımını inhibe ettiği ve bu azaltılmış mitokondriyal  $Ca^{2+}$  alımının pro-apoptotik faktörlerin aktivasyonunu önleyerek ve mitokondriyal enerji üretimini koruyarak hücrenin sağkalımını desteklediği gösterilmiştir <sup>221</sup>. Bunun yanında mitokondriyal ROS üretimi PI3K/Akt yolağını modüle edebilir <sup>222</sup>. Fizyolojik koşullar altında, düşük ROS seviyeleri, apoptozu inhibe ederek ve hücre büyümesini uyararak hücre sağkalımını ve çoğalmasını teşvik ederek PI3K/Akt yolunu aktive edebilir <sup>223</sup>.

#### **2.3.2.2.4. Rapamisinin Mekanik Hedefi (mTOR) Sinyal Yolağının Mitokondri Tarafından Modülasyonu**

Mitokondri tarafından regüle edilen bir diğer yolak rapamisinin mekanik hedefi (mTOR) yolağıdır. Mitokondriyal işlev bozukluğu ve enerji durumundaki değişiklikler, mTOR aktivitesini engelleyen ve hücrel enerji homeostazını düzenleyen AMPK'yi aktive edebilir <sup>224</sup>. Buna ek olarak, mitokondriyal ROS'un mTOR'u aktive ettiği de gösterilmiş olup, bu da mitokondriyal aktivitenin bu sinyal yolağını modüle etmedeki bir başka rolünü vurgulamaktadır <sup>225,226</sup>.

#### **2.3.2.2.5. HIF Sinyal Yolağının Mitokondri Tarafından Modülasyonu**

Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) yolağı, hücrel oksijen seviyelerindeki değişikliklere yanıt veren ve hipoksiye karşı hücrel adaptasyonda önemli rolleri olan önemli bir sinyal kaskadıdır. Mitokondri, başta ROS üretimi ve oksijen tüketiminin modülasyonu olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla HIF yolağının düzenlenmesinde yer alır <sup>227-229</sup>. Hipoksik koşullar altında, mitokondriyal ROS'taki artış sonucu, HIF yolağında önemli bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1 $\alpha$  stabilize olur <sup>230</sup>. Bu stabilizasyon, HIF-1 $\alpha$ 'nın HIF-1 $\beta$  ile dimerizasyonuna yol açarak aktif HIF-1 kompleksinin oluşmasına ve çekirdeğe lokalize olarak hipoksiye duyarlı elementlere (HRE'ler) bağlanmasına sebep olur <sup>231</sup>. Bu durum ise anjiyogenez, glikoliz, hücre sağkalımı ve hipoksiye metabolik adaptasyonda yer alan hedef genlerin transkripsiyonu ile sonuçlanır <sup>232,233</sup>. Bunun yanında HIF-1 $\alpha$ 'nın pirüvat dehidrojenazı (PDH) inhibe eden pirüvat dehidrojenaz kinaz 1'i (PDK1) transkripsiyonel olarak arttırma yönünde düzenlediği ve böylece pirüvatın TKA döngüsüne akışını azalttığı ve mitokondriyal oksijen tüketimini azalttığı gösterilmiştir <sup>234</sup>.

#### **2.3.2.2.6. NF- $\kappa$ B Sinyal Yolağının Mitokondri Tarafından Modülasyonu**

Nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) hücrel sinyalleşmede, özellikle immün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde, hücre sağkalımında ve stres yanıtında merkezi bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür <sup>235,236</sup>. Mitokondriyal ROS üretimi NF- $\kappa$ B yolağını modüle eder <sup>237</sup>. Fizyolojik koşullarda düşük ROS seviyeleri, sitoplazmada NF- $\kappa$ B'ye bağlanarak inhibe eden inhibitör kappa B'nin (I $\kappa$ B) degradasyonunu uyararak NF- $\kappa$ B yolağını aktive edebilir <sup>237,238</sup>. I $\kappa$ B degradasyonu sonrası NF- $\kappa$ B çekirdeğe transloke olur ve inflamasyon, immün cevap ve hücre sağkalımı ile ilgili hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmesine izin verir <sup>235</sup>. Öte yandan aşırı mitokondriyal ROS,

oksidatif strese neden olarak NF- $\kappa$ B yolak aktivitesini deregüle eder ve kronik inflamasyon ve kanser gibi patolojik durumlara yol açabilir <sup>212,238</sup>.

#### **2.3.2.2.7. Sirtuin Sinyal Yolağının Mitokondri Tarafından Modülasyonu**

Mitokondrinin hücrel sinyalleşmeyi, mitokondriyal işlevi ve metabolik homeostazı etkileyen düzenlemesinde etkileşimde olduğu bir başka yolak ise sirtuin yolağıdır ve bunu temel olarak mitokondriyal sirtuinler aracılığı ile gerçekleştirir <sup>239,240</sup>. Sirtuin protein ailesi, enerji metabolizması, stres yanıtı ve yaşlanma gibi çeşitli hücrel süreçlerde kritik roller oynayan bir nikotinamid adenin dinükleotit (NAD<sup>+</sup>) bağımlı deasetilazlar ve ADP-ribosiltransferazlar ailesidir <sup>241</sup>. Sirtuin ailesinin üç üyesi, SIRT3, SIRT4 ve SIRT5, temel olarak mitokondride lokalize olur ve çeşitli enzimlerin ve proteinlerin düzenlenmesi yoluyla mitokondriyal işlevi modüle eder <sup>240,242,243</sup>. SIRT3 hedef enzimlerin deasetilasyonu ve aktivasyonu yoluyla çeşitli mitokondriyal süreci etkileyen önemli bir mitokondriyal deasetilazdır ve mitokondriyal enerji üretimini ve metabolik homeostazı düzenleyerek TKA döngüsü, yağ asidi oksidasyonu ve oksidatif fosforilasyonda yer alan çeşitli enzimleri deasetile ederek aktive eder <sup>244,245</sup>. SIRT4 öncelikle bir deasetilazdan ziyade bir ADP-riboziltransferaz olarak işlev görür <sup>246</sup>. SIRT4, amino asit metabolizmasını TKA döngüsü ile bağlayan anahtar bir enzim olan glutamat dehidrogenaz aktivitesini ADP-ribosile ederek inhibe eder ve amino asit metabolizmasını ve insülin sekresyonunu düzenler <sup>247-249</sup>. SIRT5 ise enerji metabolizmasını modüle eden ve üre döngüsü, yağ asidi oksidasyonu, keton cisim oluşumu, ROS detoksifikasyonu ve ETZ aktivitesinin düzenlenmesi gibi çeşitli olayları etkileyen farklı mitokondriyal enzimleri hedefler <sup>250</sup>. SIRT1, ağırlıklı olarak çekirdekte lokalize olmasına rağmen mitokondriyal biyogenez ve enerji metabolizmasını kontrol eden bir transkripsiyonel koaktivatör olan peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatörü 1- $\alpha$ 'nın (PGC-1 $\alpha$ ) düzenlenmesi yoluyla dolaylı olarak mitokondriyal işlevi düzenler <sup>251,252</sup>. SIRT1 mitokondriyal biyogenez, oksidatif fosforilasyon ve yağ asidi oksidasyonunda yer alan genlerin ekspresyonunu uyarma yeteneğini artırarak PGC-1 $\alpha$ 'yı deasetille ederek aktifleştirir <sup>253</sup>. SIRT1 ve PGC-1 $\alpha$  arasındaki bu etkileşim, besinin algılanmasını mitokondriyal fonksiyon ve metabolik homeostaz ile ilişkilendirir enerji ihtiyacı durumunda hücrel adaptasyonda çok önemli rol oynar <sup>254-256</sup>.

### **2.3.2.3. İmmün Regülasyon**

Mitokondrinin immün yanıt modülasyonundaki rolleri yıllar geçtikçe daha fazla açığa kavuşturulmaktadır. Mitokondri çeşitli mekanizmalar yoluyla hem doğal hem de adaptif bağışıklık cevabına katkıda bulunur <sup>257</sup>.

#### **2.3.2.3.1. ROS Üretimi**

ROS immün yanıtın düzenlenmesinde önemli oynar. Düşük ROS seviyeleri, fagositik aktiviteyi ve antimikrobiyal moleküllerin üretimini artırarak makrofajlar ve nötrofiller gibi bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunda yer alır <sup>258,259</sup>. Buna ek olarak, proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu düzenleyen HIF-1- $\alpha$  ve NF- $\kappa$ B gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu modüle eder <sup>260-262</sup>.

#### **2.3.2.3.2. İnflamazom Aktivasyonunun Düzenlenmesi**

Mitokondri doğal bağışıklık yanıtının kritik bir bileşeni olan inflamazom aktivasyonunun düzenlenmesinde de rol oynar. Nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı, lösin açısından zengin tekrar içeren protein 3 (NLRP3), patojenle ilişkili moleküler örüntüler (PAMP'lar) ve hasarla ilişkili moleküler örüntüler (DAMP'lar) gibi çeşitli tehlike sinyallerini algılayarak kaspaz-1 aktivasyonuna ve interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açar <sup>263,264</sup>. Mitokondriyal ROS ve mitokondriyal DNA gibi mitokondriyal kaynaklı faktörlerin NLRP3 inflamazom aktivasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir <sup>265-267</sup>.

#### **2.3.2.3.3. İmmün Hücre Metabolizmasının Modülasyonu**

Mitokondri, aktivasyonları sırasında bağışıklık hücrelerinin metabolik yeniden programlanmasını düzenlemek için gereklidir. Örneğin, aktivasyon üzerine T hücreleri, artan enerji taleplerini karşılamak için oksidatif fosforilasyondan glikolize geçer <sup>268,269</sup>. Bu geçiş, yağ asidi oksidasyonunu kontrol eden ve T hücresi farklılaşmasını ve işlevini etkileyen mitokondriyal enzim olan karnitin palmitoiltransferaz 1a tarafından düzenlenir <sup>270-272</sup>. Benzer şekilde mitokondriyal metabolizma, makrofajların proinflamatuvar (M1) veya antiinflamatuvar (M2) fenotipe polarizasyonunda önemli oynar <sup>273-275</sup>.

#### **2.3.2.3.4. Mitokondriyal Antiviral Sinyalleşme**

Mitokondri ayrıca antiviral bağışıklık yanıtında önemli rol oynamaktadır <sup>276</sup>. Dış mitokondriyal zara bağlanan mitokondriyal antiviral sinyal proteini (MAVS), RIG-I

benzeri reseptör (RLR) sinyal yolunda merkezi bir adaptör protein görevi görür <sup>277,278</sup>. Viral ribonükleik asidin (RNA) tanınması üzerine, RIG-I ve MDA5 gibi RLR'ler MAVS ile etkileşerek hedef sinyalleşme olaylarının aktivasyonuna ve tip I interferonların ve diğer antiviral sitokinlerin indüklenmesine yol açar <sup>279-281</sup>. Bu süreç, konağın viral enfeksiyonlara karşı savunması için gereklidir.

#### **2.3.2.3.5. İmmün Hücrelerde Apoptozun Düzenlenmesi**

Mitokondri immün homeostazın sürdürülmesinde ve otoimmün hastalıkların önlenmesinde çok önemli bir süreç olan apoptozun düzenlenmesinde merkezi rol alır. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik (örn. Bax, Bak) ve anti-apoptotik (örn. Bcl-2, Bcl-xL) proteinleri arasındaki denge, sitokrom c salınımı ve kaspazların aktivasyonu sonucunda apoptozla apoptozun gerçekleşmesinde rol oynayan mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) yönetir <sup>282,283</sup>. Lenfositler gibi bağışıklık hücrelerinde apoptozun düzenlenmesi, sayılarını kontrol etmek ve aşırı inflamasyonu veya otoimmüniteyi önlemek için gereklidir <sup>284,285</sup>.

#### **2.3.2.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları**

Mitokondri apoptoz, nekroptoz ve piroptoz dahil olmak üzere çeşitli hücre ölüm mekanizmalarının önemli bir düzenleyicidir. Bu yollar, doku ve organizma homeostazını korumak için gerekli olup ve çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda rol alırlar.

##### **2.3.2.4.1. Apoptoz**

Apoptoz, hücrel homeostazın korunmasında, doku gelişiminde ve hasarlı veya enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynayan bir programlanmış hücre ölümü şeklidir <sup>286</sup>. Mitokondri, intrinsik apoptotik yolak aracılığıyla apoptozun düzenlenmesinde merkezi rol oynar. Bu yolak, hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri içeren Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir ve bu proteinler arasındaki etkileşim sonuçta hücrenin kaderini belirler <sup>285</sup>. İntrinsik apoptotik yolaktaki kritik olay, mitokondriden sitozole sitokrom c'nin salınmasıdır <sup>285</sup>. Bu süreç, aktive olduktan sonra dış mitokondriyal zarla oligomerik porlar oluşturan Bax ve Bak gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenir <sup>285</sup>. Bunun tersine, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyeleri, Bax ve Bak'ın aktivasyonunu önleyerek bu süreci engeller <sup>285</sup>. Sitokrom c salındıktan sonra sitozolik adaptör protein apoptotik proteaz

aktive edici faktör-1'e bağlanır ve başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9'u aktive eden bir çoklu protein kompleksi olan apoptozom oluşumunu sağlar <sup>285</sup>. Aktif kaspaz-9 daha sonra efektör kaspazlar olan kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi keserek aktive eder. Son olarak DNA fragmentasyonu, hücre fragmentasyonu ve fosfatidilserinin hücre zarının dış yüzeyine transloke olmasını takiben hücre fagositler tarafından ortadan kaldırılır <sup>285</sup>.

Mitokondriyal membran potansiyeli ( $\Delta\psi_m$ ) sitokrom c gibi pro-apoptotik faktörlerin mitokondriden salınmasını düzenlemesi sebebiyle hücre kaderinde belirleyici rol oynar.  $\Delta\psi_m$  kaybı mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenəğinin açılmasıyla ilişkilendirilir ve bu da,  $\Delta\psi_m$ 'nin bozulması ve pro-apoptotik faktörlerin salınmasıyla sonuçlanır <sup>287</sup>. Bunun yanında mitokondrinin önemli bir ROS kaynağı olması ve aşırı ROS üretiminin lipidler, proteinler ve DNA dahil olmak üzere hücresel bileşenlerde oksidatif hasara yol açması sonunda apoptoz tetiklenebilir <sup>223</sup>. Ayrıca ROS, Bcl-2 ailesi proteinlerinin aktivitesini düzenleyerek apoptozu düzenleme yeteneklerini etkileyebilir <sup>288</sup>.

Tümör proteini p53, DNA hasarı gibi çeşitli hücresel streslere yanıt veren ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonunu ve aktivitesini modüle ederek apoptozu destekleyebilen bir transkripsiyon faktörüdür <sup>289</sup> ve mitokondri, p53 yolağı gibi diğer hücresel sinyal yolları ile etkileşimler ile de apoptozu düzenleyebilir <sup>290,291</sup>.

Bunların yanında fisyon ve füzyon gibi mitokondriyal dinamiklerinde rol oynayan mekanizmalar <sup>292-294</sup> ve mitofaji ve katlanmamış protein cevabı gibi mitokondriyal kalite kontrol mekanizmaları da <sup>295,296</sup> apoptozun düzenlenmesinde rol alabilir.

#### **2.3.2.4.2. Nekroptoz**

Nekroptoz, kaspaz bağımlı apoptozdan farklı olarak nekrotik benzeri bir morfoloji ile karakterize edilen, düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir <sup>297</sup>. Nekroptoz reseptörle etkileşime giren protein kinaz 1 (RIPK1), RIPK3 ve karışık soy kinaz alanı benzeri proteinin (MLKL) aktivasyonu aracılık eder <sup>298,299</sup>. Ayrıca nekroptoz, iskemi-reperfüzyon hasarı, nörodejenerasyon ve inflamasyon gibi çeşitli patolojik durumlarda rol oynar <sup>300</sup>.

Son çalışmalar, mitokondrinin nekroptozun düzenlenmesine dahil olduğunu vurgulamıştır. RIPK1 ve RIPK3, glikojen fosforilaz ve glutamat dehidrojenaz 1 gibi mitokondriyal metabolik enzimleri etkileyerek mitokondriyal ROS oluşumunu tetikleyebilir <sup>299</sup>. Artan mitokondriyal ROS üretimi nekroptotik sinyalleşmeyi ve hücre

ölümünü artırabilir <sup>299</sup>. Bunun yanında fisyon <sup>301</sup>, füzyon <sup>302</sup>, mitokondriyal biyojenez <sup>303</sup> ve mitofaji <sup>304</sup> de mitokondriyal dinamikleri ve mitokondriyal kalite kontrol mekanizmaları üzerinden nekroptozu düzenler.

#### **2.3.2.4.3. Piroptoz**

Piroptoz, hızlı plazma zarı yırtılması, proinflamatuvar hücre içi içeriklerin salınması ve hücrel stres ve hasarı algılayan bir multiprotein kompleksi olan inflamazom aktivasyonu ile karakterize olan düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir <sup>305</sup>. Piroptoz, temel olarak plazma zarını bozan gözenek oluşturun bir protein olan gasdermin D'yi parçalayan ve aktive eden kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-11'in aktivasyonu ile düzenlenir <sup>306</sup>. Mitokondrinin piroptozda sahip olduğu rolü detaylı olarak bilinmemektedir. Ancak çeşitli çalışmalardan elde edilen bulgular mitokondrilerin ,mitokondriyal ROS üretimi <sup>307,308</sup>, mitokondriyal DNA'nın sitozole salınması <sup>309,310</sup>, mitokondriyal dinamiklerin bozulması <sup>311</sup> ve mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarında meydana gelecek bozuklukların <sup>312</sup> gerçekleşmesi yoluyla piroptoz düzenlenmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

#### **2.3.2.4.4. Ferroptoz**

Ferroptoz, hücre zarı hasarına ve sonucunda hücre ölümüne yol açan, lipid peroksitlerin ve demir kaynaklı oksidatif stres akümüasyonu ile karakterize olan düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidiir <sup>313,314</sup>. Ferroptoz apoptoz, nekroptoz ve piroptoz gibi diğeri hücre ölümü biçimlerinden farklı bir ölüm şeklidiir. Yakın zamana kadar elde edilen sonuçlar mitokondrinin ferroptozun düzenlenmesinde de kritik rol oynadığını göstermektedir.

Mitokondri, kardiyolipin ve fosfatidiletanolamin gibi fosfolipidlerin biyosentezi de dahil olmak üzere lipid metabolizmasında yer alır ve bu fosfolipidler, mitokondriyal bütünlüğü ve işlevi korumak için gereklidir <sup>315</sup>. Kagan ve ark. (2017), mitokondri lokalize fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz 4'ün (GPX4), ferroptoz sırasında biriken ve hücre ölümünü destekleyen lipid hidroperoksitleri azaltarak hücreleri ferroptozdan koruduğunu göstermiştir <sup>316</sup>. Ayrıca mitokondri, hem ve demir-kükürt kümesi biyogenezine katılarak hücrel demir homeostazında önemli rol oynar <sup>317,318</sup>. Mitokondriyal demir metabolizmasının bozulması, ROS üretimini indükleyebilen ve ferroptozu tetikleyebilen sorumlu demirin birikmesine yol açabilir <sup>319,320</sup>. Mitokondriyal demir alımını engellemek veya demir ihracatını teşvik etmek, hücreleri ferroptozdan

koruyabilir <sup>321</sup>. Ayrıca ETZ hedeflenerek veya antioksidan savunma oranı artırılarak mitokondriyal ROS üretimini inhibe etmek hücreleri ferroptozdan koruyabilir <sup>313</sup>. Diğer hücre ölümü çeşitlerinde olduğu gibi mitokondriyal dinamiklerde <sup>322</sup> ve mitokondriyal kontrol mekanizmasında meydana gelen değişiklikler <sup>323</sup> ferroptozu regüle edebilir.

#### **2.3.2.4.5. Diğer Hücre Ölüm Mekanizmaları**

Yukarıda bahsedilen hücre ölüm mekanizmaları dışında mitokondrinin rol aldığı çeşitli hücre ölüm mekanizmaları da bulunmaktadır.

Mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözenekleri (mPTP'ler) selektif olmayan kanallar mitokondriyal iç membranda bulunur <sup>324</sup>. mPTP'nin açılması mitokondriyal depolarizasyona, şişmeye ve dış mitokondriyal zarın yırtılmasına neden olarak hücre ölümüne yol açar <sup>325,326</sup>.

Tip II programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan otofajik hücre ölümü, otofajik vakuollerin birikmesi ve lizozomlar içindeki hücresel bileşenlerin bozulması ile karakterize edilir <sup>327,328</sup>. Otofaji öncelikle hayatta kalma yanlısı bir mekanizma olarak işlev görürken, aşırı veya kontrolsüz otofaji hücre ölümüyle sonuçlanabilir <sup>329</sup>. Mitokondri, hasarlı veya işlevsiz mitokondrinin mitofaji ile seçici olarak yok edilmesi yoluyla otofajik hücre ölümünde rol oynar <sup>330</sup>. Mitofajinin bozulması, işlevsiz mitokondri birikimine ve otofajik hücre ölümünü tetikleyebilecek hücresel stresin artmasına neden olabilir <sup>330,331</sup>.

Partanatoz apoptoz, nekroptoz ve ferroptoz gibi diğer hücre ölümü yöntemlerinden farklı olan düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir. Poli(ADP-riboz) polimeraz-1'in hiperaktivasyonu ve ardından poli(ADP-riboz) polimerlerinin birikmesi ile karakterize edilir ve bu da mitokondriden apoptozu indükleyen faktörün (AIF) salınmasına ve müteakip DNA parçalanması yol açar <sup>332</sup>. Mitokondriyal metabolizmada meydana gelen değişikliklerin partanatozu regüle ettiği gösterilmiştir <sup>333</sup>.

Okseiptoz oksidatif stres tarafından tetiklenen ve apoptoz, nekroz ve ferroptozdan farklı olan bir düzenlenmiş hücre ölümü şeklidir <sup>334,335</sup>. Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (KEAP-1) hücre içinde bulunan temel ROS sensörlerinden biri olup <sup>336</sup> fizyolojik koşullar altında sitoprotektif genlerin ekspresyonunu pozitif yönde düzenleyen bir olan transkripsiyon faktörü nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'yi (NRF2) ubikutinleyerek yıkımına sebep olur <sup>337</sup>. Artan ROS miktarı sonunda ise KEAP-1 C-

terminalinden okside olur ve bunun sonunda NRF2 konformasyon değiştirerek KEAP-1'den ayrılır, çekirdeğe lokalize olarak antioksidan faktörlerin ekspresyonlarında artışa sebep olur <sup>338-341</sup>. KEAP-1, NRF2 ve mitokondriyal bir serin-treonin fosfataz olan PGAM5 ile kompleks oluşturduğu ve toksik ROS miktarlarında KEAP-1-PGAM5 arasındaki etkileşimin azaldığı ve hücre ölümünün arttığı bildirilmiştir <sup>334</sup>.

### **2.3.3. Mitokondriyal Dinamikler**

Mitokondriyal dinamikler, hücre içinde mitokondrinin sürekli füzyonunu ve fisyonunu içeren karmaşık ve sıkı bir şekilde düzenlenen bir süreçtir <sup>342</sup>. Füzyon, iki ayrı mitokondrinin tek bir mitokondri olarak birleştiği, fisyon ise tek bir mitokondrinin iki veya daha fazla küçük mitokondriye bölündüğü süreçtir <sup>342,343</sup>. Bu olaylar mitokondriyal bütünlüğün, işlevin ve hücreler içindeki dağılımın sürdürülmesi için gerekli olup hücrel homeostaz, enerji üretimi ve hücre sağkalımı için kritik öneme sahiptir <sup>344</sup>.

#### **2.3.3.1. Mitokondriyal Füzyon ve Fisyon**

Mitokondriyal füzyon ve fisyon, mitokondriyal işlevin düzgün olmasını ve hücrel homeostazı sürdürmek için mitokondriyal ağı sürekli olarak yeniden şekillendiren dinamik süreçlerdir <sup>345,346</sup>. Füzyon, mitokondriyal bileşenlerin değişimine izin vererek mitokondrilerde fonksiyonel olarak tamamlanmayı ve mitokondriyal genomun korunmasını sağlarken, fizyon hasarlı mitokondriyi ayırır ve mitofaji yoluyla bunların parçalanmasını kolaylaştırır <sup>347-349</sup>.

##### **2.3.3.1.1. Mitokondriyal Füzyonun Düzenlenmesi**

Mitokondriyal dış ve iç zarlarda bulunan spesifik proteinler mitokondriyal füzyona aracılık eder. Bunlardan mitofusin ve mitofusin 2 (Mfn1 ve Mfn2), dış mitokondriyal zarın füzyonuna aracılık etmekten sorumlu iki büyük guanozin trifosfataz (GTPaz) proteindir <sup>294,350</sup>. Bu proteinler, C-terminal transmembran alanları ile dış zara bağlanır ve bitişik mitokondriler arasında homo- veya hetero-oligomerik kompleksler oluşturur <sup>294</sup>. Mitofusinlere GTP bağlanması oligomerik kompleksler oluşturmasını sağlayarak bitişik mitokondrilerin dış mitokondriyal zarlarını birbirine yakın hale getirir, ardından gerçekleşen GTP hidrolizi mitofusinlerde membran birleşmesini destekleyen konformasyonel bir değişikliği tetikler <sup>351</sup>.

İç mitokondriyal zarın füzyonu dinaminle ilişkili GTPaz optik atrofi 1 (OPA1) proteini tarafından yürütülür. OPA1, alternatif ekleme ve proteolitik işleme ile üretilen

uzun ve kısa izoformlar olmak üzere iki biçimde bulunur<sup>352,353</sup>. Uzun izoformlar iç zara sabitlenirken, kısa izoformlar zarlar arası boşlukta bulunur<sup>354,355</sup>. Ayrıca OPA1, mitokondride kardiyolipin ile etkileşime girerek füzyon sürecini kolaylaştırır<sup>356</sup>. Ek olarak OPA1, elektron taşıma zincirinin düzgün çalışması ve ATP üretimi için gerekli olan krista yapısının korunmasında rol oynar<sup>357</sup>.

Mitofusinlerin aktivite, stabilite ve lokalizasyonu fosforilasyon<sup>358</sup>, ubiquitinlenme<sup>359,360</sup> ve SUMOlanma<sup>361</sup> dahil olmak üzere çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar modüle edilir ve füzyon sürecini düzenlenir. OPA1 ise proteolitik kesilme ile farklı izoformlar oluşmasına sebep olarak aktivitesini düzenler<sup>362,363</sup>. Bunların yanında mitokondriyal füzyon, MAPK, PI3K/Akt, Myc<sup>364</sup> ve AMPK/PGC-1 $\alpha$ /SIRT1<sup>365</sup> gibi çeşitli yollardan gelen sinyallerle düzenlenir.

#### **2.3.3.1.2. Mitokondriyal Fisyonun Düzenlenmesi**

GTPazlar ve adaptör proteinler dahil olmak üzere çeşitli proteinler mitokondriyal fisyon sürecinin koordinasyonunda rol alır. Bu proteinlerden biri, dinamin GTPaz protein ailesinin bir üyesi olan dinaminle ilişkili protein 1 (Drp1), mitokondriyal fisyonunda merkezi rol oynar<sup>366</sup>. Drp1, bir N-terminal GTPaz, bir orta ve bir C-terminal GTPaz efektör alandan oluşan bir sitozolik protein olup mitokondriyal dış zarın etrafını saran halka benzeri oligomerler oluşturarak daha yüksek sıralı yapılar oluşturabilir<sup>366</sup>. Drp1 ERK1/2<sup>367</sup>, A-kinaz çapalayıcı protein<sup>368</sup>, fisyon proteini 1<sup>369</sup>, mitokondriyal dinamik proteinleri 49 ve 51<sup>370</sup> ve mitokondriyal fisyon faktörü<sup>371</sup> gibi çeşitli faktörlerle etkileşerek dış mitokondriyal zara transloke olur. Mitokondriyal yüzeye transloke olmasından sonra Drp1, mitokondri etrafındaki oligomerik halka ile birleşir<sup>372</sup>. Drp1'in GTPaz alanı içinde gerçekleşen GTP hidrolizi sonrasında Drp1 konformasyonel bir değişikliğe uğrayarak mitokondriyal zarı daraltır ve fisyonun gerçekleşmesine yol açar<sup>373,374</sup>.

Fisyon da füzyona benzer şekilde çeşitli hücrel faktörler tarafından düzenlenir. Bunlardan biri ER ve mitokondrinin, mitokondri ile ilişkili zarlar adı verilen temas bölgelerinde fiziksel olarak etkileşime girmesi sonucu Drp1'in mitokondriyal yüzeye alınmasını kolaylaştırır ve bu olay mitokondriyal fisyonun regülasyonunda rol oynar<sup>375</sup>. Artan sitozolik Ca<sup>2+</sup> seviyeleri ise Drp1 aktivasyonunu ve mitokondri üzerine yerleşimini teşvik edebilir<sup>376,377</sup>. Bunun yanında mitokondri ilişkili zarlar üzerinden ER'den mitokondriye Ca<sup>2+</sup> akışı da mitokondriyal fisyonu modüle eder<sup>378,379</sup>. AMPK<sup>380,381</sup>, ROS

<sup>382</sup>, MAPK yolağı <sup>383</sup> yolları ile etkileşime girerek ve SUMOlanma <sup>384</sup> ve S-nitrosilasyon <sup>385</sup> gibi çeşitli post-translasyonel modifikasyonlarla mitokondriyal fisyon düzenlenebilir.

#### **2.3.3.1.3. Mitokondriyal Fisyon ve Füzyon Arasındaki İlişki**

Mitokondriyal füzyon ve fisyon arasındaki etkileşim, mitokondriyal bileşenlerin dağılımını düzenleyen, mitokondriyal DNA değişimini kolaylaştıran ve hasarlı mitokondrilerin onarımını ve eliminasyonunu sağlayan, mitokondriyal homeostazın ve işlevin sürdürülmesi için gerekli, oldukça dinamik ve birbirine sıkı bir şekilde bağlı süreçtir <sup>386-388</sup>.

Füzyon ve fisyon süreçleri ve düzenlenme mekanizmaları birbiriyle bağlantılıdır. Örneğin, Mfn1'in E3 ubiquitin ligaz Parkin tarafından ubiquitinlenmesi füzyonu inhibe ederek ve fisyonu indükleyerek mitokondrinin degrades olmasına sebep olur <sup>389</sup>. Buna karşın, Parkin ayrıca Drp1'i ubiquitinleyerek degradasyonunu indükler ve mitokondriyal fisyonu sınırlar <sup>390</sup>. Hücrel enerji ihtiyacı ve çevreden gelen çeşitli sinyaller de füzyon ve fisyon arasındaki etkileşimi modüle etmede önemli rol oynar. Örneğin, uzayan hücrel stres mitofajiyi kolaylaştırmak ve hasarlı mitokondriyi parçalamak için mitokondriyal fisyonda bir artışa yol açabilir <sup>391</sup>. Buna karşın, otofajik aktivitedeki artışın mitokondriyal uzamaya ve fisyonda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir <sup>392</sup>. Hücre döngüsü ve farklılaşma sürecindeki durumlar da mitokondriyal fisyon sürecini düzenlemektedir. Mitoz sırasında, bölünen hücreye yeterli mitokondri aktarılmasının sağlanması için fisyon artarken <sup>393</sup> farklılaşan hücrelerde, hücrenin ihtiyacı olan enerjiyi sağlayabilmek için hücre tipine göre farklı adaptasyonlar görülür <sup>394-396</sup>.

#### **2.3.3.2. Mitokondriyal Kalite Kontrol**

Mitokondriyal kalite kontrol, hücrel homeostazın ve genel sağlığın korunmasında kritik bir süreçtir olup organelin düzgün çalışmasını sağlamak için mitokondriyal biyogenez, otofajiyi, katlanmamış protein yanıtı gibi çeşitli mekanizmaları kapsamaktadır <sup>397,398</sup>.

##### **2.3.3.2.1. Mitokondriyal Biyogenez**

Mitokondriyal biyogenez hücre içinde yeni mitokondri oluşumunu tetikler ve uygun mitokondriyal fonksiyonu ve hücrel enerji beslemesini sürdürmek için gereklidir

<sup>399</sup>. Mitokondriyal biyogenez, çeşitli transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolları tarafından düzenlenir.

PGC-1 $\alpha$  mitokondriyal biyojenezin ana düzenleyicisidir. Nükleer olarak kodlanmış mitokondriyal genlerin ekspresyonunu indüklemek için nükleer solunum faktörleri 1 ve 2 (NRF1 ve NRF2) ve östrojenle ilişkili reseptörler (ERR'ler) dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerinin koaktivatörüdür <sup>400</sup>. NRF1 ve NRF2, oksidatif fosforilasyon, mitokondriyal DNA (mtDNA) replikasyonu ve transkripsiyonda yer alan nükleer olarak kodlanan mitokondriyal genlerin promotör bölgelerine bağlanan transkripsiyon faktörleridir <sup>401</sup>. Ayrıca mtDNA'nın korunması ve ifadesi için gerekli olan mitokondriyal transkripsiyon faktörü A'nın (TFAM) ifadesini de indüklerler <sup>402</sup>.

AMPK ve sirtuinler, hücrel enerji seviyelerindeki değişikliklere yanıt olarak mitokondriyal biyojenezi düzenleyen önemli hücrel enerji sensörleridir. Düşük enerji seviyelerine yanıt olarak AMPK'nin aktivasyonu, PGC-1 $\alpha$ 'nın fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açarak mitokondriyal biyogenezini teşvik eder <sup>402</sup>. Sirtuinler, özellikle SIRT1, PGC-1 $\alpha$  aktivitesini deasetilasyon yoluyla modüle ederek mitokondriyal genlerin koaktivasyonunu artırır <sup>254</sup>. mTOR sinyal yolağı hücre büyümesi ve metabolizmasının ana düzenleyicilerinden biridir. Besin açısından zengin koşullar altında mTOR, PGC-1 $\alpha$  transkripsiyonel aktivitesini baskılayarak mitokondriyal biyojenezi inhibe eder <sup>403</sup>. Tersine, besin bakımından fakir koşullar altında mTOR sinyalinin inhibisyonu, mitokondriyal biyojenezi teşvik eder <sup>404</sup>.

Hem oksijenaz-1 (HO-1) ve Keap1-Nrf2 yolu (burada Keap1 çok önemli bir bileşendir), çeşitli hücrel bileşenlere zararlı olabilecek bir durum olan oksidatif strese karşı hücrel savunmanın parçalarıdır.

### **2.3.3.2.2. Mitofaji**

Mitokondriyal kalite kontrolünün sürdürülmesindeki kilit mekanizmalardan biri, otofaji-lizozomal yolak aracılığıyla hasarlı veya işlevsiz mitokondrinin seçici olarak parçalanması olan mitofajidir <sup>330</sup>. Mitofaji, hücrel homeostazın korunmasında ROS üretebilen ve hücre ölümüne katkıda bulunabilen hasarlı mitokondri birikimini önlemede çok önemli bir rol oynar <sup>405</sup>.

Mitofaji sürecinde detaylı bir şekilde karakterize edilmiş bir yolak fosfataz ve tensin homologu (PTEN) ile indüklenen kinaz 1 (PINK1)-Parkin yolağıdır. Sağlıklı

mitokondride, PINK1 iç mitokondri membrana aktarılır ve parçalanır <sup>406</sup> ancak mitokondriyal hasar veya depolarizasyon sonucunda PINK1, dış mitokondriyal zar da birikir ve E3 ubikuitin ligaz Parkin ile etkileşime girer <sup>407</sup>. Parkin, hasarlı mitokondrinin otofagozom tarafından yutulmasını ve ardından lizozomlar tarafından bozunmasını kolaylaştırmak için sırasıyla p62/SQSTM1, NDP52 ve OPTN gibi otofaji reseptörlerini çağırarak dış mitokondriyal membran proteinlerini ubikuitinler <sup>407</sup>.

BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa protein etkileşimli protein 3 (BNIP3) ve BNIP3L olarak da bilinen NIX dış mitokondriyal membranda lokalize olan ve PINK1-Parkin yolundan bağımsız olarak mitofajiyi indükleyebilen proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleridir <sup>408</sup>. Bu iki protein, otofagozomla ilişkili protein LC3'e bağlanan LC3 etkileşimli bölge (LIR) motifleri aracılığıyla otofaji mekanizmasıyla doğrudan etkileşime girerek mitofajiyi teşvik eder <sup>409</sup>.

FUN14 alan içeren 1 (FUNDC1), hipoksi kaynaklı mitofaji için bir reseptör görevi gören bir dış mitokondriyal membran proteinidir. Hipoksik koşullar altında FUNDC1, fosfoglisarat mutaz ailesi üyesi 5 tarafından fosforillenir ve daha sonra mitofajiyi indüklemek için otofagozomlar üzerinde LC3'e bağlanır <sup>410,411</sup>. Bu süreç, hasarlı mitokondriyi seçici olarak ortadan kaldırır ve hipoksi koşullarında hücrel enerji homeostazının korunmasına yardımcı olur <sup>410,411</sup>.

Kardiyolipin iç mitokondriyal zar da bulunan bir fosfolipiddir ve mitokondriyal hasar üzerine, doğrudan LC3'e bağlandığı dış mitokondriyal zar a lokalize hale gelir ve hasarlı mitokondrinin otofagozom tarafından yutulmasını ve mitofajiyi kolaylaştırır <sup>412</sup>.

### **2.3.3.2.3. Mitofakondriyal Katlanmamış Protein Yanıtı**

Mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı (UPR<sup>mt</sup>), mitokondri içindeki proteostazı koruyarak mitokondriyal kalite kontrolünde çok önemli bir rol oynayan bir stres yanıtı yolağıdır. UPR<sup>mt</sup> artan ROS, mitokondriyal DNA mutasyonları veya mitokondriyal protein taşınımındaki kusurlar dahil olmak üzere çeşitli stres koşullarından kaynaklanabilecek mitokondriyal matriste yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesine yanıt olarak etkinleştirilir <sup>413</sup>. Bu yolak, mitokondriyal şaperonların ve proteazların ekspresyonunu arttırma yönünde düzenleyerek, uygun protein katlanmasını ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını destekleyerek protein homeostazını eski haline getirmeyi amaçlar <sup>414</sup>.

## 2.4. Rotenon

Rotenone, başta *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* ve *Mundulea* türlerinde olmak üzere birçok bitki türünün köklerinde, tohumlarında ve gövdelerinde bulunan doğal bir bileşiktir <sup>415</sup>. Çeşitli organizmalar üzerindeki toksik etkilerinden dolayı geniş spektrumlu bir insektisit, pisisit (balık zehiri) ve pestisit olarak kullanılmıştır <sup>415</sup>.

Kompleks I, elektronları NADH'den ubikinona (koenzim Q) transfer etmekten sorumlu olan ve ETZ'deki ilk ve en büyük enzim kompleksidir <sup>416,417</sup>. Rotenon, kompleks I'in ubikinon bağlama bölgesine bağlanarak elektron transferini inhibe eder ve elektronların ETZ'de akışını bozar <sup>191</sup>. Bu inhibisyon, oksidatif fosforilasyon daha az verimli hale geldikçe ATP üretiminin azalmasına neden olur <sup>416,417</sup>. Kompleks I'in rotenon ile inhibisyonu ROS, özellikle de süperoksit anyonlarının üretiminin artmasına yol açar. Bu ROS, oksidatif strese neden olarak ve lipitler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere hücresel bileşenlere zarar verebilir ve sonunda hücre ölümüne yol açabilir <sup>416,417</sup>. Bunun yanında rotenon kaynaklı mitokondriyal disfonksiyon, koruyucu bir yanıt olarak otofaji ve mitofajinin aktivasyonunu tetikleyebilir <sup>418</sup>. Ayrıca bu süreçlerin aşırı veya uzun süreli aktivasyonu da hücre ölümüne katkıda bulunabilir <sup>419</sup>.

## 2.5. FAM163A

Günümüzde genomik ve proteomik çalışmalarda oldukça fazla ilerleme katedilmesine rağmen birçok proteinin fonksiyonu hala bilinmemektedir <sup>420,421</sup>. Bu proteinlerin fonksiyonlarının ortaya çıkartılması sonucunda yalnızca fizyolojik ve patofizyolojik rolleri aydınlatılmayacak, ilaç geliştirme ve hassas tıp alanlarında da fırsatlar yaratacaktır <sup>420</sup>.

Translasyonel onkoloji çalışmalarında biyobelirteç belirlemek, hastalığın tanısı ve tedavisi için büyük önem taşımaktadır <sup>422</sup> ve bu amaçla yapılan bir çalışmada, iyi prognozlu disemine nöroblastoma ve kötü prognozlu disemine nöroblastomayı karşılaştırmak amacıyla yapılan komplementer DNA (cDNA) mikrodizin çalışması sonucunda yüksek riskli örnekte altı kat artışı gözlemlenirken, düşük riskli örnekte bir kat azalma gözlemlenmiştir <sup>10</sup>. Elde edilen ETS'nin 504 bazlık bir açık okuma bölgesine karşılık geldiği ve 167 amino asitlik bir protein kodladığı belirtilmiştir <sup>10</sup>. Aday proteinin (nöroblastoma-kaynaklı salgı proteini; NDSP; FAM163A) geninin (NPDS; FAM163A) lokusu kromozom 1q25.2 olarak belirlenmiştir <sup>10,11</sup>. Bunun yanında, NDSP'nin, yüksek oranda korunmuş ve %80'den fazla protein homolojisi taşıyan 168 amino asitlik fare



yapılan bir çalışmada, gelişmiş ve gelişmemiş olan blastosist ve oositler ile gelişmemiş olan blastosist ve oositlere mikroyenjeksiyonla mitokondriyal DNA verilmesi sonucunda *FAM163A* gen ifadesinde farklılıklar gözlemlenmiştir <sup>15</sup>. 2018 yılında Ronci ve arkadaşları, genomda kodlanan, ancak kütle spektrometrisi (MS) ve doğrulanmış antikorlarla bile belirlenemeyen proteinleri (kayıp proteinler) mitokondri proteomunda araştırdıkları çalışmada, fenotipik olarak birbirinden farklı beş hücre hattında mitokondri izolasyonu ve zenginleştirilmesi yaparak proteomik analiz gerçekleştirmişlerdir <sup>16</sup>. Yaptıkları çalışmanın sonucunda, *FAM163A* proteininin özellikle SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında ifade edildiğini belirtmiş ve bu proteininin mitokondri proteomunda bulunduğunu göstermişlerdir <sup>16</sup>. 2019 yılında skuamöz hücre akciğer kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmada ise, *FAM163A*'nın hücre proliferasyonunu ERK/P90RSK sinyal yolağını aktive ederek arttırdığı gösterilmiştir <sup>17</sup>. Bunun yanında 2022 yılında yapılan bir çalışmada RNA sekanslama ve kromatin immünöktürme sekanslama sonuçlarında *FAM163A*'nın süper güçlendiriciler tarafından ifadesinin anormal düzeyde artırıldığını belirterek nöroblastoma oluşumu ve gelişiminde önemli rolü olduğu ifade edilmiştir <sup>424</sup>.

## **2.6. Hipotalamik Mitokondriyal Dinamikler, Besin Alımı ve *FAM163A***

Hipotalamik mitokondrilerin enerji dengesi modülasyonunda mitokondriyal dinamikler sayesinde görev aldığı ve AgRP ve POMC nöron aktivitelerini modüle ettiği belirtilmiştir <sup>8,9</sup>. Mitokondriyal dinamikler ARC'de bulunan melanokortin nöronlarında farklı koşullarda değişmektedir. Oreksijenik AgRP nöronlarında negatif enerji dengesi durumunda mitokondriyal fizyon görülürken, yüksek yağlı diyet gibi pozitif enerji dengesi durumunda mitokondriyal dansite ve kapladığı alan azalır, yani mitokondriyal füzyon görülür <sup>425</sup>. AgRP nöronlarında olanın tam aksine ise, anoreksijenik POMC nöronlarında tokluk durumunda mitokondriyal fizyon görülür ve bu da artan oksidatif stres ile ilişkili olup yüksek yağlı beslenme durumunda mitokondri-endoplazmik retikulum arasındaki bağlantıyı azalmaktadır <sup>425</sup>. Ayrıca hipotalamik mitokondriyal disfonksiyonun anoreksiya ile de ilişkili olduğu belirtilmiştir <sup>426</sup>.

Bu zamana kadar gerçekleştirilen çalışmalarda *FAM163A*'nın lokalizasyonu ve hücresel fonksiyonunun ne olduğu tam olarak açıklanamamıştır. Proteinin mitokondriyal lokalizasyonunun bildirilmiş olması <sup>16</sup>, *FAM163A*'nın mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızın

amacı rotenon kaynaklı mitokondriyal hasarın ve shRNA uygulaması sonrası hipotalamik FAM163A ifadesindeki azalmanın besin alımı ve mitokondriyal dinamikler üzerine olan etkilerini incelemektir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Deney Hayvanları, Transgenik Hayvan Üretim Stratejisi ve Genotipleme

Bu tez çalışmasında 28 adet yabancı tip erkek C57BL/6 ve 25 adet transgenik erkek AgRP-Ires-Cre (Jax. Lab. #012899) fare kullanılmıştır. Hayvanların üretimi Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (YÜDETAM) gerçekleştirildi ve hayvanlar kontrollü çevresel şartlara sahip ( $21\pm1^{\circ}\text{C}$  oda ısısı ve 12 saat:12 saat aydınlık-karanlık) ortamda tutuldu.

Transgenik AgRP-Ires-Cre (Jax. Lab. #012899) fare hattı Jackson Laboratuvarı'ndan (Amerika Birleşik Devletleri) 1 erkek ve 1 dişi fare olacak şekilde satın alındı. Firmanın üretim önerilerine uygun olarak hayvanlar homozigot x homozigot olarak çiftleşmeye alındı. Çiftleşme sonucu elde edilen yavruların laktasyon döneminin sonlanması beklenerek postnatal 22. günde aynı cinsiyetteki hayvanlar aynı kafeste olacak şekilde kafeslere ayrıldı. Yavruların küpelenerek kimliklendirilmesinin ardından genotipleme için kulak dokusu örneği alındı. Kulak dokuları 25 mM NaOH/0,2 mM EDTA alkali lizis tamponunda  $98^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakika inkübe edildi ve inkübasyon periyodunun sonunda reaksiyon 40 mM Tris-HCl solüsyonu ile nötralize edildi. 4000 rpm'de 3 dakikalık santrifüj ardından elde edilen DNA örnekleri temiz tüplere aktarıldı.

Elde edilen DNA örneklerinin üzerine polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) karışımı (1X tampon çözeltisi, iç pozitif kontrol geri primeri (0,5  $\mu\text{M}$ ) / transgenik geri primeri (0,5  $\mu\text{M}$ ), ortak primer (0,5  $\mu\text{M}$ ), dNTP karışımı (200  $\mu\text{M}$ ), Taq Polimeraz (1,25 U/50 PCR)) eklendi. Genotiplerede kullanılan primerlerin dizileri Tablo 1'de belirtilmiştir. PZR reaksiyonu

Tablo 2'de belirtilen döngü sıralamasıyla Multigene Optimax (TC9610) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

**Tablo 1.** Genotiplerede kullanılan primer dizileri.

| Primer                  | Dizi (5'→3')             |
|-------------------------|--------------------------|
| Ortak                   | GAAAAGATAAGGCCTTCAAGTGCT |
| İç pozitif kontrol geri | GATCTTTCTGCACTATCTTCCTTC |

**Tablo 2.** PCR döngüleri.

| Döngü sayısı | Sıcaklık (°C) | Süre (sn) |
|--------------|---------------|-----------|
| 1            | 95            | 30        |
| 38           | 95            | 30        |
| 38           | 60            | 30        |
| 38           | 68            | 60        |
| 1            | 68            | 300       |

PCR reaksiyonu sonlandığında örnekler %2'lik agaroz jele (1 X Tris-Borik asit-EDTA (40 mM Tris-Cl, 45 mM borik asit, 1 mM EDTA)) yüklendi ve elektroforez işlemi (120 volt, 25 dakika) uygulandı. Elektroforez sonrası jel görüntülemesi ultraviyole transillüminatör (ChemiDoc XRS+, BioRad) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Deney setlerindeki tüm fareler, besin tüketimi takibi deneylerine kadar standart kemirgen yemi ve suya *ad libitum* erişime sahip olacak şekilde barındırıldı.

### 3.2. Stereotaktik Cerrahi ve İntrakraniyal Enjeksiyonlar

Enjeksiyonlar stereotaksi cihazı (David Kopf) kullanılarak gerçekleştirildi. Enjeksiyon uygulaması yapılacak hayvanlar düşük doz izofluran kullanılarak sedasyona alındı ve stereotaksi cihazına yerleştirildi. Operasyon süresince hayvanlar sabit 37°C sıcaklıkta sıcaklık veren taban ısıtması üzerinde tutuldu. Farelerin stereotaksi cihazına kulak barları ile sabitlenmesini takiben, operasyon sırasındaki derin anestezi %1,5-2 izofluran ve solunabilir oksijen karışımı ile sağlandı. Derin anesteziye ulaşılma durumu ayak kıstırma refleksinin kaybolmasıyla doğrulandı. Ortam ışığından zarar görmemeleri amacıyla farelerin gözlerine tobramisin etken maddeli ajanlar uygulandı.

Anesteziye alınan farelerin kafa tüyleri traşlandıktan sonra kafa derisine önden arkaya doğru yaklaşım 1 cm uzunluğunda insizyon uygulandı. Bregma-Lambda noktalarının netleştirilmesi için kafatasına H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. Hayvanların Bregma-Lambda arası mesafelere göre çok küçük farklılıklar göstermekte olup ARC bölgesi hedeflenerek (posterior: 1,38 mm, lateral: ±0,38 mm ve vertikal: 5,82 mm) enjeksiyonlar gerçekleştirildi. Mikro pipetlerin (Drummond Scientific, Wiretrol,

Broomall-PA) uçları, pipet çekme cihazı (Narishige, Japonya) 50 µm olacak şekilde inceltildi. Bir diş hekimi drill'i (1,4 mm çapında) belirlenen koordinatlarda çift taraflı kranyotomi uygulandı. Bilateral olarak ARC bölgesine intrakraniyal olarak 300-400 nL virüs veya 100 nL kimyasal enjekte edildi ve her enjeksiyon sonrası ajanın difüzyonu için 10 dakika pipet beyin bölgesinde tutuldu. Pipetin beyinden çıkarılmasının ardından beyin dokusu, kafatası ve kafa derisi ringer solüsyonuyla yıkandı, 5.0 ipek cerrahi iplikle kafa derisi süturu sağlandı ve cerrahi alan povidon iyot ile temizlendi. Enjeksiyonlar sonrasında hayvanlar iki haftalık derlenme periyoduna alındı. Derlenme periyodu sonrası hayvanlar deney gruplarına göre kafeslere ayrıldı. Çalışma, amaçları doğrultusunda (ARC'de FAM163A gen sessizleştirilmesinin ve mitokondriyal disfonksiyonun etkilerinin araştırılması) iki farklı deney setine ayrıldı. Bunlardan ilk iki grup rotenon ve rotenonun çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO) grubuydu. İkinci ikili grup ise kontrol shRNA verilen grup ve FAM163A shRNA verilen gruptu.

### **3.2.1. Yabanıl Tip Hayvanların Enjeksiyonları**

Toplam 28 C57BL/6 fare her grupta yedi hayvan olacak şekilde şu şekilde dört gruba ayrıldı: DMSO grubu (Grup 1), Rotenon grubu (Grup 2), Kontrol shRNA grubu (Grup 3) ve Fam163a shRNA uygulanan *Fam163a* KD grubu (Grup 4). Her gruba ARC bölgesi hedeflenerek enjeksiyonlar gerçekleştirildi. Grup 1'de bulunan hayvanlara intrakraniyal olarak rotenonun çözücüsü olan DMSO (Sigma, D8418) enjeksiyonu yapılırken Grup 2'de bulunan hayvanlara intrakraniyal olarak 50 mM rotenon (Cayman Chemical Company, 13995) uygulaması yapıldı. Grup 3 hayvanlara intrakraniyal olarak kontrol shRNA lentiviral parçacık (Santa Cruz Biotechnology, sc-108080) enjeksiyonu yapılırken Grup 4'te bulunan hayvanlara *Fam163a* shRNA (m) lentiviral parçacık (Santa Cruz Biotechnology, sc-140624-V) enjeksiyonu yapıldı. Hayvanlar iki haftalık derlenme periyodunun ardından uygulamaların besin tüketimine etkilerini incelemek amacıyla her kafeste tek hayvan olacak şekilde kafeslere yerleştirildi.

### **3.2.2. Transgenik Hayvanların Enjeksiyonları**

Toplam 20 transgenik AgRP-Ires-Cre her grupta beş hayvan olacak şekilde dört farklı gruba ayrıldı: DMSO grubu (Grup 1), Rotenon grubu (Grup 2), Kontrol shRNA grubu (Grup 3) ve Fam163a shRNA uygulanan *Fam163a* KD grubu (Grup 4). Grup 1'de bulunan hayvanlara intrakraniyal olarak rotenonun çözücüsü olan DMSO (Sigma,

D8418) enjeksiyonu yapılırken Grup 2’de bulunan hayvanlara intrakraniyal olarak 50 mM rotenon (Cayman Chemical Company, 13995) uygulaması yapıldı. Grup 3 hayvanlara intrakraniyal olarak kontrol shRNA lentiviral parçacık (Santa Cruz Biotechnology, sc-108080) enjeksiyonu yapılırken Grup 4’te bulunan hayvanlara *Fam163a* shRNA (m) lentiviral parçacık (Santa Cruz Biotechnology, sc-140624-V) enjeksiyonu yapıldı. Her hayvana ilgili enjeksiyon ile aynı anda AAV pCAG-FLEX-EGFP-WPRE (AddGene) enjeksiyonu gerçekleştirilerek AgRP nöronlarının işaretlenerek yeşil floresan proteini (GFP) eksprese etmeleri sağlandı. Hayvanlar iki haftalık derlenme periyodunun ardından uygulamaların ardından 25 gün boyunca her kafeste tek hayvan olacak şekilde barındırıldı. Ardından her gruptan üç hayvan elektrofizyoloji deneyleri için, ikişer hayvan da konfokal mikroskopi deneyleri için kullanıldı.

### **3.3. Besin Tüketimi ve Vücut Ağırlığı Takibi**

Hayvanlar her kafeste tek hayvan olacak şekilde pleksiglas kafeslere alındı. Üç günlük kafese alışma döneminden sonra hem yabanıl tip hayvanların hem de transgenik hayvanların 25 gün boyunca besin tüketimi takip edildi. Temel olarak her gün aynı saatler arasında (09:00-10:00) hayvanların yem tüketimleri önceki günden eklenen yemlerden ertesi gün kafeste kalan yemlerin miktarları tartılarak iki ardışık gün arasındaki fark alınarak belirlendi. Her gün kalan yemlerin tartımının ardından kafes tabanı temizlendi ve taze yem tartılarak kafeslere yerleştirildi. Hayvanların vücut ağırlık takipleri her iki günde bir hayvanların tartılmasıyla gerçekleştirildi.

### **3.4. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması ve Elektrofizyolojik Kayıtlar**

Transgenik AgRP-Ires-Cre hayvanlara anestezi altında soğuk kesme çözeltisiyle (92 mM NMDG, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaHPO<sub>4</sub>, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM HEPES, 25 mM Glukoz, 2 mM Tiyoüre, 5mM Na-askorbat, 3 mM Na-piruvat, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ve 10 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) transkardiyak perfüzyon uygulandı ve beyin diseksiyonu gerçekleştirildi. Ardından beyinler hızlı bir şekilde vibratom kullanılarak (Campden Instruments 5100 mz) ARC bölgesini içeren 250 µm kalınlığında kesitler elde edildi. Ardından kesitler yapay beyin-omurilik sıvısı (aCSF; 92 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM HEPES, 25 mM Glukoz, 2 mM Tiyoüre, 5mM Na-askorbat, 3 mM Na-piruvat, 2 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ve 2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) çözeltisine aktarıldı ve en az bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Beyin kesitlerinin alınması ve

aCSF içinde inkübasyonu sırasında çözeltiler %95 O<sub>2</sub> / %5 CO<sub>2</sub> gaz karışımı ile gazlandı. İnkübasyon periyodunun ardından kayıt çözeltisi (124 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 12,5 mM Glukoz, 5 mM HEPES, 2 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ve 2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) ile perfüzyonu sağlanan elektrofizyoloji banyosuna kesitler aktarıldı.

Kesitlerin elektrofizyoloji sisteminin (MultiClamp 700B Axon CNS) banyosuna transfer edilmesinden sonra GFP ile işaretlenmiş olan AgRP nöronlarından gevşek yama kayıtları alındı. Her bir kesitten en az 15-20 nörondan, her bir hayvana en az üç kesitten ve her bir grupta bulunan üç hayvandan elektrofizyolojik kayıtlar alındı. Yapılan uygulamaların AgRP nöronlarının ateşleme frekansına olan etkileri Clampfit 10.7 (Molecular Devices) programı ile analiz edildi.

### **3.5. Davranış Testleri**

Uygulamaların lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışlar üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla yabancı tip hayvanlar sırasıyla açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirenti testlerine maruz bırakılmıştır.

#### **3.5.1. Açık Alan Testi**

Açık alan testi kemirgenlerin lokomotor aktiviteleri ve anksiyete benzeri davranışlarının incelenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir <sup>427</sup>. Açık alan testi, çalışmamızda 80 cm x 80 cm x 50 cm (genişlik x derinlik x yükseklik) beyaz polipropilen arenada gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar arenanın merkez noktasına bırakılmış ve hareketleri 10 dakika boyunca kamera ile kaydedilmiştir. Hayvanların merkez bölgede ve periferde geçirdikleri süre, toplam katedilen mesafe ve hızları Ethovision XT 15 (Noldus) sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Her yeni hayvan teste alınmadan önce arena %70'lik etanol ile temizlenmiştir.

#### **3.5.2. Yükseltilmiş Artı Labirenti Testi**

Yükseltilmiş artı labirenti testi kemirgenlerde anksiyete benzeri davranışların değerlendirilmesinde kullanılan bir testtir <sup>428</sup>. Çalışmamızda, yerden 50 cm yükseklikte olan ve 50 cm x 10 cm (uzunluk x genişlik) ölçülerde açık ve kapalı kolları olan beyaz polipropilen artı şeklinde bir labirentte gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar arenanın merkezine görüş açıları açık kolu görecektir şekilde bırakılmış ve hareketleri beş dakika boyunca kamera ile kaydedilmiştir. Hayvanların açık ve kapalı kollarda geçirdikleri süre, kollara giriş sayıları, toplam katettikleri mesafe ve ortalama hızları Ethovision XT 15

(Noldus) sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Her yeni hayvan teste alınmadan önce labirent %70'lik etanol ile temizlenmiştir.

### **3.6. Kan Glukoz ve Serum İnsülin Seviyelerinin Belirlenmesi**

Yabanıl tip hayvanlardan dekapitasyon sırasında kardiyak yolla kan toplandı. Kan glukoz seviyeleri glukometre (Vivacheck Eco) kullanılarak tespit edildi. Toplanan kandan elde edilen serum örnekleri serum insülin seviyeleri belirlenene kadar -80°C'de muhafaza edildi. Serum insülin seviyelerinin belirlenmesinde ise Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA kiti (Mercodia, 10-1249-01) ile üretici tarafından belirtilen protokol takip edilerek belirlendi.

### **3.7. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)**

#### **3.7.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi**

Yabanıl tip hayvanların bir kısmı anestezi altında %0,9'luk NaCl çözeltisi ile transkardiyak yolla perfüze edildi ve beyin diseksiyonu gerçekleştirildi. Ardından beyinler vibratom kullanılarak ARC bölgesini içeren 250 µm kalınlığında kesitler elde edildi. Elde edilen kesitlerden ARC bölgesi diseke edildi ve RNA izolasyonu öncesi -80°C'de muhafaza edildi.

Dokuların üzerine 500 µL TRIzol ve paslanmaz çelik boncuklar (NextAdvance, SSB14B-RNA) eklendikten sonra homojenizatörde (Bullet Blender® Storm 24, NextAdvance) beş dakika süre ile 10. hız kademesinde homojenize edildi. Homojenat ardından 10,000 x G'de iki dakika santrifüj edildi ve RNA içeren üst faz 1,5 mL'lik temiz tüplere aktarıldı. Ardından TRIzol'ün üzerine 500 µL %100 etanol eklenerek karışım solüsyon iyice karıştırıldı. Sonrasında total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti (Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit; Zymo Research, R2072) kullanılarak ve üretici tarafından belirtilen protokol uygulanarak gerçekleştirildi.

Elde edilen RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonları NanoDrop™ 2000 spektrofotometre (Thermo Scientific™, ND-2000) kullanılarak belirlendi. Her RNA örnekten eşit miktarda RNA'dan cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (iScript™ cDNA Synthesis Kit; BioRad, 1708891) kullanılarak ve üretici tarafından belirtilen protokol uygulanarak gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA örnekleri qPCR analizleri için kullanılabilecek kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.7.2. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

*Fam163a* geninin sessizleştirilmesinin doğrulanması ve uygulamaların mitofaji (*Map1lc3a* (LC3), *Parkin*, *Pink1* ve *P62* (SQSTM)) ve mitokondriyal dinamikler (*Pgc-1α*, *Pgc-1β*, *Tfam*, *Nrf1*, *ERRα*, *Ucp2*, *Mfn1*, *Mfn2*, *Keap1* ve *HO-1*) ile ilgili transkriptlerin ifadelerine etkileri qPCR yöntemiyle incelendi. qPCR reaksiyonları Sybr Green temelli reaksiyon karışımı (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, BioRad, 172-5271) kullanılarak InstaQ96 qPCR cihazı (HiMedia) gerçekleştirildi. Reaksiyon başına kullanılan karışımının içeriği Tablo 3'te verilmiştir. Referans gen olarak  $\beta$ -Aktin kullanılmıştır. Primerlerin dizileri



**Tablo 4'**te verilmiştir. qPCR reaksiyon döngüleri **F:** ileri; **R:** Geri

**Tablo 5-7'**de verilmiştir. Her reaksiyon sonrası erime eğrisi oluşturulup primer dimerleşmesi olmadığı gösterilmiştir. Gen ifadelerindeki değişim  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  yöntemiyle hesaplanmış<sup>429</sup> ve kontrol grubuna göre kat değişim olarak ifade edilmiştir.

**Tablo 3.** Bir reaksiyon tüpü için (10  $\mu$ L) qPCR reaksiyon içeriği.

|                           | Hacim ( $\mu$ L) |
|---------------------------|------------------|
| cDNA                      | 1                |
| İleri primer (10 $\mu$ M) | 0,25             |
| Geri primer (10 $\mu$ M)  | 0,25             |
| Master mix (2x)           | 5                |

**Tablo 4.** qPCR deneylerinde kullanılan primerlerin dizileri.

| <b>Primer</b>     | <b>Dizi (5'→3')</b>  | <b>Erişim numarası</b> |
|-------------------|----------------------|------------------------|
| Fam163a_F         | GTCCTGTGCTACTGTAGGCT | NM_177838.3            |
| Fam163a_R         | GGTAAGGGGAGCAAGTGGTA |                        |
| Pgc-1 $\alpha$ _F | AGCCTCTTTGCCCAGATCTT | NM_008904.3            |
| Pgc-1 $\alpha$ _R | GGCAATCCGTCTTCATCCAC |                        |
| Pgc-1 $\beta$ _F  | CCGTATTTGAGGACAGCAGC | NM_133249.3            |
| Pgc-1 $\beta$ _R  | CCTCTGCTCTCACGTCTGAA |                        |
| Tfam_F            | CGGGGAATGTGGAGCGTG   | NM_009360.4            |
| Tfam_R            | CTCCACAGGGCTGCAATTTT |                        |
| ERR $\alpha$ _F   | GTGTGTGGATGGAAGTGCTG | NM_007953.3            |
| ERR $\alpha$ _R   | GCACAGAGTCAGAATTGGCA |                        |
| Ucp2_F            | TTGGCCTCTACGACTCTGTC | BC012697.2             |
| Ucp2_R            | TCCTCTCGTGCAATGGTCTT |                        |
| NRF1_F            | GTCCGCACAGAAGAGCAAAA | BC005410.1             |
| NRF1_R            | CTACTGTTGCCCCTGTACCA |                        |
| Map1lc3a (LC3)_F  | GTTGGTCAAGATCATCCGGC | NM_025735.3            |
| Map1lc3a (LC3)_R  | AAGGTTTCTTGGGAGGCGTA |                        |

|                   |                      |                |
|-------------------|----------------------|----------------|
| SQSTM1 (P62)_F    | GGACAGCCAGAGGAACAGAT | NM_011018.3    |
| SQSTM1 (P62)_R    | GGGAGATGTGGGTATAGGGC |                |
| Parkin_F          | CCTCAGAGGGCTCCATATGG | AF250294.1     |
| Parkin_R          | ACTGAACTCGGAGCTTTCCA |                |
| Pink1_F           | GCTGGAGAGTATGGAGCAGT | NM_026880.2    |
| Pink1_R           | TAACGAGGAACAGTGTGCGA |                |
| Mfn1_F            | ACAAGCTTGCTGTCATTGGG | NM_024200.5    |
| Mfn1_R            | TCGACACTCAGGAAGCAGTT |                |
| Mfn2_F            | CCCTGCTCTTTTCTCGATGC | NM_001285922.1 |
| Mfn2_R            | AGGTACCCTTTGACGTCCAG |                |
| Keap1_F           | CCAGTTGAACAGTGTGGAGC | AB020063.1     |
| Keap1_R           | AGCATTCACACTGTCCAGA  |                |
| Hem oksijenaz-1_F | TTCAGAAGGGTCAGGTGTCC | NM_010442.2    |
| Hem oksijenaz-1_R | CAGTGAGGCCCATACCAGAA |                |
| $\beta$ -Aktin_F  | TGTTACCAACTGGGACGACA | BC138614.1     |
| $\beta$ -Aktin_R  | GGGGTGTGAAGGTCTCAAA  |                |

F: ileri; R: Geri

**Tablo 5.** *Fam163a*, *Pgc1- $\alpha$* , *Pgc1- $\beta$* , *Tfam*, *Ucp2*, *Nrf2* ve *ERR $\alpha$*  için qPCR döngüleri.

| Döngü            | Sıcaklık (°C) | Süre (sn) | Döngü sayısı |
|------------------|---------------|-----------|--------------|
| İlk denatürasyon | 95            | 30        | 1            |
| Denatürasyon     | 95            | 15        |              |
| Tavlanma         | 56            | 20        | 45           |
| Uzama            | 60            | 20        |              |

**Tablo 6.** *LC3*, *P62*, *Parkin*, *Keap1* ve *HO-1* için qPCR döngüleri.

| Döngü            | Sıcaklık (°C) | Süre (sn) | Döngü sayısı |
|------------------|---------------|-----------|--------------|
| İlk denatürasyon | 95            | 30        | 1            |
| Denatürasyon     | 95            | 15        |              |
| Tavlanma         | 51            | 20        | 45           |
| Uzama            | 60            | 20        |              |

**Tablo 7.** *Pink1*, *Mfn1* ve *Mfn2* için qPCR döngüleri.

| Döngü            | Sıcaklık (°C) | Süre (sn) | Döngü sayısı |
|------------------|---------------|-----------|--------------|
| İlk denatürasyon | 95            | 30        | 1            |
| Denatürasyon     | 95            | 15        |              |
| Tavlanma         | 50            | 20        | 45           |
| Uzama            | 60            | 20        |              |

### 3.8. Konfokal Mikroskopi

Hem yabanıl tip hem de transgenik AgRP-Ires-Cre hayvanlardan bir kısmı ilk önce %0,9'luk NaCl çözeltisi, ardından da %4 paraformaldehit (PFA) ile transkardiyak yolla perfüze edildi. Beyin diseksiyonunun ardından tüm beyin dokusu %4 PFA çözeltisi içinde +4°C'de bir hafta fıkse edildi. Beyin dokularından vibratom (Campden Instruments 5100 mz) ile 50 µm kalınlığında ARC bölgesini içeren kesitler alındı. Kesitler fosfat tamponlu salin (PBS) içinde +4°C'de 24 kuyucuklu plakalarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler 24 kuyucuklu plakalarda serbestçe çalkalanarak (free floating) PBS ile 3 x 10 dakika yıkandı. Ardından kesitler 0.5 M glisin çözeltisiyle 45 dakika plakalarda serbestçe çalkalandı ve PBS ile 3 x 10 dakika yıkandı. Yıkamanın ardından kesitler PBS içinde %0,1 Triton-X içeren solüsyonda +4°C'de 60 dakika inkübe edilerek delme işlemi gerçekleşti ve PBS içinde %3 sığır serum albümini (BSA) ve %0,05 Triton-X içeren solüsyonda oda sıcaklığında bir saat bloklandı.

Bloklama sonrası, her bir grupta bulunan AgRP-Ires-Cre hayvanlardan elde edilen kesitler, FAM163A proteininin ekspresyon durumunun ve FAM163A protein lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla anti-FAM163A antikoru (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Klon: G-12, sc-393821) ile +4°C'de gece boyunca serbestçe çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler PBS ile 3 x 10 dakika oda sıcaklığında yıkandı ve Alexa Fluor® 594 ile konjuge anti-mouse IgG sekonder antikoru (1:2000, Cell Signaling Technology®, #8890) ile oda sıcaklığında bir saat serbestçe çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler PBS ile 3 x 10 dakika oda sıcaklığında yıkandı, pozitif yüklü lameller üzerine alındı ve lameller kapatma solüsyonu (Fluoroshield™ with DAPI; Sigma, F6057) kullanılarak kapatıldı.

Bloklama sonrası her bir grupta yabanıl tip hayvanlardan elde edilen kesitler uygulamaların FAM163A proteininin ekspresyon durumunun, FAM163A protein lokalizasyonunun belirlenmesi amacıyla AgRP-Ires-Cre hayvanlardan elde edilen kesitlere uygulanan aynı protokole göre boyandı. Bunun yanında farklı kesitler ayrıca

anti-AgRP (4 µg/mL, R&D Systems, AF634), anti-POMC (4 µg/mL, Novus Biologicals, NB100-1533), anti-PGC-1α (1:500, Novus Biologicals, NBP1-04676) ve anti-ATP5H (5 µg/mL, Abcam, ab110275) antikorlarıyla gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler PBS ile 3 x 10 dakika oda sıcaklığında yıkandı, Alexa Fluor® 594 ile konjuge anti-mouse IgG sekonder antikoru (1:2000, Cell Signaling Technology®, #8890), Alexa Fluor® 594 ile konjuge anti-rabbit IgG sekonder antikoru (1:2000, Cell Signaling Technology®, #8889) ve Alexa Fluor® 594 ile konjuge anti-goat IgG sekonder antikoru (1:2000, Abcam, ab150132) ile oda sıcaklığında bir saat serbestçe çalkalanarak inkübe edildi. Ardından kesitler PBS ile 3 x 10 dakika oda sıcaklığında yıkandı, pozitif yüklü lameller üzerine alındı ve lameller kapatma solüsyonu (Fluoroshield™ with DAPI; Sigma, F6057) kullanılarak kapatıldı.

Görüntüleme uygun dalgaboyunda lazerlere sahip olan bir konfokal mikroskopta (Zeiss, Axio Imager 2) uygun filtreler kullanılarak her bir ilgili protein için pozlandırma süreleri eşit olacak şekilde gerçekleştirildi.

### **3.9. İstatistiksel Analiz**

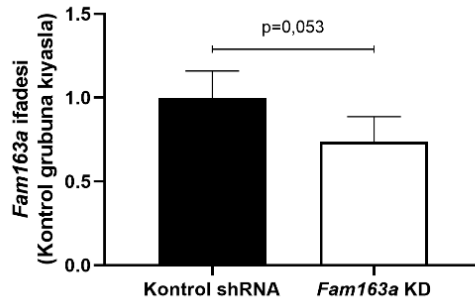
İstatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Software, ABD) kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Aykırı veri analizi ROUT metodu (Q= %1) ile gerçekleştirildi <sup>430</sup>. Normal dağılım gösteren ikili veriler Student t-testi ile karşılaştırılırken normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile incelendi.  $p<0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Fam163a*'nın Sessizleştirilmesinin Etkileri

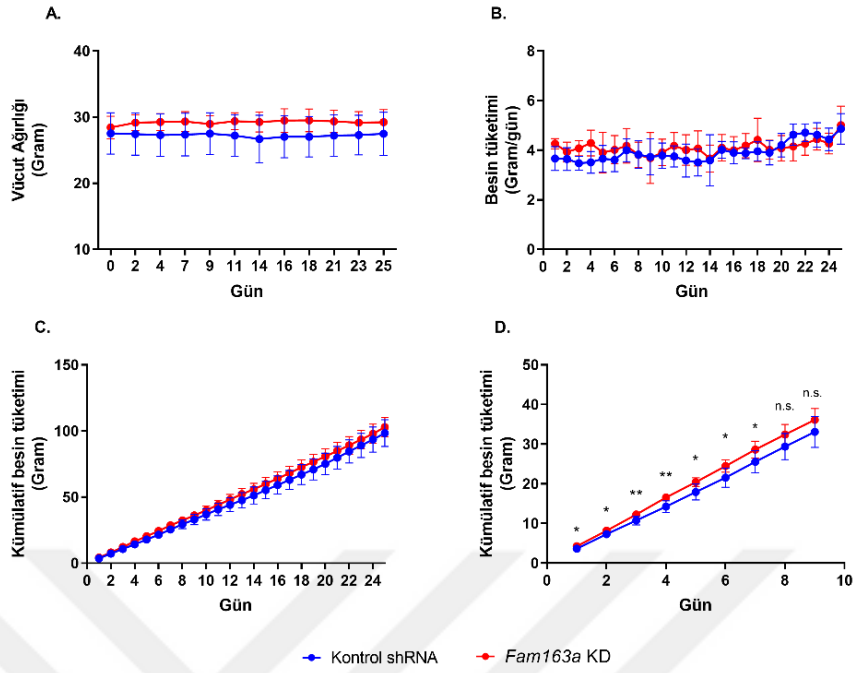
#### 4.1.1. Yabaml Tıp Hayvanlarda Besin Tüketimi ve Vücut Ağırlığı

ARC hedeflenerek gerçekleştirilen intrahipotalamik *Fam163a* shRNA enjeksiyonu *Fam163a* ifadesinde ~%27'lik bir azalmaya sebep olmuştur (Şekil 6;  $p=0,053$ ).



**Şekil 6.** Kontrol grubuna kıyasla *Fam163a* ifadesi (her grupta  $n=4$  hayvan).

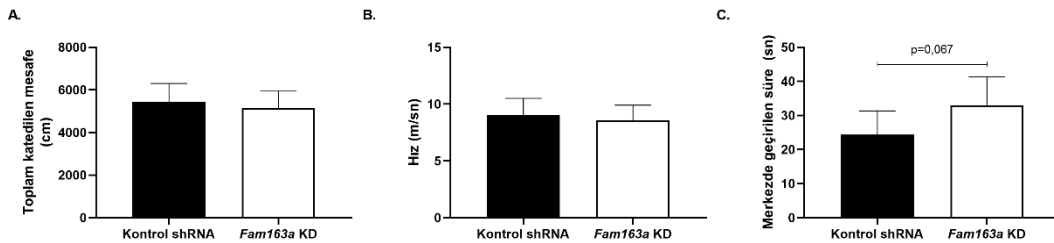
Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD gruplarının vücut ağırlığı ve günlük besin tüketimi arasında 25 gün boyunca anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 7A ve B). Grupların 25 günlük deney süresi sonunda kümülatif besin tüketimleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamasına rağmen (Şekil 7C), besin tüketimi takibinin başlangıcından itibaren ilk yedi gün boyunca *Fam163a* KD grubunda bulunan hayvanlar kümülatif olarak daha yüksek miktarda besin tüketmiştir (Şekil 7D;  $p<0,05$ ).



**Şekil 7.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu hayvanların (A) vücut ağırlıkları, (B) günlük besin tüketimleri, (C) 25 günlük kümülatif besin tüketimleri ve (D) 10 günlük kümülatif besin tüketimleri (\* $p<0,05$  ve \*\* $p<0,01$ ; n.s.: anlamlı değil).

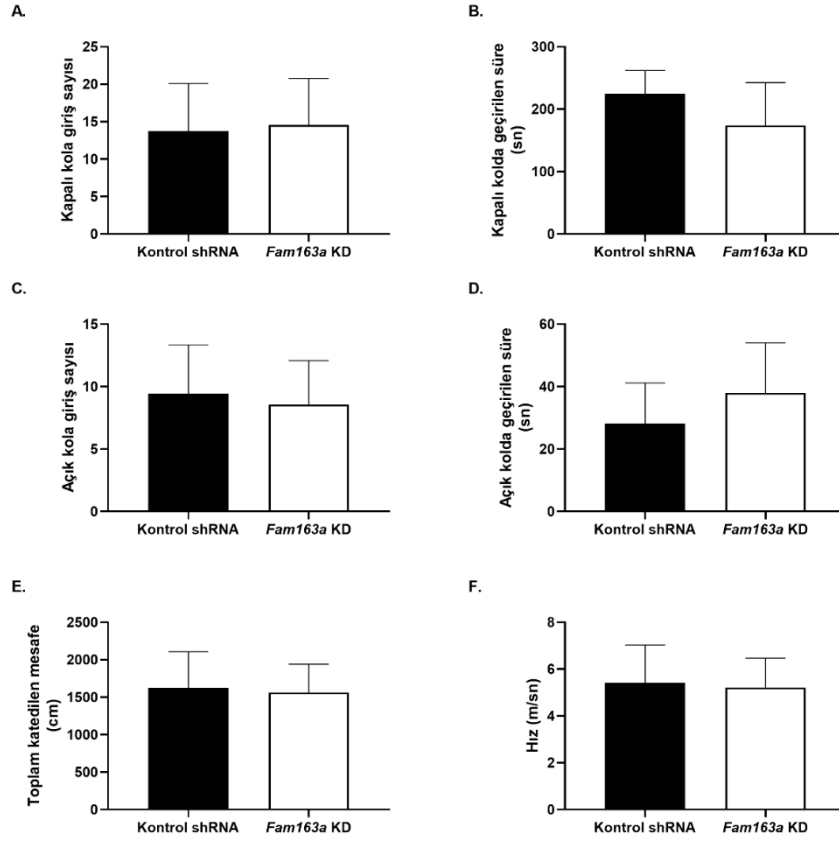
#### 4.1.2. Yabancıl Tip Hayvanlarda Lokomotor Aktivite ve Anksiyete Benzeri Davranışlar

Açık alan testi sonuçlarına göre Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD gruplarının toplam katettikleri mesafe ve ortalama hızları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 8). *Fam163a* KD grubu hayvanların merkezde geçirdikleri süre Kontrol shRNA grubuna kıyasla artma eğilimi gösterse de bu artış anlamlı bulunmamıştır (Şekil 8;  $p=0,067$ )



**Şekil 8.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu hayvanların açık alan testinde (A) toplam katettikleri mesafe, (B) ortalama hız ve (C) merkezde geçirdikleri süre.

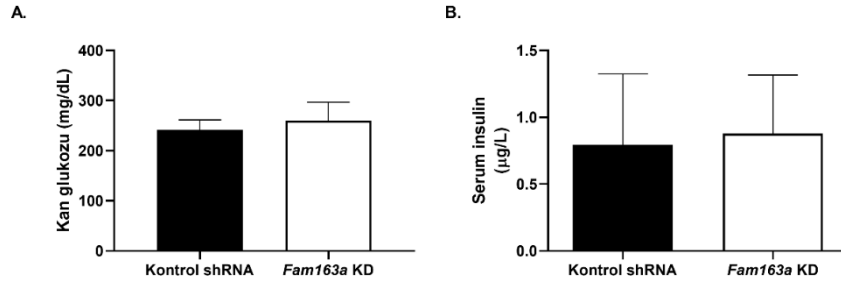
Yükseltilmiş artı labirenti testi sonuçlarına göre Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD gruplarının açık ve kapalı kola giriş sayıları, açık ve kapalı kolda geçirdikleri süre, toplam katettikleri mesafe ve ortalama hızları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 9).



**Şekil 9.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu hayvanların yükseltilmiş artı labirent testinde (A) kapalı kola giriş sayıları, (B) kapalı kolda geçirdikleri süre, (C) açık kola giriş sayıları, (D) açık kolda geçirdikleri süre (E) toplam katettikleri mesafe ve (F) ortalama hızları.

#### 4.1.3. Yabancıl Tip Hayvanlarda Kan Glukoz ve Serum İnsülin Seviyeleri

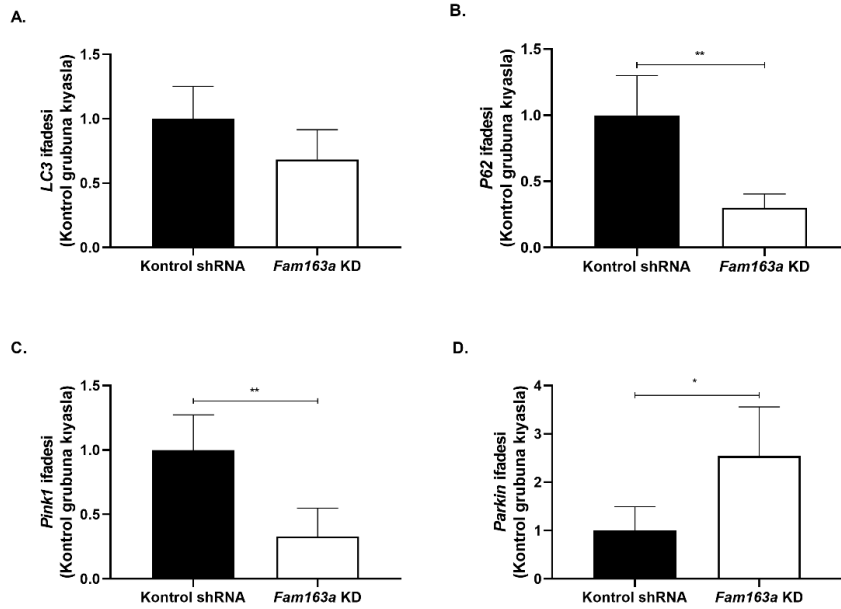
*Fam163a*'nın ARC hedeflenerek sessizleştirilmesi, kan glukozu ve serum insülin seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır (Şekil 10A ve B).



**Şekil 10.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu hayvanların (A) kan glukoz ve (B) serum insülin seviyeleri.

#### 4.1.4. Yabancı Tip Hayvanlarda Mitokondriyal Kalite Kontrol ve Mitokondriyal Dinamikler ile İlişkili Transkriptlerin İfadesi

ARC’de *Fam163a* sessizleştirilmesinin, *LC3* ifadesinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmazken (Şekil 11A) *P62* ifadesinde anlamlı şekilde azalmaya sebep olmuştur (Şekil 11B;  $p < 0,01$ ). Bunun yanında, *Fam163a* sessizleştirilmesi *Pink1* ifadesi anlamlı azalmaya sebep olurken (Şekil 11C;  $p < 0,01$ ), *Parkin* ifadesi anlamlı olarak yükselmiştir (Şekil 11D;  $p < 0,05$ ).

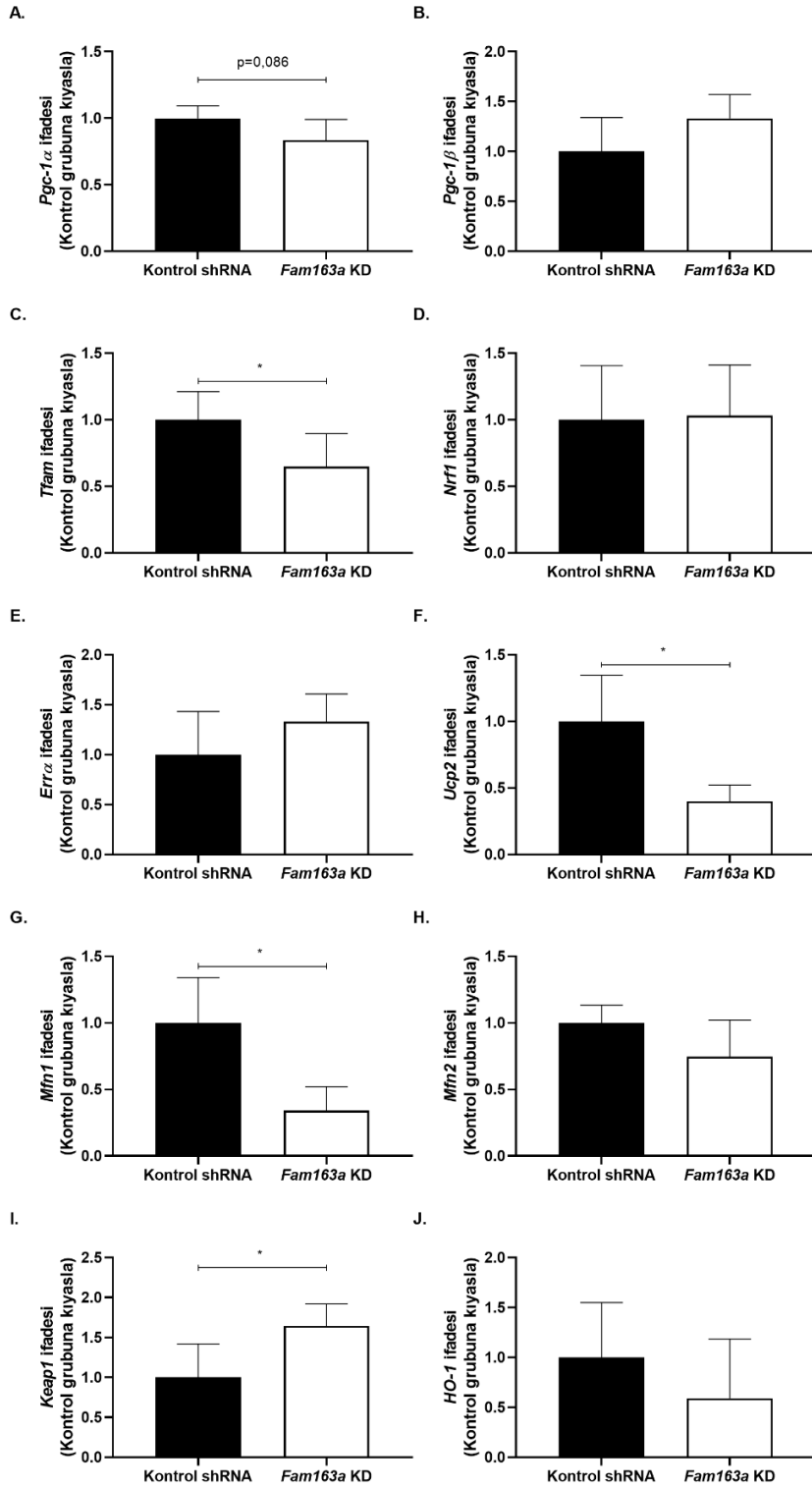


**Şekil 11.** *Fam163a* sessizleştirilmesinin mitofaji ile ilişkili transkriptlere etkisi. (A) *LC3*, (B) *P62*, (C) *Pink1* ve (D) *Parkin* seviyeleri (\* $p < 0,05$  ve \*\* $p < 0,01$ ).

Mitokondriyal dinamikleri düzenleyen genlerin ifadeleri incelendiğinde, ARC’de *Fam163a* sessizleştirilmesinin *Pgc-1α* ve *Pgc-1β* ifadelerinde anlamlı bir değişikliğe sebep

olmadığı görülmüştür (Şekil 12A ve B). Bunun yanında *Fam163a* KD grubunda *Tfam* ifadesinde anlamlı azalma görülürken (Şekil 12C;  $p<0,01$ ) *Nrf1* ve *ERRα* ifaldeleri değişmemiştir (Şekil 12D ve E). *Ucp2* ifadesi *Fam163a* KD grubunda anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 12F;  $p<0,05$ ). *Mfn1* ifadesi *Fam163a* KD grubunda anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (Şekil 12G;  $p<0,05$ ) ancak *Mfn2* ifadesinde herhangi bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 12H). *Keap1* ifadesi *Fam163a* KD grubunda anlamlı derecede yüksek bulunurken (Şekil 12I;  $p<0,05$ ) ve *HO-1* ifadesi her iki grupta benzer bulunmuştur (Şekil 12J).

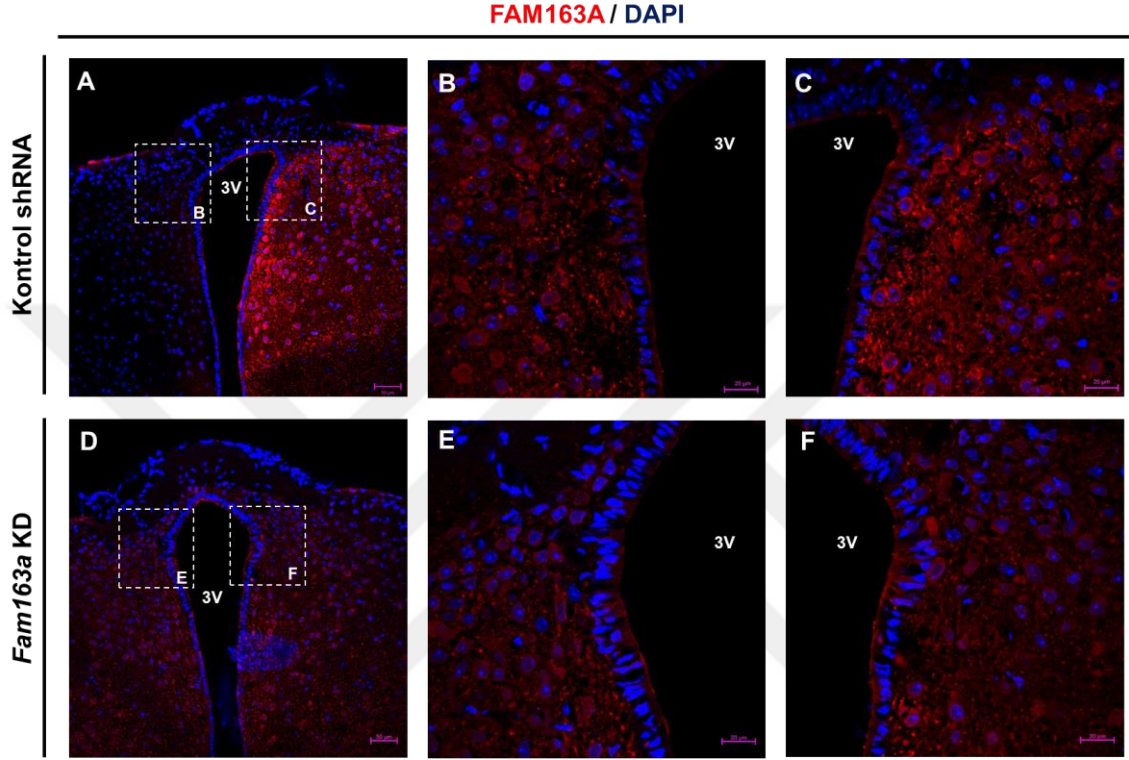




**Şekil 12.** *Fam163a* sessizleştirmesinin mitokondriyal biyogenez, füzyon ve oksidatif stres ile ilişkili transkriptlere etkisi. (A) *Pgc-1α* (B) *Pgc-1β*, (C) *Tfam*, (D) *Nrf1*, (E) *Errα*, (F) *Ucp2*, (G) *Mfn1*, (H) *Mfn2*, (I) *Keap1* ve (J) *HO-1* seviyeleri (\*p<0,05).

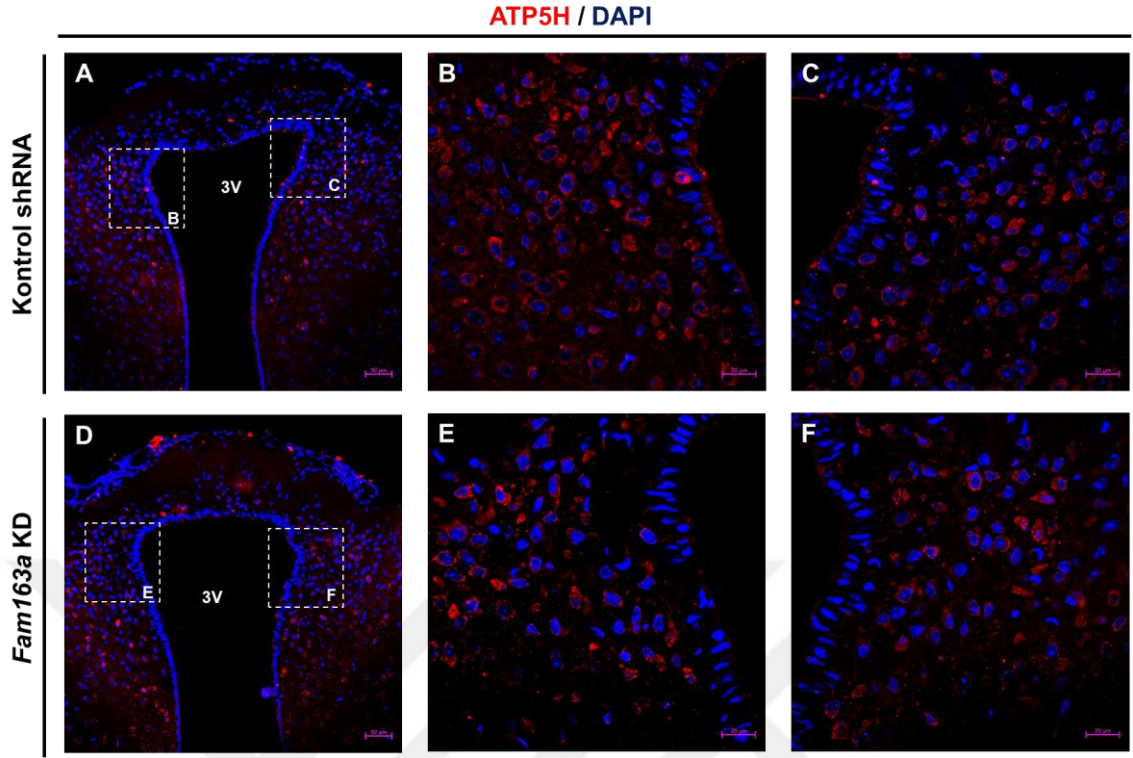
#### 4.1.5. Konfokal Mikroskopi

FAM163A ARC'de yoğun bir şekilde ifade edilmektedir (Şekil 13A-F). Gen ekspresyon sonuçlarıyla paralel bir şekilde *Fam163a* KD grubunda FAM163A protein seviyesinde azalma gözlenmiştir (Şekil 13A-F).



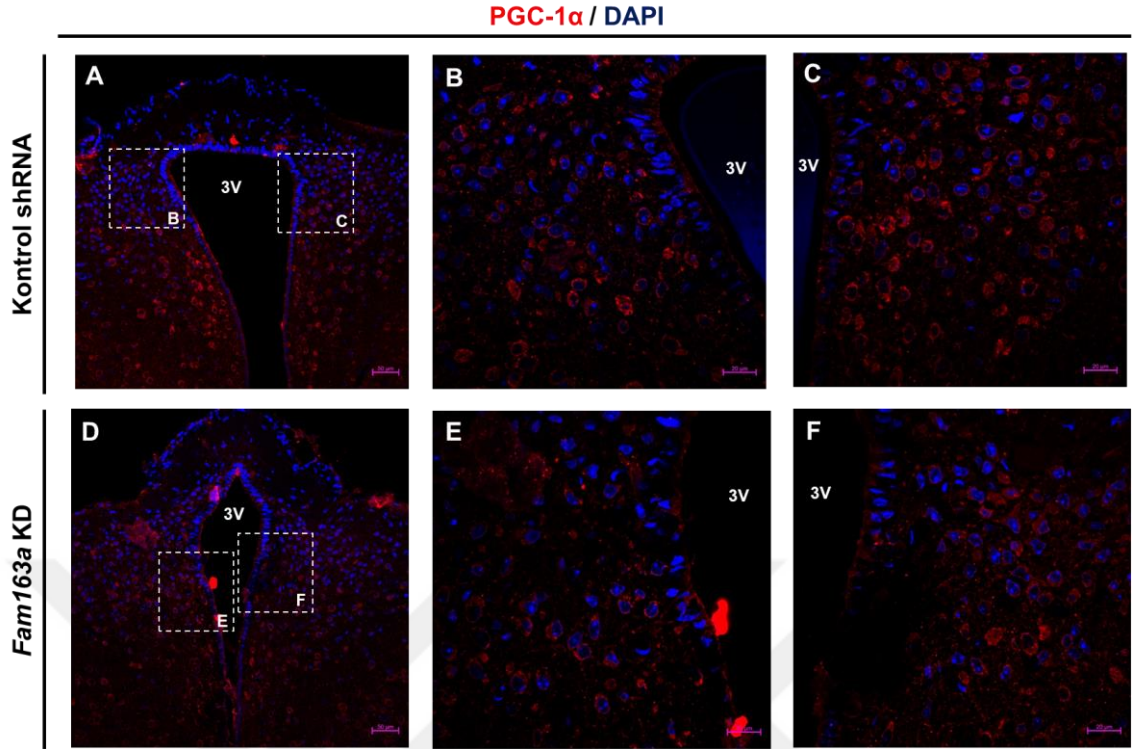
**Şekil 13.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu yabanıl tip hayvanlarda FAM163A ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) *Fam163a* KD grubu hayvanların ARC'de FAM163A ifadesi. (Skala= (A ve D) 50  $\mu$ m, (B, C, E ve F) 20  $\mu$ m. 3V: 3. ventrikül).

*Fam163a* KD grubunda ATP5H ifadesi kontrol shRNA grubuna benzer bulunmuştur (Şekil 14A-F).



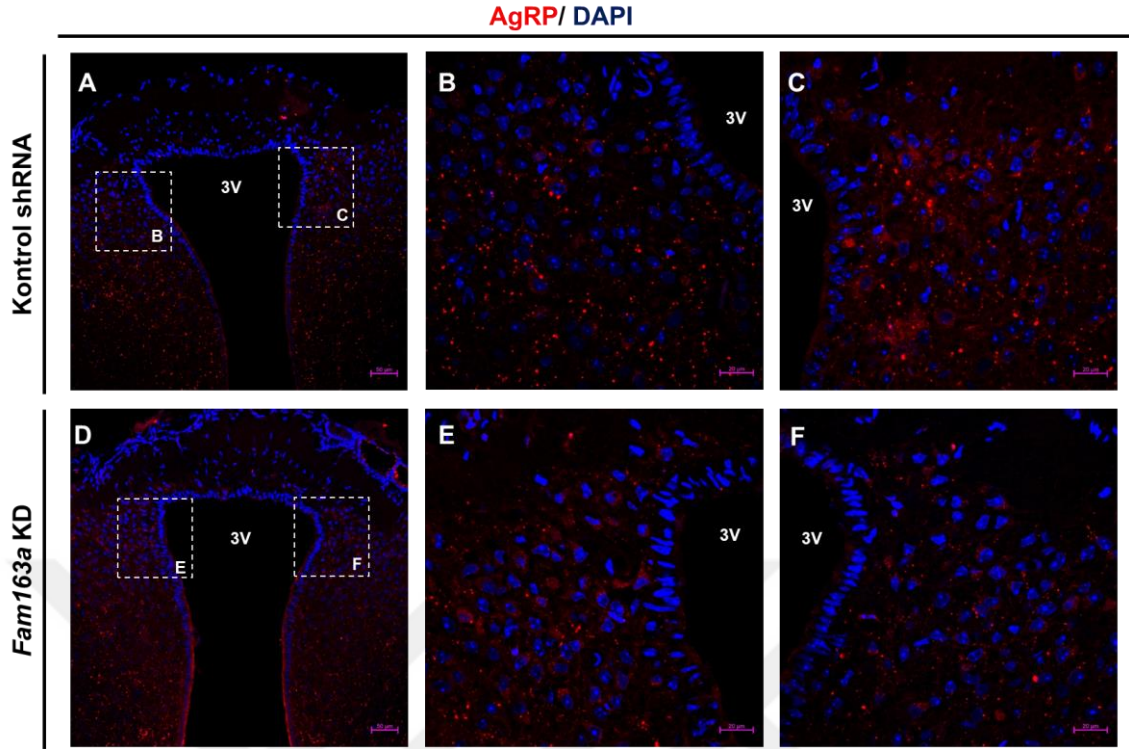
**Şekil 14.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu yabanıl tip hayvanlarda ATP5H ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) *Fam163a* KD grubu hayvanların ARC'de ATP5H ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül).

*Fam163a* KD grubunda PGC-1 $\alpha$  ifadesi kontrol shRNA grubuna benzer bulunmuştur (Şekil 15A-F).



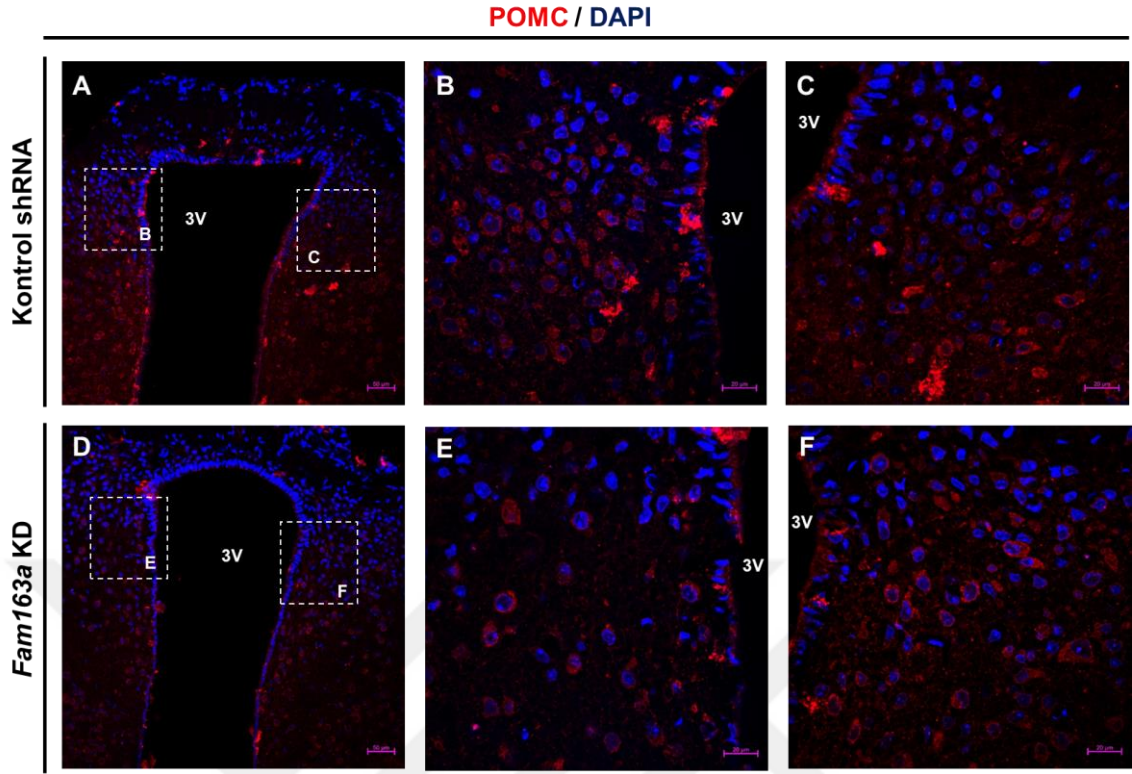
**Şekil 15.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu yabancı tip hayvanlarda PGC-1 $\alpha$  ifadesi. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) *Fam163a* KD grubu hayvanların ARC'de PGC-1 $\alpha$  ifadesi. (Skala= (A ve D) 50  $\mu$ m, (B, C, E ve F) 20  $\mu$ m. 3V: 3. ventrikül).

*Fam163a* KD grubunda AgRP ifadesi kontrol shRNA grubundan daha az gözlenmiştir (Şekil 16A-F).



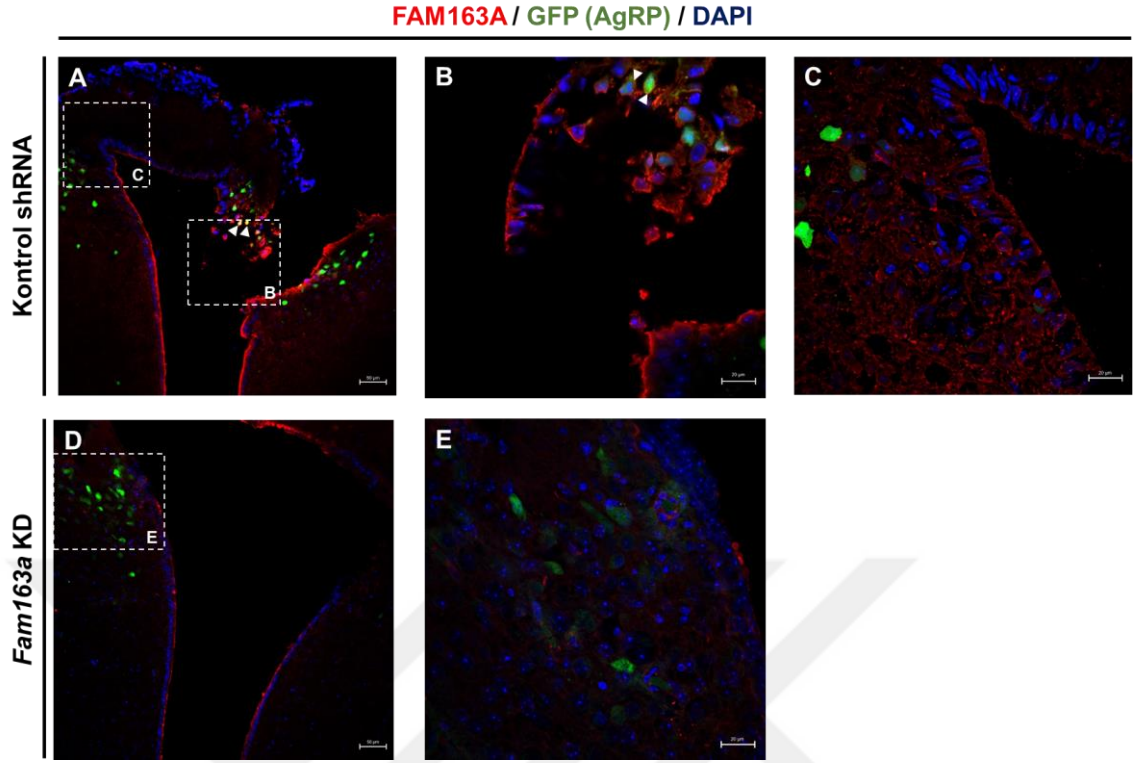
**Şekil 16.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu yabanıl tip hayvanlarda AgRP ifadesi. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) *Fam163a* KD grubu hayvanların ARC'de AgRP ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül).

*Fam163a* KD grubunda POMC ifadesi kontrol shRNA grubundan daha düşük gözlenmiştir (Şekil 17A-F).



**Şekil 17.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu yabancı tip hayvanlarda POMC ifadesi. (A-C) Kontrol shRNA ve (D-F) *Fam163a* KD grubu hayvanların ARC’de POMC ifadesi. (Skala= (A ve D) 50  $\mu$ m, (B, C, E ve F) 20  $\mu$ m. 3V: 3. ventrikül).

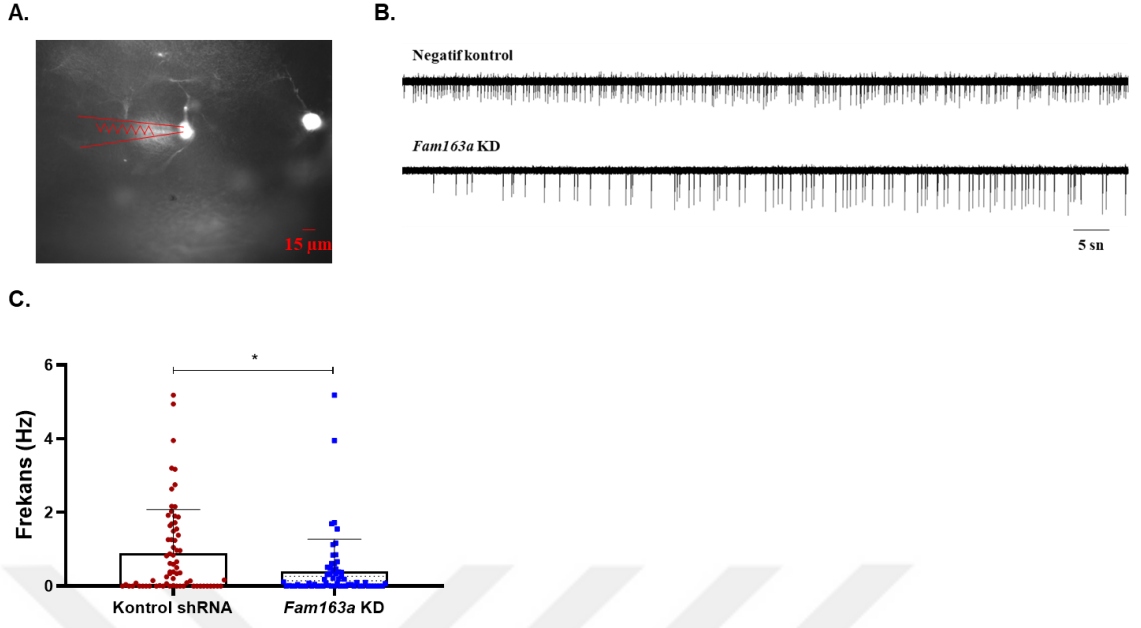
Transgenik hayvanlarda FAM163A’nın lokalizasyonu incelendiğinde, FAM163A’nın AgRP nöronlarında ifade edildiği gözlenirken, FAM163A’nın bazı AgRP alt popülasyonlarında daha yüksek oranda ifade edildiği belirlendi.



**Şekil 18.** Kontrol shRNA ve *Fam163a* KD grubu transgenik hayvanlarda FAM163A ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) Kontrol shRNA ve (D ve E) *Fam163a* KD grubu hayvanların ARC'de FAM163A ifadesi (Ok başları: AgRP nöronlarındaki FAM163A ifadesi. Skala= (A ve D) 50  $\mu$ m, (B, C ve E) 20  $\mu$ m. 3V: 3. ventrikül).

#### 4.1.6. Transgenik Hayvanlarda AgRP Nöron Aktivitesi

GFP ile işaretlenmiş AgRP nöronlarından alınan elektrofizyolojik kayıtlarda hipotalamik *Fam163a* sessizleştirilmesinin AgRP ateşleme frekansını azalttığı görülmüştür (Şekil 19;  $p < 0,05$ ).

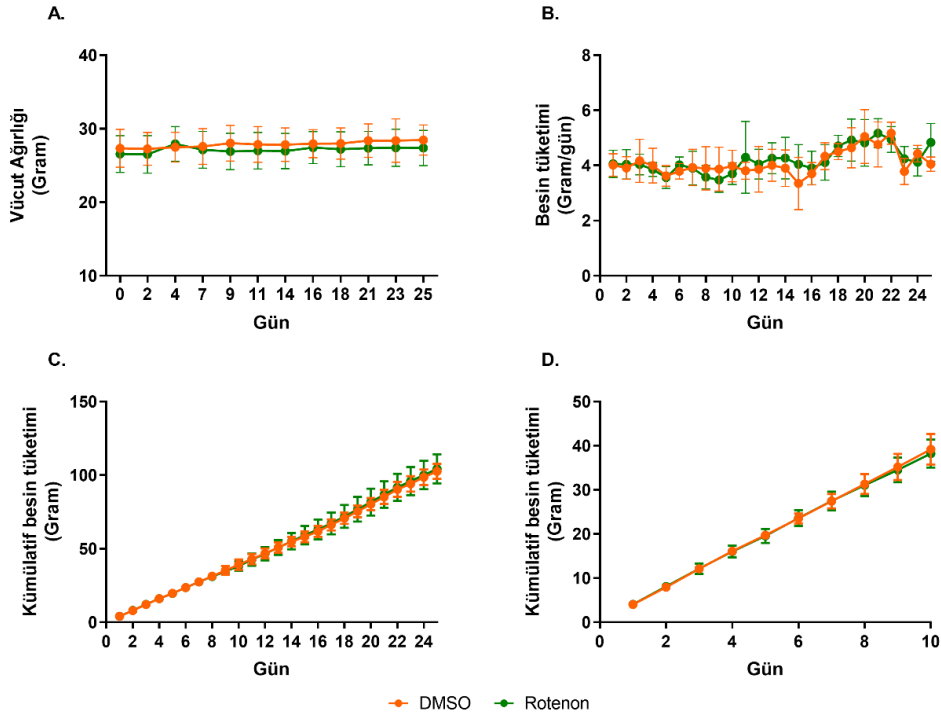


**Şekil 19.** *Fam163a* sessizleştirmesinin AgRP nöronlarının ateşleme frekansına etkisi. (A) Temsili elektrofizyolojik kayıt görüntüsü. (B) Temsili elektrofizyolojik aktivite trasesi. (C) AgRP nöronlarının ateşleme frekansı (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Rotenon Uygulamasının Etkileri

##### 4.2.1. Yabani Tip Hayvanlarda Besin Tüketimi ve Vücut Ağırlığı

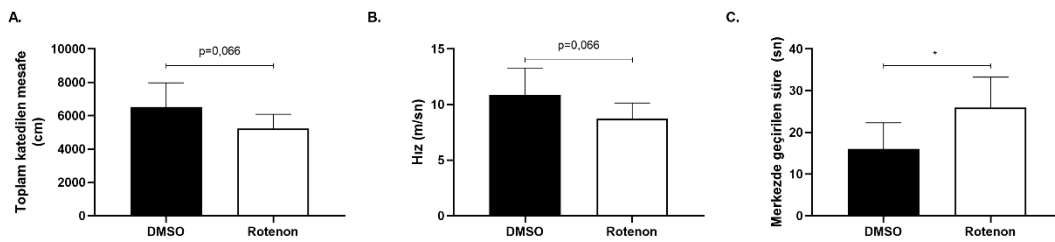
DMSO ve Rotenon gruplarının vücut ağırlığı, günlük ve kümülatif besin tüketimleri arasında bir fark gözlenmemiştir (Şekil 20).



**Şekil 20.** DMSO ve Rotenon grubu hayvanların (A) vücut ağırlıkları, (B) günlük besin tüketimleri, (C) 25 günlük kümülatif besin tüketimleri ve (D) 10 günlük kümülatif besin tüketimleri.

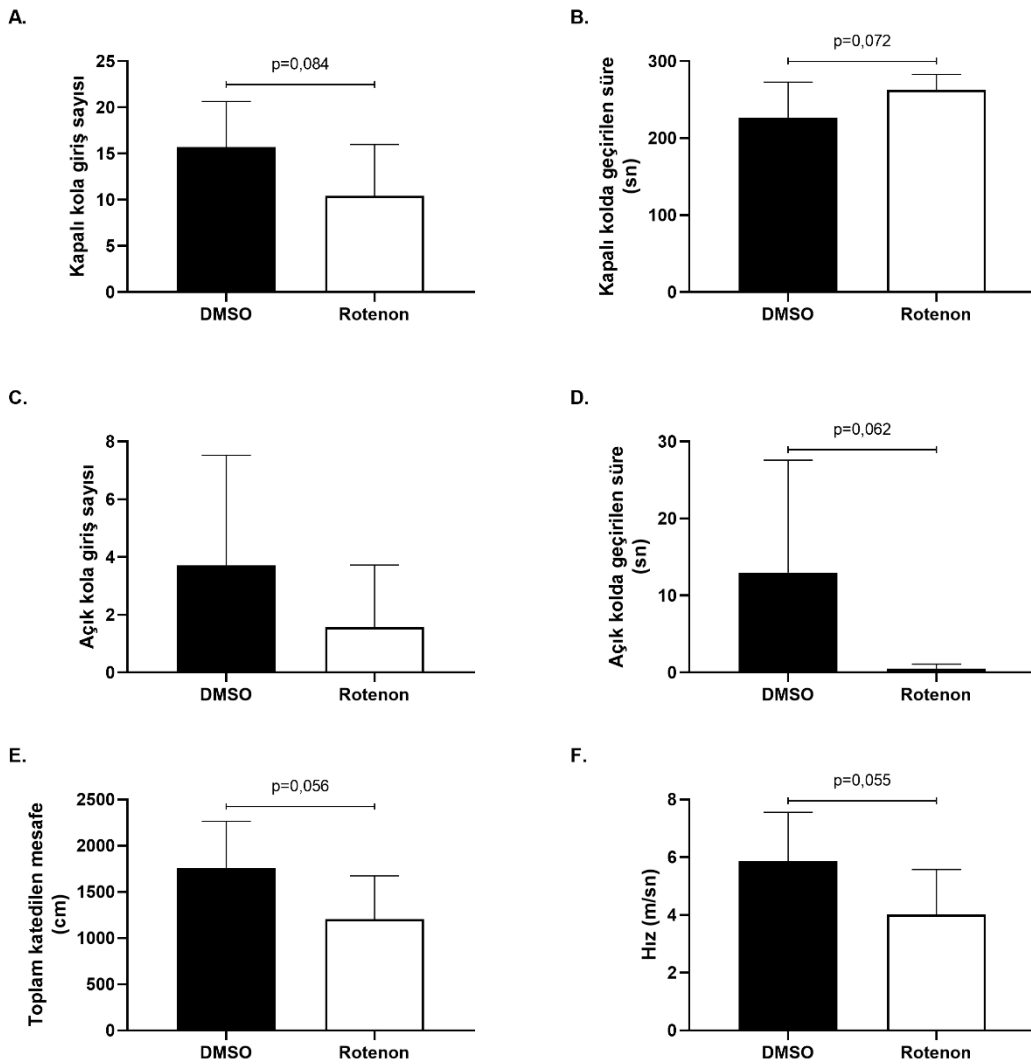
#### 4.2.2. Yabancı Tip Hayvanlarda Lokomotor Aktivite ve Anksiyete Benzeri Davranışlar

Açık alan testi sonuçlarına göre DMSO ve rotenon gruplarının toplam katettikleri mesafe ve ortalama hızları arasında bir miktar azalma görülmüş ancak bu azalma anlamlı bulunmamıştır (Şekil 21A ve B). Buna karşın Rotenon grubu hayvanların merkezde geçirdikleri süre DMSO grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Şekil 21C;  $p < 0,05$ ).



**Şekil 21.** DMSO ve Rotenon grubu hayvanların açık alan testinde (A) toplam katettikleri mesafe, (B) ortalama hız ve (C) merkezde geçirdikleri süre (\* $p < 0,05$ ).

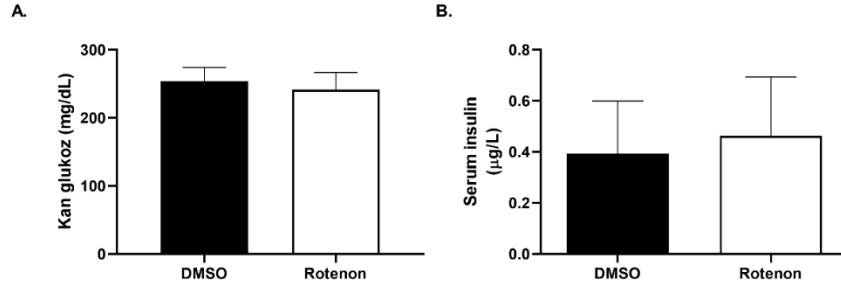
Açık alan testi sonuçlarına göre Rotenon uygulaması kapalı kola giriş sayısında bir miktar azalmaya (Şekil 23A;  $p=0,084$ ) ve kapalı kolda geçirilen sürede bir miktar artışa sebep olmuştur (Şekil 23B;  $p=0,072$ ). Buna karşın açık kola giriş sayısı her iki grupta da benzer bulunurken (Şekil 23C), açık kolda geçirilen süre bir miktar azalmıştır (Şekil 23D;  $p=0,062$ ). Rotenon uygulaması sonucunda hayvanların toplam kat ettikleri mesafe ve ortalama hızları ise bir miktar azalmıştır (Şekil 23E ve F; sırasıyla  $p=0,056$  ve  $p=0,055$ ). Bahsedilen parametrelerdeki değişikliklerin hiçbirisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



**Şekil 22.** DMSO ve Rotenon grubu hayvanların yükseltilmiş artı labirent testinde (A) açık kola giriş sayıları, (B) açık kolda geçirdikleri süre, (C) kapalı kola giriş sayıları, (D) kapalı kolda geçirdikleri süre (E) toplam katettikleri mesafe ve (F) ortalama hızları.

#### 4.2.3. Yabancıl Tip Hayvanlarda Kan Glukoz ve Serum İnsülin Seviyeleri

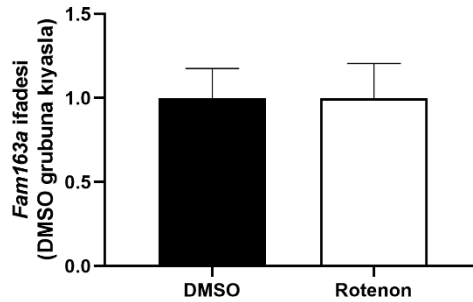
ARC hedeflenerek yapılan rotenon enjeksiyonu, kan glukozu ve serum insülin seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır (Şekil 23A ve B).



Şekil 23. DMSO ve Rotenon grubu hayvanların (A) kan glukoz ve (B) serum insülin seviyeleri.

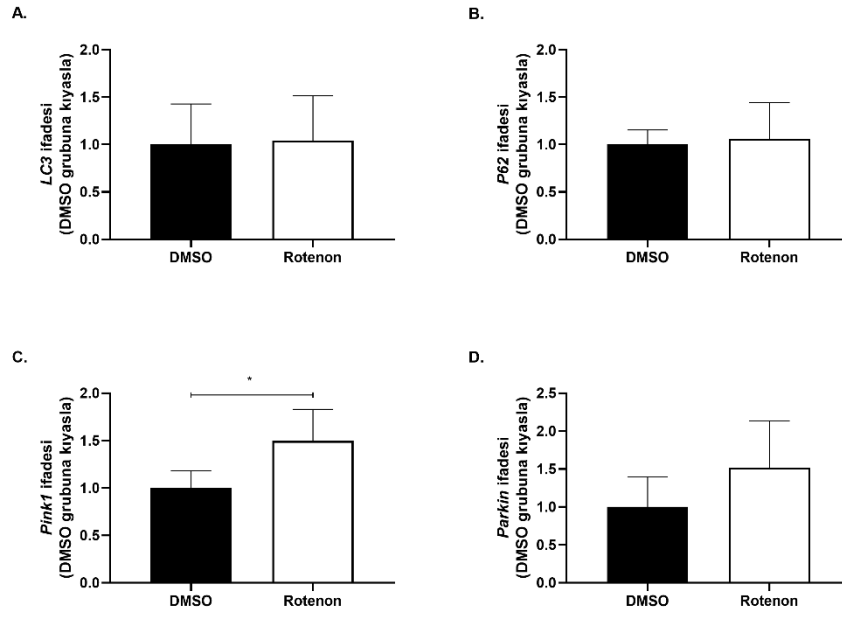
#### 4.2.4. Yabancıl Tip Hayvanlarda *Fam163a*, Mitokondriyal Kalite Kontrol ve Mitokondriyal Dinamikler ile İlişkili Transkriptlerin İfadesi

Rotenon uygulaması hipotalamik *Fam163a* ifadesinde bir değişime sebep olmamıştır (Şekil 24).



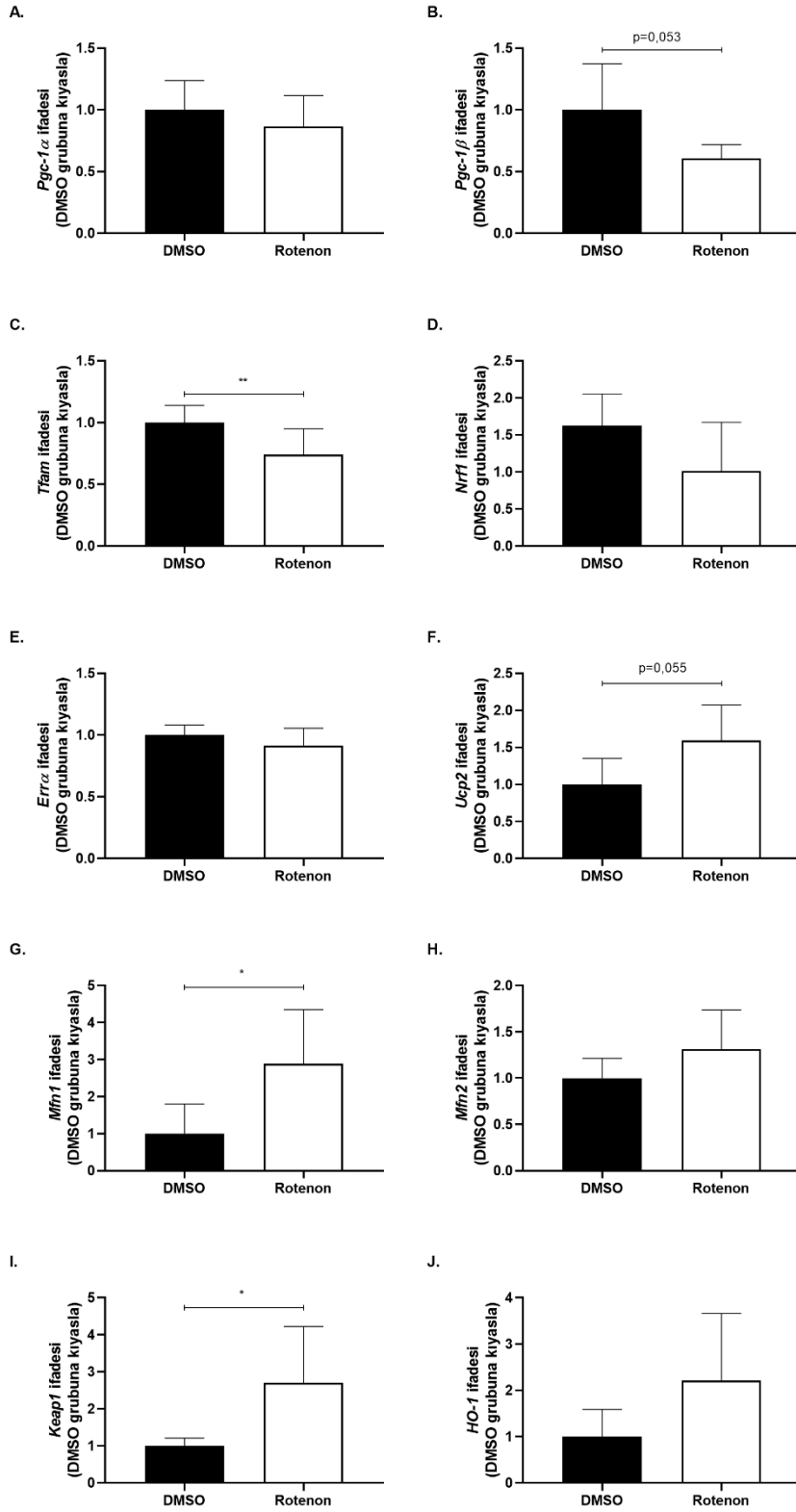
Şekil 24. Rotenon uygulamasının *Fam163a* ifadesine olan etkisi.

Otofaji belirteçleri olan *LC3* ve *P62*'nin ifadeleri her iki grupta da benzer bulundu (Şekil 25A ve B). Rotenon uygulaması sonrasında *Pink1* ifadesinde anlamlı artış gözlenirken (Şekil 25C;  $p < 0,05$ ), *Parkin* ifadesi DMSO grubuyla benzer bulunmuştur (Şekil 25D).



**Şekil 25.** Rotenon uygulamasının mitofaji ile ilişkili transkriptlere etkisi. (A) *LC3*, (B) *P62*, (C) *Pink1* ve (D) *Parkin* seviyelerine etkisi (\* $p < 0,05$ ).

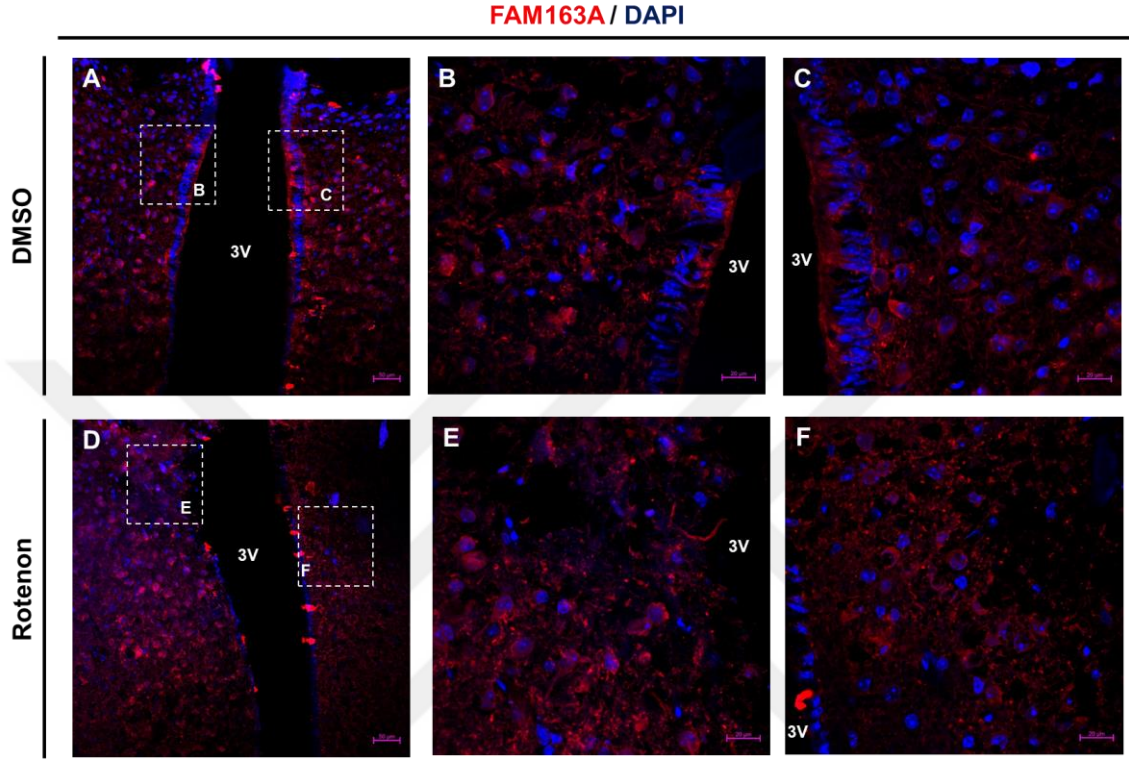
Mitokondriyal dinamikleri düzenleyen genlerin ifadeleri incelendiğinde, ARC'ye rotenon uygulanması *Pgc-1 $\alpha$*  ifadesinde anlamlı değişikliğe sebep olmazken (Şekil 26A) *Pgc-1 $\beta$*  ifadesi neredeyse anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 26B;  $p = 0,053$ ). Bunun yanında rotenon uygulaması *Tfam* (Şekil 26C;  $p < 0,01$ ) ifadesinde anlamlı azalma görülürken *Nrf1* ve *ERR $\alpha$*  ifadeleri değişmemiştir (Şekil 26D ve E). *Ucp2* ifadesi ise rotenon uygulanan grupta neredeyse anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (Şekil 26F;  $p = 0,055$ ). *Mfn1* ifadesi rotenon uygulanan grupta anlamlı şekilde yüksek bulunurken (Şekil 26G;  $p < 0,05$ ) ancak *Mfn2* ifadesinde herhangi bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 26H). *Keap1* ifadesi rotenon uygulanan grupta anlamlı derecede yüksek bulunurken (Şekil 26I;  $p < 0,05$ ) ve *HO-1* ifadesi her iki grupta benzer bulunmuştur (Şekil 26J).



**Şekil 26.** Rotenon uygulamasının mitokondriyal biyogenez, füzyon ve oksidatif stres ile ilişkili transkriptlere etkisi. (A) *Pgc-1α* (B) *Pgc-1β*, (C) *Tfam*, (D) *Nrf1*, (E) *Errα*, (F) *Ucp2*, (G), *Mfn1*, (H) *Mfn2*, (I) *Keap1* ve (J) *HO-1* seviyeleri (\*p<0,05).

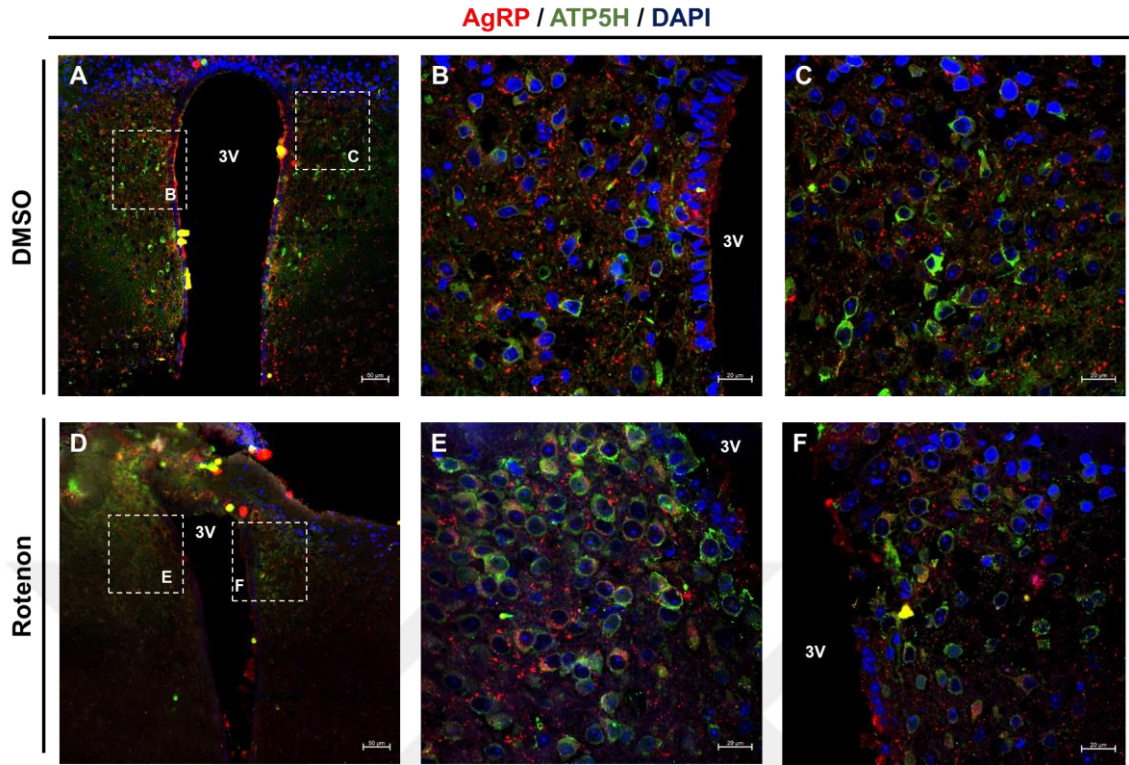
#### 4.2.5. Konfokal Mikroskopi

Rotenon uygulaması FAM163A protein seviyelerinde artışa sebep olmuştur (Şekil 27A-F).



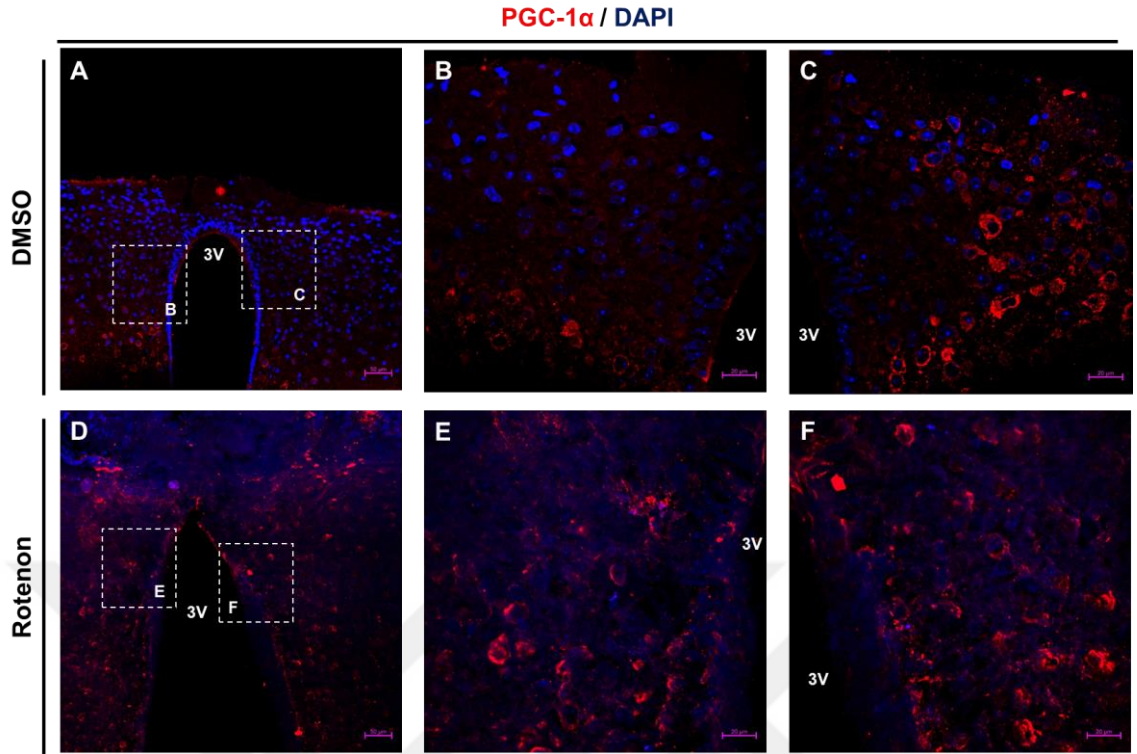
**Şekil 27.** DMSO ve rotenon grubu yabanıl tip hayvanlarda FAM163A ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) DMSO ve (D-F) Rotenon grubu hayvanların ARC’de FAM163A ifadesi. (Skala= (A ve D) 50  $\mu$ m, (B, C, E ve F) 20  $\mu$ m. 3V: 3. ventrikül).

ATP5H ARC’deki hücrelerde sitoplazmik olarak lokalize olmaktadır (Şekil 28A-F) ve seviyeleri rotenon uygulanmasından etkilenmiyor gibi görünmektedir. Bunun yanı sıra ARC’deki AgRP miktarı rotenon uygulaması sonrasında azalmaktadır (Şekil 28A-F).



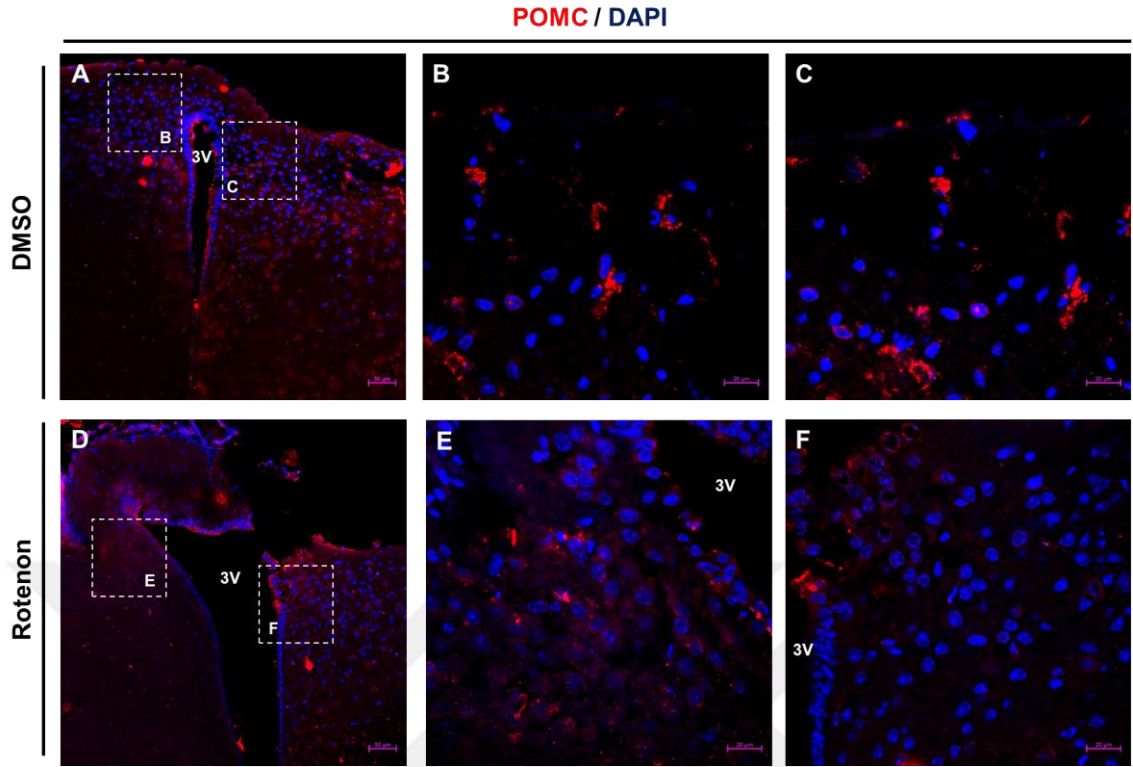
**Şekil 28.** DMSO ve rotenon grubu yabanıl tip hayvanlarda AgRP ve ATP5H ifadesi ve lokalizasyonu. (A-C) DMSO ve (D-F) Rotenon grubu hayvanların ARC'de AgRP ve ATP5H ifadesi. (Skala= (A ve D) 50  $\mu$ m, (B, C, E ve F) 20  $\mu$ m. 3V: 3. ventrikül).

Rotenon uygulaması, ARC'deki PGC-1 $\alpha$  protein ifadesini değiştirmemektedir (Şekil 29A-F).



**Şekil 29.** DMSO ve rotenon grubu yabani tip hayvanlarda PGC-1 $\alpha$  ifadesi. (A-C) DMSO ve (D-F) Rotenon grubu hayvanların ARC'de PGC-1 $\alpha$  ifadesi. (Skala= (A ve D) 50  $\mu$ m, (B, C, E ve F) 20  $\mu$ m. 3V: 3. ventrikül).

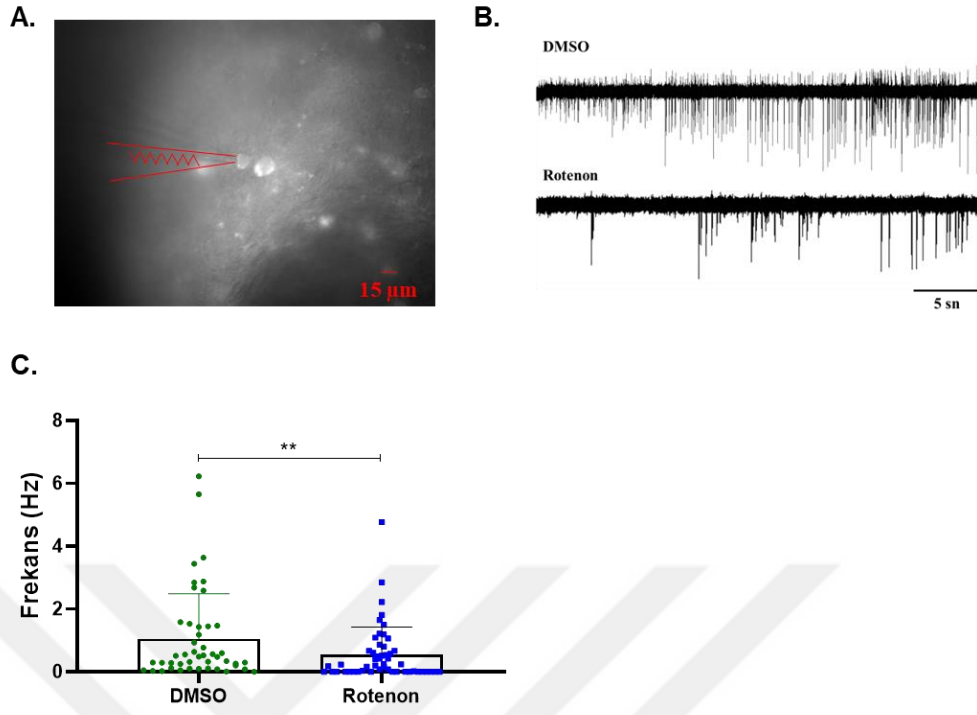
Rotenon uygulaması, ARC'deki POMC protein ifadesinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 30A-F).



**Şekil 30.** DMSO ve rotenon grubu yabancı tip hayvanlarda POMC ifadesi. (A-C) DMSO ve (D-F) Rotenon grubu hayvanların ARC'de POMC ifadesi. (Skala= (A ve D) 50 µm, (B, C, E ve F) 20 µm. 3V: 3. ventrikül).

#### 4.2.6. Transgenik Hayvanlarda AgRP Nöron Aktivitesi

GFP ile işaretlenmiş AgRP nöronlarından alınan elektrofizyolojik kayıtlarda hipotalamik rotenon uygulamasının AgRP ateşleme frekansını azalttığı görülmüştür (Şekil 31; \*\*p<0,01).



**Şekil 31.** Rotenon uygulamasının AgRP nöronlarının ateşleme frekansına etkisi. **(A)** Temsili elektrofizyolojik kayıt görüntüsü. **(B)** Temsili elektrofizyolojik aktivite trasesi. **(C)** AgRP nöronlarının ateşleme frekansı (\*\* $p < 0,01$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hipotalamik nöronal aktivite besinler ve hormonlar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir ve bu nöronlarda meydana gelen mitokondriyal disfonksiyon obezite ve tip 2 diyabet gibi çeşitli metabolik hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir <sup>425</sup>. Hipotalamik mitokondriyal fonksiyon, enerji homeostazını kontrol eden çeşitli nöron tiplerinde kritik öneme sahiptir <sup>431</sup>. Çalışmamızda, *Fam163a* sessizleştirmesinin besin alımını kısa dönemde yükselttiğini, AgRP nöron aktivitesini azalttığını ve mitokondriyal fonksiyonları düzenleyen genlerin ifadelerinde değişimlere sebep olduğunu gözlenmiştir. Bununla birlikte, mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğu daha önceki çalışmalarda kanıtlanmış olan rotenonun da besin alımında herhangi bir farklılığa neden olmadan AgRP nöron ateşleme frekansında azalmaya ve mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesinde rol alan genlerin ifadelerinde değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında ARC'ye yapılan rotenon uygulaması sonucunda mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesinde görevli genlerin ifadesinde değişimler gözlenmiş olup AgRP nöronlarının ateşleme frekansı azalmıştır.

Besin tüketimi ARC'de iki temel nöron popülasyonu olan AgRP ve POMC nöronları tarafından antagonistik olarak düzenlenmektedir <sup>431</sup>. Bu iki nöral popülasyonun aktivitesinin düzenlenmesinde mitokondriyal fonksiyon önemli rol oynamaktadır <sup>432</sup>. Çalışmamızda, *Fam163a*'nın hipotalamik sessizleştirilmesinin kümülatif besin alımını kısa dönemde arttırdığını ancak uzun dönemde kümülatif besin alımının eşlenik kontrol grubuyla eşitlendiğini belirledik. Bunun yanı sıra mitokondriyal dinamikleri ve mitofajiyi düzenleyen genlerin ifadelerinde değişiklikler belirledik. Mitokondriyal füzyonda görev alan *Mfn1* ve *Mfn2*'den yoksun farelerde AgRP nöron aktivitesinde artış gözlenmiş olup besin tüketiminde artış gözlenmiştir <sup>8</sup>. AgRP nöronlarına benzer şekilde, mitofusinler POMC nöron aktivitesinde de rol oynamaktadır. POMC nöronlarında *Mfn2* eksikliği ER stresinin artmasına ve nöronal uyarılabilirliğin azalmasına sebep olmaktadır <sup>9</sup>. *POMCMfn1<sup>-/-</sup>* farelerde mitokondriyal yapıda bozukluklar olduğu ve glukoz duyarlılığının azaldığı belirtilmiştir <sup>433</sup>.

Çalışmamızda *Fam163a*'nın sessizleştirilmesi *Mfn1* ifadesinde anlamlı azalmaya sebep olurken *Mfn2* ifadesi değişmemiştir. MFN1 öncelikli olarak dış mitokondriyal membran füzyonunda rol alır ve mitokondriyal füzyonu teşvik etmede genellikle

MFN2'den daha etkilidir <sup>434</sup>. Farelerde *Mfn1*'in silinmesi, mitokondriyal füzyonda bozulmaya sebep olur ve embriyonik gelişim sırasında ölümle sonuçlanır <sup>435</sup>. *Mfn1* gibi *Mfn2* de füzyonda rol almakta olup <sup>436</sup>, ER ve mitokondri arasındaki lipid değişimi ve mitokondriyal kalsiyum alımı için önemli olan iki organel arasındaki bağlantıda kilit rol oynar <sup>437</sup>. ARC'de *Fam163a*'nın silinmesi sonucu azalan *Mfn1* ifadesi, FAM163A'nın mitokondriyal füzyonda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak *Mfn2*'nin transkripsiyonu, mitokondriyal biyogeneze anahtar proteinler olan PGC-1 $\alpha$  ve PGC-1 $\beta$ 'nin ERR $\alpha$  ile gerçekleştirdiği fiziksel etkileşim ile arttırılmaktadır <sup>401,438</sup>. *Pgc-1 $\alpha$* , *Pgc-1 $\beta$*  ve *ERR $\alpha$*  ifadesinde farklılık görülmemesi *Mfn2* ifadesinin her iki grupta da benzer bulunmasını açıklayabilir.

*Mfn1* ve *Mfn2*, mtDNA kopya sayısını ve mitokondriyal RNA (mtRNA) miktarını düzenleyen ana transkripsiyon faktörü *Tfam* ifadesinin korunmasını sağlar <sup>439</sup>.  $\beta$  hücrelerinde *Mfn1* ve *Mfn2*'nin ikili olarak silinmesinin *Tfam* ifadesinde anlamlı azalmaya sebep olduğu gösterilmiş olup, bu iki genin tekli olarak silindiği  $\beta$  hücrelerinde *Tfam* ifadesi anlamlı olarak değişmemiştir <sup>439</sup>. ARC'de *Fam163a* sessizleştirilmesi sonucu gözlemlediğimiz *Mfn1* ifadesindeki azalmaya paralel olarak azalan *Tfam* ifadesi, ARC'de *Tfam* ifadesinin düzenlenmesinde *Mfn1*'in *Mfn2*'ye kıyasla daha baskın bir rolü olabileceğini düşündürebilir. Benzer şekilde rotenon uygulaması sonucunda *Tfam* ifadesi azalmıştır. Bir rotenon indüklü Parkinson hastalığı modeli çalışmasında PGC-1 $\alpha$ , NRF-1 ve TFAM protein seviyelerinde anlamlı şekilde azalma gözlenmiştir <sup>440</sup>. Buna karşın *Mfn1* ifadesinde anlamlı artış gözlenmiştir. Bu durumun sebebi hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını takiben azalan mitokondriyal enerji üretiminin kompanse edilmesi için mitokondriyal füzyonun artmasının sağlanmaya çalışılması olabilir.

UCP2'nin enerji depolama ve harcama dengesini düzenlemede özel bir role sahip olduğu ve vücudun obezite ve diyabete duyarlılığını etkileyebileceği belirtilmiştir <sup>441</sup>. UCP2'nin mitokondrideki temel işlevi, mitokondriyal iç zar boyunca proton sızıntısını kolaylaştırmak ve metabolik enerjiyi dağıtmaktır <sup>441</sup>. Bu eylem ATP üretimini azaltır ve termojenezi arttırır <sup>442</sup>. Artan proton sızıntısı ayrıca  $\Delta\psi_m$ 'yi azaltarak ROS üretimini azaltabilir <sup>443</sup>. Çalışmamızda *Fam163a*'nın silinmesi *Ucp2* ifadesinde neredeyse anlamlı şekilde bir artışa sebep olmuştur. Fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada intrakraniyal grelin uygulaması sonucunda artan AgRP nöron aktivitesinin, besin tüketiminin ve azalan ROS miktarının UCP2 bağımlı olduğu gösterilmiştir <sup>444</sup>. Bunun

yanında POMC*Ucp2*<sup>-/-</sup> farelerde glukoz metabolizmasında bozulma, POMC nöron aktivitesinde azalma, mitokondriyal fonksiyon ve morfolojide bozulmaya gözlenmiştir <sup>445</sup>. ARC’de *Fam163a*’nın sessizleştirildiği farelerde, bölgedeki *Ucp2* ifadesindeki azalış besin alımını pozitif yönde etkiliyor olabilir <sup>445</sup>. İlk yedi günlük dönemde görülen kümülatif besin alımındaki artış bu durumla açıklanabilir. Ayrıca kümülatif besin tüketiminin uzun dönemde kontrol grubuyla eşitlenmesi, ARC’deki besin tüketiminden sorumlu nöronal devrelerde ve/veya nöronlara gelen hormonal sinyallerin yanıtlarında meydana aktivite değişikliği ile açıklanabilir. İnsülin ve leptin gibi hormonlar POMC ve AgRP nöronlarında bulunan reseptörlere bağlanarak bu nöronlardaki mitokondriyal dinamikleri düzenleyebilir <sup>432</sup>. Çalışmamızda hem kontrol hem de *Fam163a* KD grubunda insülin seviyeleri benzer bulunmuştur. *Drp1*’in POMC nöronlarında indüklenebilir delesyonu nöronal aktivasyonu ve mitokondriyal boyut ve yoğunluğu artırırken bu nöronların leptine duyarlılığını arttırmıştır <sup>432</sup>. AgRP nöronlarında ise *Mfn2* delesyonunun dolaşımdaki leptin seviyelerinde azalmaya neden olduğu <sup>8</sup>, *Drp1* delesyonunun ise AgRP nöronlarının aktivitesinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir <sup>446</sup>. Bir diğer çalışmada ise POMC nöronlarında *Mfn2* yokluğunun daha az  $\alpha$ -MSH üretimine yol açtığı ve bu nöronların leptine karşı direnç geliştirmesine sebep olduğu belirtilmiştir <sup>9</sup>. Çalışmamızda ARC’deki *Mfn1* ifadesi anlamlı şekilde azalırken *Mfn2* ifadesi değişmemiştir. Ayrıca AgRP nöronlarının ateşleme frekansı da *Fam163a*’nın sessizleştirilmesi sonrası anlamlı derecede düşmüştür. ARC’de *Mfn1*’deki azalma sonucu azalan mitokondriyal füzyon ve dolaşımdaki hali hazırda bulunan leptine karşı AgRP nöronlarının artan yanıtı AgRP nöronlarındaki aktivitenin azalmasını açıklayabilir. Ayrıca, *Mfn2* ifadesinin değişmemesi durumu da leptinin POMC nöron aktivitesi üzerinde bir değişikliğe sebep olmayarak AgRP nöronlarının baskılanmasına sebep olabilir. Ancak çalışmamızda, *Fam163a* KD shRNA lentiviral vektör ile uygulandığı ve bölgedeki farklı nöronal ve gliyal popülasyonu etkileyebileceğinden meydana gelen bu durumların hangi hücre grubu veya hormonal düzenlenmenin sonucu olarak gerçekleştiğinin açığa kavuşturulması, nöron spesifik *Fam163a* silinmesini takiben yapılacak çalışmalarla gerçekleştirilebilir.

Cullin3 tabanlı bir E3 ubiquitin ligaz kompleksi için bir adaptör proteini olan KEAP1, normal koşullar altında NRF2’yi hedefleyerek proteazomal yıkıma götürür <sup>160</sup>. Oksidatif stres durumunda KEAP1’de NRF2 bozulmasını önleyen değişiklikler meydana gelir. NRF2 daha sonra, HO-1 de dahil olmak üzere antioksidan yanıt elementi (ARE)

taşıyan genler için bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gördüğü çekirdeğe transloke olur <sup>302</sup>. KEAP1 ekspresyonundaki artışın, NRF2'nin bozulmasını arttırması, böylece HO-1 gibi ARE genlerinin aktivasyonunu azaltması beklenebilir <sup>447</sup>. Ancak, bu her zaman böyle değildir. Bunun bir nedeni, KEAP1 seviyelerindeki bir artışa rağmen, KEAP1 aracılı bozunma yolunun doygunluğu nedeniyle, bozulan NRF2 miktarının sabit kalması olabilir <sup>448</sup>. Bu nedenle, KEAP1 seviyelerindeki bir artış, NRF2 seviyelerinde veya HO-1 ifadesinde orantılı bir azalmaya yol açmayabilir <sup>448</sup>.

PINK1 ve PARKIN, mitokondriyal kalite kontrol ve hücre sel sağlıkla yakından ilgili proteinler olup bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar Parkinson hastalığı ile ilişkilendirilmiştir <sup>449,450</sup>. Genel olarak, sağlıklı bir hücrede, PINK1 sağlıklı mitokondriye aktarılıp degrade edilirken, Parkin sitozolde kalır <sup>451</sup>. Bununla birlikte, bir mitokondri hasar gördüğünde, PINK1 taşınması bloke edilir ve Parkin'in lokalize olabileceği dış mitokondriyal zar üzerinde birikmesine izin verilir <sup>450</sup>. Bir ubiquitin E3 ligaz olan Parkin, daha sonra, mitofaji olarak bilinen bir süreç yoluyla hasarlı mitokondrinin degradasyonun sağlanması için işaretler <sup>450</sup>. Çalışmamızda ARC'de *Fam163a* sessizleştirilmesi sonrası PINK1 ifadesi anlamlı şekilde azalırken PARKIN ifadesi anlamlı şekilde yükselmiştir. PARKIN'in artma yönünde düzenlenmesi, PINK1 eksikliğine telafi edici bir yanıt olarak ortaya çıkabilir <sup>452</sup>. Hücrede azalan PINK1 işlevini PARKIN miktarını artırarak telafi etmeye çalışabilir, artan PARKIN'in daha az etkili olsa da yine de mitofajiyi indüklemeye çalışabilir <sup>453,454</sup>. Bunun yanında farklı faktörler (stres, oksidatif hasar veya farklı sinyal molekülleri gibi) bu iki genin ekspresyonunu farklı şekilde düzenleyebilir. PINK1'in azalma yönünde düzenlenmesi ve PARKIN'in artma yönünde düzenlenmesine neden olabilecek transkripsiyon sonrası veya translasyon sonrası bir düzenleme olması da mümkündür <sup>452</sup>. p62'nin ubiquitinlenmiş kargoyu (PARKIN tarafından etiketlenen hasarlı mitokondri gibi) tanıdığı ve ona bağlandığı ve onu bozulması için otofagozoma getirdiği göz önüne alındığında, p62'nin azalma yönünde düzenlenmesi, PARKIN artma yönünde düzenlense bile bu hasarlı mitokondrilerin temizlenmesini bozabilir <sup>455,456</sup>. Bu nedenle, PARKIN'in artma yönünde düzenlenmesine rağmen, yetersiz p62 nedeniyle genel mitofaji sürecinde problem çıkabilir. Bunun yanında rotenon uygulaması sonrası PINK1 ifadesi anlamlı şekilde yükselmiştir. Bazı araştırmalarda rotenona maruziyeti sonrası, koruyucu bir mekanizma olarak PINK1'in artma yönünde düzenlenebileceği öne sürülmüştür <sup>457</sup>. Mitokondriyal hasar olduğunda, PINK1 dış mitokondriyal zar üzerinde birikir ve E3 ubiquitin ligaz

Parkin'e bağlanarak mitofaji ile hasarlı mitokondrinin yıkımını sağlar, böylece işlevsiz mitokondri birikimini ve hücre ölüm sinyallerinin yayılmasını önler <sup>452</sup>.

Çalışmamızda hem *Fam163a* sessizleştirilmesi hem de ARC'ye rotenon uygulanması sonucunda AgRP nöronlarının ateşleme frekansında azalma gözlemledik. Hipotalamik mitokondriyal dinamikler AgRP ve POMC nöronal aktivitesinin düzenlenmesi yoluyla enerji homeostazında yer alır <sup>8,9</sup>. Farelerde yapılan bir çalışmada aç bırakılan hayvanların AgRP nöronlarında artan sayıda ve azalmış mitokondri boyutu gözlenmiştir <sup>8</sup>. Bunun yanında aç bırakılan fareler fazla besine maruz bırakıldığında AgRP nöronlarında mitokondri sayısında azalma görüldü ancak boyutlarında artış görülmüştür <sup>8</sup>. Mitokondri ilişkili gen ifadesi analizleri de göz önüne alındığında hem *Fam163a* sessizleştirilmesi hem de rotenon uygulamasının AgRP nöronlarının ateşleme frekansını düşürüyor olması *Fam163a*'nın AgRP nöronlarının aktivitesini mitokondri üzerinden sürdürüyor olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, ARC'de mitokondriyal aktivitenin bozulması AgRP nöronlarının ateşleme frekansında düşüşe ve ARC'de mitokondri ile ilişkili genlerin ifadesinde bozulmaya sebep olmaktadır. FAM163A'nın mitokondri ile ilişkili genleri regüle ederek AgRP nöron aktivitesini düzenleyen bir faktör olabileceği düşünülmektedir. *Fam163a* sessizleştirilmesi kısa dönemde besin alımını arttırmaktadır. Uzun dönemde besin alımının kontrol grubu hayvanlarla eşitlenmesi, bölgedeki nöral ağlarda meydana gelen bir kompensasyon mekanizması yoluyla gerçekleşebilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Caron A, Richard D. Neuronal systems and circuits involved in the control of food intake and adaptive thermogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017. 1391(1):p. 35-53.
2. Gautron L, Elmquist JK, Williams KW. Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell*. 2015. 161(1):p. 133-145.
3. Richard D. Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. *Nature reviews Endocrinology*. 2015. 11(8):p. 489-501.
4. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000. 404(6778):p. 661-671.
5. Mattson MP. A reaction to mitochondria in action. *Cell Res*. 2011. 21(9):p. 1279-1282.
6. Klein Gunnewiek TM, Van Hugte EJH, Frega M, et al. m.3243A > G-Induced Mitochondrial Dysfunction Impairs Human Neuronal Development and Reduces Neuronal Network Activity and Synchronicity. *Cell Rep*. 2020. 31(3):p. 107538.
7. Kann O, Kovacs R. Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007. 292(2):p. C641-57.
8. Dietrich MO, Liu ZW, Horvath TL. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate AgRP neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell*. 2013. 155(1):p. 188-99.
9. Schneeberger M, Dietrich MO, Sebastián D, et al. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell*. 2013. 155(1):p. 172-87.
10. Vasudevan SA, Shang X, Chang S, et al. Neuroblastoma-derived secretory protein is a novel secreted factor overexpressed in neuroblastoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2009. 8(8):p. 2478-89.
11. Miwa H, Itoh N. Unknown genes, Cebelin and Cebelin-like, predominantly expressed in mouse brain. *Heliyon*. 2018. 4(9):p. e00773.

12. Qiao GJ, Chen L, Wu JC, Li ZR. Identification of an eight-gene signature for survival prediction for patients with hepatocellular carcinoma based on integrated bioinformatics analysis. *PeerJ*. 2019. 7;p. e6548.
  13. Prados J, Stenz L, Courtet P, et al. Borderline personality disorder and childhood maltreatment: a genome-wide methylation analysis. *Genes, brain, and behavior*. 2015. 14(2);p. 177-88.
  14. Kober P, Boresowicz J, Rusetska N, et al. The Role of Aberrant DNA Methylation in Misregulation of Gene Expression in Gonadotroph Nonfunctioning Pituitary Tumors. *Cancers*. 2019. 11(11);p.
  15. Tsai TS, Tyagi S, St John JC. The molecular characterisation of mitochondrial DNA deficient oocytes using a pig model. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2018. 33(5);p. 942-953.
  16. Ronci M, Pieroni L, Greco V, et al. Sequential Fractionation Strategy Identifies Three Missing Proteins in the Mitochondrial Proteome of Commonly Used Cell Lines. *Journal of proteome research*. 2018. 17(12);p. 4307-4314.
  17. Liu N, Zhou H, Zhang X, et al. FAM163A, a positive regulator of ERK signaling pathway, interacts with 14-3-3 $\beta$  and promotes cell proliferation in squamous cell lung carcinoma. *OncoTargets and therapy*. 2019. 12;p. 6393-6406.
  18. He K, Aizenman E. ERK signaling leads to mitochondrial dysfunction in extracellular zinc-induced neurotoxicity. *J Neurochem*. 2010. 114(2);p. 452-61.
  19. Duncan OF, Granat L, Ranganathan R, et al. Ras-ERK-ETS inhibition alleviates neuronal mitochondrial dysfunction by reprogramming mitochondrial retrograde signaling. *PLoS Genet*. 2018. 14(7);p. e1007567.
  20. Shahid Z, Asuka E, Singh G. Physiology, Hypothalamus. *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
21. Pop MG, Crivii C, Opincariu I. Anatomy and function of the hypothalamus. *Hypothalamus in health and diseases*. 2018.p.

22. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*. 2016. 6(2):p. 603-21.
23. Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Comprehensive Physiology*. 2016. 6(3):p. 1387-428.
24. Dagklis T, Ravanos K, Makedou K, Kourtis A, Rousso D. Common features and differences of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male and female. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2015. 31(1):p. 14-7.
25. Grattan DR. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *The Journal of endocrinology*. 2015. 226(2):p. T101-22.
26. Rohrbasser LJ, Alsaffar H, Blair J. The Hypothalamus–Pituitary Axis. In: Belfiore A, LeRoith D, eds. *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. Springer International Publishing; 2018:287-321.
27. Zhao ZD, Yang WZ, Gao C, et al. A hypothalamic circuit that controls body temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. 114(8):p. 2042-2047.
28. Lozić M, Šarenac O, Murphy D, Japundžić-Žigon N. Vasopressin, Central Autonomic Control and Blood Pressure Regulation. *Current hypertension reports*. 2018. 20(2):p. 11.
29. Bruinstroop E, Fliers E, Kalsbeek A. Hypothalamic control of hepatic lipid metabolism via the autonomic nervous system. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2014. 28(5):p. 673-84.
30. Seoane-Collazo P, Fernø J, Gonzalez F, et al. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*. 2015. 50(2):p. 276-91.
31. Timper K, Brüning JC. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Disease models & mechanisms*. 2017. 10(6):p. 679-689.

32. Fang YY, Yamaguchi T, Song SC, Tritsch NX, Lin D. A Hypothalamic Midbrain Pathway Essential for Driving Maternal Behaviors. *Neuron*. 2018. 98(1):p. 192-207.e10.
33. Dietrichs E, Haines DE. Interconnections between hypothalamus and cerebellum. *Anatomy and embryology*. 1989. 179(3):p. 207-20.
34. Carstens E, Leah J, Lechner J, Zimmermann M. Demonstration of extensive brainstem projections to medial and lateral thalamus and hypothalamus in the rat. *Neuroscience*. 1990. 35(3):p. 609-26.
35. Kagan R, Kainz V, Burstein R, Nosedá R. Hypothalamic and basal ganglia projections to the posterior thalamus: possible role in modulation of migraine headache and photophobia. *Neuroscience*. 2013. 248:p. 359-68.
36. Ono T, Luiten PG, Nishijo H, Fukuda M, Nishino H. Topographic organization of projections from the amygdala to the hypothalamus of the rat. *Neuroscience research*. 1985. 2(4):p. 221-38.
37. Reppucci CJ, Petrovich GD. Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: a single and double retrograde tracing study in rats. *Brain structure & function*. 2016. 221(6):p. 2937-62.
38. Cui Z, Gerfen CR, Young WS, 3rd. Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. *The Journal of comparative neurology*. 2013. 521(8):p. 1844-66.
39. Pasquier DA, Reinoso-Suarez F. Direct projections from hypothalamus to hippocampus in the rat demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain research*. 1976. 108(1):p. 165-9.
40. Price JL, Slotnick BM, Revial MF. Olfactory projections to the hypothalamus. *The Journal of comparative neurology*. 1991. 306(3):p. 447-61.
41. Pickard GE, Silverman AJ. Direct retinal projections to the hypothalamus, piriform cortex, and accessory optic nuclei in the golden hamster as demonstrated by a sensitive anterograde horseradish peroxidase technique. *The Journal of comparative neurology*. 1981. 196(1):p. 155-72.

42. Kudo M, Yamamoto M, Nakamura Y. Suprachiasmatic nucleus and retinohypothalamic projections in moles. *Brain, behavior and evolution*. 1991. 38(6):p. 332-8.
43. Ongür D, An X, Price JL. Prefrontal cortical projections to the hypothalamus in macaque monkeys. *The Journal of comparative neurology*. 1998. 401(4):p. 480-505.
44. Nilaver G, Hoffman DL, Zimmerman EA. Multiple projections of the magnocellular hypothalamus to other brain regions including cerebral cortex. *Transactions of the American Neurological Association*. 1979. 104:p. 205-8.
45. Cechetto DF, Saper CB. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 1988. 272(4):p. 579-604.
46. Tucker DC, Saper CB. Specificity of spinal projections from hypothalamic and brainstem areas which innervate sympathetic preganglionic neurons. *Brain research*. 1985. 360(1-2):p. 159-64.
47. Badoer E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2001. 28(1-2):p. 95-9.
48. Coote JH. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. *Experimental physiology*. 2005. 90(2):p. 169-73.
49. Dampney RA, Michelini LC, Li DP, Pan HL. Regulation of sympathetic vasomotor activity by the hypothalamic paraventricular nucleus in normotensive and hypertensive states. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2018. 315(5):p. H1200-h1214.
50. Bosch OJ, Neumann ID. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. *Hormones and behavior*. 2012. 61(3):p. 293-303.
51. Melis MR, Argiolas A, Gessa GL. Oxytocin-induced penile erection and yawning: site of action in the brain. *Brain research*. 1986. 398(2):p. 259-65.
52. Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nature reviews Neuroscience*. 2011. 12(9):p. 524-38.

53. Baribeau DA, Anagnostou E. Oxytocin and vasopressin: linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits. *Frontiers in neuroscience*. 2015. 9:p. 335.
54. Caldwell HK. Oxytocin and Vasopressin: Powerful Regulators of Social Behavior. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2017. 23(5):p. 517-528.
55. Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiological reviews*. 2012. 92(4):p. 1813-64.
56. Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2008. 12(6):p. 717-27.
57. Eliava M, Melchior M, Knobloch-Bollmann HS, et al. A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron*. 2016. 89(6):p. 1291-1304.
58. Maejima Y, Takahashi S, Takasu K, Takenoshita S, Ueta Y, Shimomura K. Orexin action on oxytocin neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroreport*. 2017. 28(6):p. 360-366.
59. Langhans W, Delprete E, Scharrer E. Mechanisms of vasopressin's anorectic effect. *Physiology & behavior*. 1991. 49(1):p. 169-76.
60. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012. 488(7410):p. 172-7.
61. Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*. 2005. 123(3):p. 493-505.
62. Shah BP, Vong L, Olson DP, et al. MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. 111(36):p. 13193-8.

63. Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature neuroscience*. 2008. 11(9):p. 998-1000.
64. Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutrition & metabolism*. 2007. 4:p. 18.
65. Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, et al. Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology*. 2003. 144(8):p. 3547-54.
66. Lin MT, Chu PC, Leu SY. Effects of TSH, TRH, LH and LHRH on thermoregulation and food and water intake in the rat. *Neuroendocrinology*. 1983. 37(3):p. 206-11.
67. Wang L, Moenter SM. Differential Roles of Hypothalamic AVPV and Arcuate Kisspeptin Neurons in Estradiol Feedback Regulation of Female Reproduction. *Neuroendocrinology*. 2020. 110(3-4):p. 172-184.
68. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006. 147(12):p. 5817-25.
69. Roth C, Leonhardt S, Seidel C, Lakomek M, Wuttke W, Jarry H. GnRH antagonist cetrorelix prevents sexual maturation of peripubertal male rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2000. 108(5):p. 358-63.
70. Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H. Central Mechanism Controlling Pubertal Onset in Mammals: A Triggering Role of Kisspeptin. *Frontiers in endocrinology*. 2019. 10:p. 312.
71. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005. 437(7063):p. 1257-63.
72. Rossi MA, Stuber GD. Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell metabolism*. 2018. 27(1):p. 42-56.
73. Minokoshi Y. Neural Control of Homeostatic Feeding and Food Selection. In: Takada A, ed. *New Insights Into Metabolic Syndrome*. London; 2020.

74. Vohra MS, Benchoula K, Serpell CJ, Hwa WE. AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *European journal of pharmacology*. 2022. 915:p. 174611.
75. Andermann ML, Lowell BB. Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. *Neuron*. 2017. 95(4):p. 757-778.
76. Rau AR, Hentges ST. The Relevance of AgRP Neuron-Derived GABA Inputs to POMC Neurons Differs for Spontaneous and Evoked Release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2017. 37(31):p. 7362-7372.
77. Dicken MS, Hughes AR, Hentges ST. Gad1 mRNA as a reliable indicator of altered GABA release from orexigenic neurons in the hypothalamus. *The European journal of neuroscience*. 2015. 42(9):p. 2644-53.
78. Haskell-Luevano C, Chen P, Li C, et al. Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology*. 1999. 140(3):p. 1408-15.
79. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science (New York, NY)*. 1997. 278(5335):p. 135-8.
80. Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Lüthy R, Stark KL. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes & development*. 1997. 11(5):p. 593-602.
81. Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes & development*. 2000. 14(8):p. 963-80.
82. Somogyi V, Gyorffy A, Scalise TJ, et al. Endocrine factors in the hypothalamic regulation of food intake in females: a review of the physiological roles and interactions of ghrelin, leptin, thyroid hormones, oestrogen and insulin. *Nutr Res Rev*. 2011. 24(1):p. 132-54.
83. Kim JD, Leyva S, Diano S. Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front Physiol*. 2014. 5:p. 480.
84. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997. 272(10):p. 6093-6.

85. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995. 83(7):p. 1263-71.
86. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996. 84(3):p. 491-5.
87. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, et al. The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett*. 1997. 224(3):p. 149-52.
88. Hussain Z, Khan JA. Food intake regulation by leptin: Mechanisms mediating gluconeogenesis and energy expenditure. *Asian Pac J Trop Med*. 2017. 10(10):p. 940-944.
89. Cohen P, Zhao C, Cai X, et al. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest*. 2001. 108(8):p. 1113-21.
90. de Luca C, Kowalski TJ, Zhang Y, et al. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J Clin Invest*. 2005. 115(12):p. 3484-93.
91. Balthasar N, Coppari R, McMinn J, et al. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*. 2004. 42(6):p. 983-91.
92. van de Wall E, Leshan R, Xu AW, et al. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology*. 2008. 149(4):p. 1773-85.
93. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001. 411(6836):p. 480-4.
94. Perry RJ, Resch JM, Douglass AM, et al. Leptin's hunger-suppressing effects are mediated by the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in rodents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019. 116(27):p. 13670-13679.
95. Honda K, Kamisoyama H, Saneyasu T, Sugahara K, Hasegawa S. Central administration of insulin suppresses food intake in chicks. *Neurosci Lett*. 2007. 423(2):p. 153-7.

96. Hallschmid M, Higgs S, Thienel M, Ott V, Lehnert H. Postprandial administration of intranasal insulin intensifies satiety and reduces intake of palatable snacks in women. *Diabetes*. 2012. 61(4):p. 782-9.
97. Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*. 1992. 130(6):p. 3608-16.
98. Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*. 1995. 44(2):p. 147-51.
99. Benoit SC, Air EL, Coolen LM, et al. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002. 22(20):p. 9048-52.
100. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science (New York, NY)*. 2000. 289(5487):p. 2122-5.
101. Könner AC, Janoschek R, Plum L, et al. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell metabolism*. 2007. 5(6):p. 438-49.
102. Loh K, Zhang L, Brandon A, et al. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. *Mol Metab*. 2017. 6(6):p. 574-584.
103. Dodd GT, Kim SJ, Méquinion M, et al. Insulin signaling in AgRP neurons regulates meal size to limit glucose excursions and insulin resistance. *Sci Adv*. 2021. 7(9):p.
104. Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nature reviews Neuroscience*. 2001. 2(8):p. 551-60.
105. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004. 101(13):p. 4679-84.
106. Willesen MG, Kristensen P, Rømer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*. 1999. 70(5):p. 306-16.

107. Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001. 409(6817):p. 194-8.
108. Wang Q, Liu C, Uchida A, et al. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol Metab*. 2014. 3(1):p. 64-72.
109. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*. 2001. 50(11):p. 2438-43.
110. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. 2001. 50(2):p. 227-32.
111. Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003. 37(4):p. 649-61.
112. Seoane LM, López M, Tovar S, Casanueva FF, Señarís R, Diéguez C. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 2003. 144(2):p. 544-51.
113. van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature neuroscience*. 2004. 7(5):p. 493-4.
114. Chen SR, Chen H, Zhou JJ, et al. Ghrelin receptors mediate ghrelin-induced excitation of agouti-related protein/neuropeptide Y but not pro-opiomelanocortin neurons. *J Neurochem*. 2017. 142(4):p. 512-520.
115. Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*. 2004. 145(6):p. 2607-12.
116. Yavuz S, Salgado Nunez Del Prado S, Celi FS. Thyroid Hormone Action and Energy Expenditure. *J Endocr Soc*. 2019. 3(7):p. 1345-1356.
117. Amin A, Dhillo WS, Murphy KG. The central effects of thyroid hormones on appetite. *J Thyroid Res*. 2011. 2011:p. 306510.

118. Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. *Neuroendocrinology*. 2003. 78(6):p. 321-30.
119. Coppola A, Hughes J, Esposito E, Schiavo L, Meli R, Diano S. Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Lett*. 2005. 579(21):p. 4654-8.
120. Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, et al. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell metabolism*. 2007. 5(1):p. 21-33.
121. Tatemoto K. Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982. 79(8):p. 2514-8.
122. Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Hayakawa T. Feedback regulation of pancreatic secretion by peptide YY. *Peptides*. 2002. 23(2):p. 359-65.
123. Imamura M. Effects of surgical manipulation of the intestine on peptide YY and its physiology. *Peptides*. 2002. 23(2):p. 403-7.
124. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*. 2002. 418(6898):p. 650-4.
125. Chelikani PK, Haver AC, Reeve JR, Jr., Keire DA, Reidelberger RD. Daily, intermittent intravenous infusion of peptide YY(3-36) reduces daily food intake and adiposity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006. 290(2):p. R298-305.
126. Talsania T, Anini Y, Siu S, Drucker DJ, Brubaker PL. Peripheral exendin-4 and peptide YY(3-36) synergistically reduce food intake through different mechanisms in mice. *Endocrinology*. 2005. 146(9):p. 3748-56.
127. Scott V, Kimura N, Stark JA, Luckman SM. Intravenous peptide YY3-36 and Y2 receptor antagonism in the rat: effects on feeding behaviour. *J Neuroendocrinol*. 2005. 17(7):p. 452-7.

128. Jones ES, Nunn N, Chambers AP, Østergaard S, Wulff BS, Luckman SM. Modified Peptide YY Molecule Attenuates the Activity of NPY/AgRP Neurons and Reduces Food Intake in Male Mice. *Endocrinology*. 2019. 160(11):p. 2737-2747.
129. Acuna-Goycolea C, van den Pol AN. Peptide YY(3-36) inhibits both anorexigenic proopiomelanocortin and orexigenic neuropeptide Y neurons: implications for hypothalamic regulation of energy homeostasis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005. 25(45):p. 10510-9.
130. Ghamari-Langroudi M, Colmers WF, Cone RD. PYY3-36 inhibits the action potential firing activity of POMC neurons of arcuate nucleus through postsynaptic Y2 receptors. *Cell metabolism*. 2005. 2(3):p. 191-9.
131. Challis BG, Pinnock SB, Coll AP, Carter RN, Dickson SL, O'Rahilly S. Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 311(4):p. 915-9.
132. Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*. 1995. 56(2):p. 117-26.
133. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996. 379(6560):p. 69-72.
134. Meeran K, O'Shea D, Edwards CM, et al. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*. 1999. 140(1):p. 244-50.
135. He Z, Gao Y, Lieu L, et al. Direct and indirect effects of liraglutide on hypothalamic POMC and NPY/AgRP neurons - Implications for energy balance and glucose control. *Mol Metab*. 2019. 28:p. 120-134.
136. Secher A, Jelsing J, Baquero AF, et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest*. 2014. 124(10):p. 4473-88.
137. Péterfi Z, Szilvásy-Szabó A, Farkas E, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Regulates the Proopiomelanocortin Neurons of the Arcuate Nucleus both Directly and Indirectly via Presynaptic Action. *Neuroendocrinology*. 2021. 111(10):p. 986-997.

138. Ghatei MA, Uttenthal LO, Christofides ND, Bryant MG, Bloom SR. Molecular forms of human enteroglucagon in tissue and plasma: plasma responses to nutrient stimuli in health and in disorders of the upper gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983. 57(3):p. 488-95.
139. Le Quellec A, Kervran A, Blache P, Ciurana AJ, Bataille D. Oxyntomodulin-like immunoreactivity: diurnal profile of a new potential enterogastrone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992. 74(6):p. 1405-9.
140. Dakin CL, Gunn I, Small CJ, et al. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology.* 2001. 142(10):p. 4244-50.
141. Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, et al. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology.* 2004. 145(6):p. 2687-95.
142. Pocai A. Action and therapeutic potential of oxyntomodulin. *Mol Metab.* 2014. 3(3):p. 241-51.
143. Larsson LI, Rehfeld JF. Distribution of gastrin and CCK cells in the rat gastrointestinal tract. Evidence for the occurrence of three distinct cell types storing COOH-terminal gastrin immunoreactivity. *Histochemistry.* 1978. 58(1-2):p. 23-31.
144. Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides.* 1994. 15(4):p. 731-55.
145. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiological reviews.* 2005. 85(4):p. 1131-58.
146. Beutler LR, Chen Y, Ahn JS, Lin YC, Essner RA, Knight ZA. Dynamics of Gut-Brain Communication Underlying Hunger. *Neuron.* 2017. 96(2):p. 461-475.e5.
147. Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *The Journal of comparative neurology.* 2010. 518(7):p. 943-62.
148. Joly-Amado A, Cansell C, Denis RG, et al. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2014. 28(5):p. 725-37.

149. Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, et al. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature reviews Neuroscience*. 2011. 12(3):p. 169-82.
150. Djogo T, Robins SC, Schneider S, et al. Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. *Cell metabolism*. 2016. 23(5):p. 797-810.
151. Haddad-Tóvolli R, Dragano NRV, Ramalho AFS, Velloso LA. Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Frontiers in neuroscience*. 2017. 11:p. 224.
152. Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*. 1982. 296(5858):p. 659-60.
153. Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, et al. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature*. 1983. 306(5943):p. 584-6.
154. Allen YS, Adrian TE, Allen JM, et al. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science (New York, NY)*. 1983. 221(4613):p. 877-9.
155. Bär F, Föh B, Pagel R, et al. Carboxypeptidase E modulates intestinal immune homeostasis and protects against experimental colitis in mice. *PLoS One*. 2014. 9(7):p. e102347.
156. Choi B, Shin MK, Kim EY, et al. Elevated Neuropeptide Y in Endothelial Dysfunction Promotes Macrophage Infiltration and Smooth Muscle Foam Cell Formation. *Front Immunol*. 2019. 10:p. 1701.
157. Medina S, Del Río M, Hernanz A, De la Fuente M. Age-related changes in the neuropeptide Y effects on murine lymphoproliferation and interleukin-2 production. *Peptides*. 2000. 21(9):p. 1403-9.
158. Benque IJ, Xia P, Shannon R, Ng TF, Taylor AW. The Neuropeptides of Ocular Immune Privilege,  $\alpha$ -MSH and NPY, Suppress Phagosome Maturation in Macrophages. *Immunohorizons*. 2018. 2(10):p. 314-323.

159. Xapelli S, Agasse F, Ferreira R, Silva AP, Malva JO. Neuropeptide Y as an endogenous antiepileptic, neuroprotective and pro-neurogenic peptide. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2006. 1(3):p. 315-24.
160. Acuna-Goycolea C, Tamamaki N, Yanagawa Y, Obata K, van den Pol AN. Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2005. 25(32):p. 7406-19.
161. Diaz-delCastillo M, Woldbye DPD, Heegaard AM. Neuropeptide Y and its Involvement in Chronic Pain. *Neuroscience.* 2018. 387:p. 162-169.
162. Li C, Wu X, Liu S, Zhao Y, Zhu J, Liu K. Roles of Neuropeptide Y in Neurodegenerative and Neuroimmune Diseases. *Frontiers in neuroscience.* 2019. 13:p. 869.
163. Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, et al. An arcuate-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain research.* 1985. 331(1):p. 172-5.
164. Leibowitz SF. Brain neuropeptide Y: an integrator of endocrine, metabolic and behavioral processes. *Brain Res Bull.* 1991. 27(3-4):p. 333-7.
165. Morley JE, Levine AS, Gosnell BA, Kneip J, Grace M. Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol.* 1987. 252(3 Pt 2):p. R599-609.
166. Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes.* 1999. 48(4):p. 828-33.
167. Baskin DG, Schwartz MW, Seeley RJ, et al. Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *J Histochem Cytochem.* 1999. 47(3):p. 353-62.
168. Krashes MJ, Shah BP, Madara JC, et al. An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature.* 2014. 507(7491):p. 238-42.

169. Zhang L, Ip CK, Lee IJ, et al. Diet-induced adaptive thermogenesis requires neuropeptide FF receptor-2 signalling. *Nat Commun*. 2018. 9(1):p. 4722.
170. van den Pol AN, Yao Y, Fu LY, et al. Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009. 29(14):p. 4622-39.
171. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. 95(25):p. 15043-8.
172. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience*. 1998. 1(4):p. 271-2.
173. Dietrich MO, Bober J, Ferreira JG, et al. AgRP neurons regulate development of dopamine neuronal plasticity and nonfood-associated behaviors. *Nature neuroscience*. 2012. 15(8):p. 1108-10.
174. Campbell JN, Macosko EZ, Fenselau H, et al. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nature neuroscience*. 2017. 20(3):p. 484-496.
175. Chen R, Wu X, Jiang L, Zhang Y. Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep*. 2017. 18(13):p. 3227-3241.
176. Zhang L, Hernandez-Sanchez D, Herzog H. Regulation of Feeding-Related Behaviors by Arcuate Neuropeptide Y Neurons. *Endocrinology*. 2019. 160(6):p. 1411-1420.
177. Wu Q, Howell MP, Palmiter RD. Ablation of neurons expressing agouti-related protein activates fos and gliosis in postsynaptic target regions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008. 28(37):p. 9218-26.
178. Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell*. 2009. 137(7):p. 1225-34.

179. Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL. Overexpression of AgRP leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet.* 1997. 17(3):p. 273-4.
180. Rossi M, Kim MS, Morgan DG, et al. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology.* 1998. 139(10):p. 4428-31.
181. Gropp E, Shanabrough M, Borok E, et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature neuroscience.* 2005. 8(10):p. 1289-91.
182. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science (New York, NY).* 2005. 310(5748):p. 683-5.
183. Bewick GA, Gardiner JV, Dhillo WS, et al. Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *Faseb j.* 2005. 19(12):p. 1680-2.
184. Krashes MJ, Koda S, Ye C, et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest.* 2011. 121(4):p. 1424-8.
185. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience.* 2011. 14(3):p. 351-5.
186. Steculorum SM, Ruud J, Karakasilioti I, et al. AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue. *Cell.* 2016. 165(1):p. 125-138.
187. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017. 482(3):p. 426-431.
188. Madan S, Uttekar B, Chowdhary S, Rikhy R. Mitochondria Lead the Way: Mitochondrial Dynamics and Function in Cellular Movements in Development and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021. 9:p. 781933.
189. Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol.* 2004. 7(3):p. 254-61.
190. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019. 44(1):p. 3-15.

191. Sharma LK, Lu J, Bai Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem*. 2009. 16(10):p. 1266-77.
192. Henriques BJ, Katrine Jentoft Olsen R, Gomes CM, Bross P. Electron transfer flavoprotein and its role in mitochondrial energy metabolism in health and disease. *Gene*. 2021. 776:p. 145407.
193. Sarewicz M, Osyczka A. Electronic connection between the quinone and cytochrome C redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling. *Physiological reviews*. 2015. 95(1):p. 219-43.
194. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol*. 2020. 37:p. 101674.
195. Manoj KM, Bazhin NM, Tamagawa H, Jaeken L, Parashar A. The physiological role of complex V in ATP synthesis: Murzyme functioning is viable whereas rotary conformation change model is untenable. *J Biomol Struct Dyn*. 2022.p. 1-20.
196. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 2020. 11(1):p. 102.
197. Arnold PK, Finley LWS. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem*. 2023. 299(2):p. 102838.
198. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012. 148(6):p. 1145-59.
199. Cheng Z, Ristow M. Mitochondria and metabolic homeostasis. *Antioxid Redox Signal*. 2013. 19(3):p. 240-2.
200. Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell*. 2017. 66(6):p. 780-788.
201. Boyman L, Lederer WJ. How the mitochondrial calcium uniporter complex (MCU(cx)) works. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020. 117(37):p. 22634-22636.
202. Foskett JK, Philipson B. The mitochondrial Ca(2+) uniporter complex. *J Mol Cell Cardiol*. 2015. 78:p. 3-8.

203. Pathak T, Trebak M. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Pharmacol Ther.* 2018. 192:p. 112-123.
204. Shan H, Wei J, Zhang M, et al. Calreticulin is localized at mitochondria of rat cardiomyocytes and affected by furazolidone. *Mol Cell Biochem.* 2014. 397(1-2):p. 125-30.
205. Matuz-Mares D, González-Andrade M, Araiza-Villanueva MG, Vilchis-Landeros MM, Vázquez-Meza H. Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. *Antioxidants (Basel).* 2022. 11(5):p.
206. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. 13(9):p. 566-78.
207. Palty R, Silverman WF, Hershfinkel M, et al. NCLX is an essential component of mitochondrial  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010. 107(1):p. 436-41.
208. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 2015. 6:p. 260-271.
209. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009. 417(1):p. 1-13.
210. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014. 24(10):p. R453-62.
211. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017. 44(2):p. 532-553.
212. Checa J, Aran JM. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res.* 2020. 13:p. 1057-1073.
213. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol.* 2020. 11:p. 694.
214. Soledad RB, Charles S, Samarjit D. The secret messages between mitochondria and nucleus in muscle cell biology. *Arch Biochem Biophys.* 2019. 666:p. 52-62.

215. Walker BR, Moraes CT. Nuclear-Mitochondrial Interactions. *Biomolecules*. 2022. 12(3):p.
216. Guha M, Avadhani NG. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. *Mitochondrion*. 2013. 13(6):p. 577-91.
217. Mielecki J, Gawroński P, Karpiński S. Retrograde Signaling: Understanding the Communication between Organelles. *Int J Mol Sci*. 2020. 21(17):p.
218. He C, Liew LC, Yin L, Lewsey MG, Whelan J, Berkowitz O. The retrograde signaling regulator ANAC017 recruits the MKK9-MPK3/6, ethylene, and auxin signaling pathways to balance mitochondrial dysfunction with growth. *Plant Cell*. 2022. 34(9):p. 3460-3481.
219. da Cunha FM, Torelli NQ, Kowaltowski AJ. Mitochondrial Retrograde Signaling: Triggers, Pathways, and Outcomes. *Oxid Med Cell Longev*. 2015. 2015:p. 482582.
220. Granat L, Hunt RJ, Bateman JM. Mitochondrial retrograde signalling in neurological disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2020. 375(1801):p. 20190415.
221. Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, et al. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca<sup>2+</sup> release and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. 105(7):p. 2427-32.
222. Koundouros N, Poulogiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer. *Front Oncol*. 2018. 8:p. 160.
223. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2016. 1863(12):p. 2977-2992.
224. Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia. *Int J Mol Sci*. 2021. 22(18):p.
225. Nishida M, Yamashita N, Ogawa T, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger metformin-dependent antitumor immunity via activation of Nrf2/mTORC1/p62 axis in tumor-infiltrating CD8T lymphocytes. *J Immunother Cancer*. 2021. 9(9):p.

226. Kim JH, Choi TG, Park S, et al. Mitochondrial ROS-derived PTEN oxidation activates PI3K pathway for mTOR-induced myogenic autophagy. *Cell Death Differ.* 2018. 25(11):p. 1921-1937.
227. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med.* 2007. 80(2):p. 51-60.
228. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell.* 2010. 40(2):p. 294-309.
229. Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2009. 21(6):p. 894-9.
230. Lum JJ, Bui T, Gruber M, et al. The transcription factor HIF-1 $\alpha$  plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & development.* 2007. 21(9):p. 1037-49.
231. Nguyen LK, Cavadas MA, Scholz CC, et al. A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) network. *J Cell Sci.* 2013. 126(Pt 6):p. 1454-63.
232. Taylor CT, Scholz CC. The effect of HIF on metabolism and immunity. *Nat Rev Nephrol.* 2022. 18(9):p. 573-587.
233. Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest.* 2022. 132(11):p.
234. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism.* 2006. 3(3):p. 177-85.
235. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017. 2:p. 17023-.
236. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009. 1(4):p. a000034.
237. Lingappan K. NF- $\kappa$ B in Oxidative Stress. *Curr Opin Toxicol.* 2018. 7:p. 81-86.
238. Nakajima S, Kitamura M. Bidirectional regulation of NF- $\kappa$ B by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radic Biol Med.* 2013. 65:p. 162-174.

239. Pirinen E, Lo Sasso G, Auwerx J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2012. 26(6):p. 759-70.
240. Lombard DB, Tishkoff DX, Bao J. Mitochondrial sirtuins in the regulation of mitochondrial activity and metabolic adaptation. *Handb Exp Pharmacol*. 2011. 206:p. 163-88.
241. Zhao L, Cao J, Hu K, et al. Sirtuins and their Biological Relevance in Aging and Age-Related Diseases. *Aging Dis*. 2020. 11(4):p. 927-945.
242. Sack MN, Finkel T. Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012. 4(12):p.
243. Ji Z, Liu GH, Qu J. Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. *J Genet Genomics*. 2022. 49(4):p. 287-298.
244. Zhang J, Xiang H, Liu J, Chen Y, He RR, Liu B. Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics*. 2020. 10(18):p. 8315-8342.
245. Ansari A, Rahman MS, Saha SK, Saikot FK, Deep A, Kim KH. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell*. 2017. 16(1):p. 4-16.
246. Pannek M, Simic Z, Fuszard M, et al. Crystal structures of the mitochondrial deacylase Sirtuin 4 reveal isoform-specific acyl recognition and regulation features. *Nat Commun*. 2017. 8(1):p. 1513.
247. Tomaselli D, Steegborn C, Mai A, Rotili D. Sirt4: A Multifaceted Enzyme at the Crossroads of Mitochondrial Metabolism and Cancer. *Front Oncol*. 2020. 10:p. 474.
248. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*. 2006. 126(5):p. 941-54.
249. Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K, et al. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. *Cell metabolism*. 2017. 25(4):p. 838-855.e15.

250. Kumar S, Lombard DB. Functions of the sirtuin deacylase SIRT5 in normal physiology and pathobiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2018. 53(3):p. 311-334.
251. Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, Pagliei B, Rotilio G, Ciriolo MR. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem*. 2010. 285(28):p. 21590-9.
252. Tang BL. Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells*. 2016. 39(2):p. 87-95.
253. Zhou Y, Wang S, Li Y, Yu S, Zhao Y. SIRT1/PGC-1 $\alpha$  Signaling Promotes Mitochondrial Functional Recovery and Reduces Apoptosis after Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Front Mol Neurosci*. 2017. 10:p. 443.
254. Cantó C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009. 20(2):p. 98-105.
255. Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett*. 2008. 582(1):p. 46-53.
256. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011. 93(4):p. 884s-90.
257. Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*. 2015. 42(3):p. 406-17.
258. Herb M, Schramm M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants (Basel)*. 2021. 10(2):p.
259. Canton M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, et al. Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Front Immunol*. 2021. 12:p. 734229.
260. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014. 20(7):p. 1126-67.
261. Haddad JJ. Science review: Redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for nuclear factor-kappaB. *Crit Care*. 2002. 6(6):p. 481-90.
262. Morris G, Gevezova M, Sarafian V, Maes M. Redox regulation of the immune response. *Cell Mol Immunol*. 2022. 19(10):p. 1079-1101.

263. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* 2020. 6:p. 36.
264. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019. 19(8):p. 477-489.
265. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011. 469(7329):p. 221-5.
266. Gurung P, Lukens JR, Kanneganti TD. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome. *Trends Mol Med.* 2015. 21(3):p. 193-201.
267. Liu Q, Zhang D, Hu D, Zhou X, Zhou Y. The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Mol Immunol.* 2018. 103:p. 115-124.
268. van der Windt GJ, Pearce EL. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev.* 2012. 249(1):p. 27-42.
269. Patsoukis N, Bardhan K, Weaver J, et al. The role of metabolic reprogramming in T cell fate and function. *Curr Trends Immunol.* 2016. 17:p. 1-12.
270. Liang K. Mitochondrial CPT1A: Insights into structure, function, and basis for drug development. *Front Pharmacol.* 2023. 14:p. 1160440.
271. Wang M, Wang K, Liao X, et al. Carnitine Palmitoyltransferase System: A New Target for Anti-Inflammatory and Anticancer Therapy? *Front Pharmacol.* 2021. 12:p. 760581.
272. O'Sullivan D, van der Windt GJ, Huang SC, et al. Memory CD8(+) T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development. *Immunity.* 2014. 41(1):p. 75-88.
273. Qing J, Zhang Z, Novák P, Zhao G, Yin K. Mitochondrial metabolism in regulating macrophage polarization: an emerging regulator of metabolic inflammatory diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2020. 52(9):p. 917-926.
274. Sun JX, Xu XH, Jin L. Effects of Metabolism on Macrophage Polarization Under Different Disease Backgrounds. *Front Immunol.* 2022. 13:p. 880286.

275. Calle P, Muñoz A, Sola A, Hotter G. CPT1a gene expression reverses the inflammatory and anti-phagocytic effect of 7-ketocholesterol in RAW264.7 macrophages. *Lipids Health Dis.* 2019. 18(1):p. 215.
276. Kim SJ, Ahn DG, Syed GH, Siddiqui A. The essential role of mitochondrial dynamics in antiviral immunity. *Mitochondrion.* 2018. 41:p. 21-27.
277. Koshiba T. Mitochondrial-mediated antiviral immunity. *Biochim Biophys Acta.* 2013. 1833(1):p. 225-32.
278. Wang M, Zhao Y, Liu J, Li T. SARS-CoV-2 modulation of RIG-I-MAVS signaling: Potential mechanisms of impairment on host antiviral immunity and therapeutic approaches. <https://doi.org/10.1002/mef2.29>. *MedComm – Future Medicine.* 2022. 1(2):p. e29.
279. Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity.* 2011. 34(5):p. 680-92.
280. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol.* 2020. 20(9):p. 537-551.
281. Thoresen D, Wang W, Galls D, Guo R, Xu L, Pyle AM. The molecular mechanism of RIG-I activation and signaling. *Immunol Rev.* 2021. 304(1):p. 154-168.
282. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018. 25(1):p. 65-80.
283. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013. 5(4):p. a008714.
284. Campisi L, Cummings RJ, Blander JM. Death-defining immune responses after apoptosis. *Am J Transplant.* 2014. 14(7):p. 1488-98.
285. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019. 20(3):p. 175-193.
286. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007. 35(4):p. 495-516.
287. Kharechkina E, Nikiforova A, Kruglov A. NAD(H) Regulates the Permeability Transition Pore in Mitochondria through an External Site. *Int J Mol Sci.* 2021. 22(16):p.

288. Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci.* 2004. 95(8):p. 644-50.
289. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016. 6(3):p. a026104.
290. Han J, Goldstein LA, Hou W, Gastman BR, Rabinowich H. Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J Biol Chem.* 2010. 285(29):p. 22473-83.
291. Marchenko ND, Moll UM. Mitochondrial death functions of p53. *Mol Cell Oncol.* 2014. 1(2):p. e955995.
292. Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development.* 2008. 22(12):p. 1577-90.
293. Sheridan C, Martin SJ. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion.* 2010. 10(6):p. 640-8.
294. Yu R, Lendahl U, Nistér M, Zhao J. Regulation of Mammalian Mitochondrial Dynamics: Opportunities and Challenges. *Frontiers in endocrinology.* 2020. 11:p. 374.
295. Kushnareva Y, Moraes V, Suess J, Peters B, Newmeyer DD, Kuwana T. Disruption of mitochondrial quality control genes promotes caspase-resistant cell survival following apoptotic stimuli. *J Biol Chem.* 2022. 298(4):p. 101835.
296. Ma Y, Wang L, Jia R. The role of mitochondrial dynamics in human cancers. *Am J Cancer Res.* 2020. 10(5):p. 1278-1293.
297. Galluzzi L, Kepp O, Chan FK, Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol.* 2017. 12:p. 103-130.
298. Yang M, Chen W, He L, Liu D, Zhao L, Wang X. A Glimpse of necroptosis and diseases. *Biomed Pharmacother.* 2022. 156:p. 113925.
299. Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ.* 2017. 24(7):p. 1184-1195.

300. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018. 25(3):p. 486-541.
301. Rayamajhi M, Miao EA. The RIP1-RIP3 complex initiates mitochondrial fission to fuel NLRP3. *Nat Immunol.* 2014. 15(12):p. 1100-2.
302. Dan S, Duan X, Yu X, Zang J, Liu L, Wu G. PGAM5 regulates DRP1-mediated mitochondrial fission/mitophagy flux in lipid overload-induced renal tubular epithelial cell necroptosis. *Toxicol Lett.* 2023. 372:p. 14-24.
303. Nam BY, Jhee JH, Park J, et al. PGC-1 $\alpha$  inhibits the NLRP3 inflammasome via preserving mitochondrial viability to protect kidney fibrosis. *Cell Death Dis.* 2022. 13(1):p. 31.
304. Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, et al. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *J Clin Invest.* 2014. 124(9):p. 3987-4003.
305. Rao Z, Zhu Y, Yang P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer. *Theranostics.* 2022. 12(9):p. 4310-4329.
306. Miller DR, Cramer SD, Thorburn A. The interplay of autophagy and non-apoptotic cell death pathways. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2020. 352:p. 159-187.
307. Darwesh AM, Keshavarz-Bahaghighat H, Jamieson KL, Seubert JM. Genetic Deletion or Pharmacological Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Ameliorates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Attenuating NLRP3 Inflammasome Activation. *Int J Mol Sci.* 2019. 20(14):p.
308. Kelley N, Jeltama D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019. 20(13):p.
309. Zhang W, Li G, Luo R, et al. Cytosolic escape of mitochondrial DNA triggers cGAS-STING-NLRP3 axis-dependent nucleus pulposus cell pyroptosis. *Exp Mol Med.* 2022. 54(2):p. 129-142.
310. Nakahira K, Hisata S, Choi AM. The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2015. 23(17):p. 1329-50.

311. Peng X, Zhang C, Zhou ZM, et al. A20 attenuates pyroptosis and apoptosis in nucleus pulposus cells via promoting mitophagy and stabilizing mitochondrial dynamics. *Inflamm Res*. 2022. 71(5-6):p. 695-710.
312. Wang W, Zhao B, Gao W, et al. Inhibition of PINK1-Mediated Mitophagy Contributes to Postoperative Cognitive Dysfunction through Activation of Caspase-3/GSDME-Dependent Pyroptosis. *ACS Chem Neurosci*. 2023. 14(7):p. 1249-1260.
313. Kuang F, Liu J, Tang D, Kang R. Oxidative Damage and Antioxidant Defense in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2020. 8:p. 586578.
314. Chen X, Yu C, Kang R, Tang D. Iron Metabolism in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2020. 8:p. 590226.
315. Zhang Q, Tamura Y, Roy M, Adachi Y, Iijima M, Sesaki H. Biosynthesis and roles of phospholipids in mitochondrial fusion, division and mitophagy. *Cell Mol Life Sci*. 2014. 71(19):p. 3767-78.
316. Yan HF, Zou T, Tuo QZ, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021. 6(1):p. 49.
317. Lill R, Hoffmann B, Molik S, et al. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2012. 1823(9):p. 1491-508.
318. Stehling O, Lill R. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013. 5(8):p. a011312.
319. Wu H, Wang F, Ta N, Zhang T, Gao W. The Multifaceted Regulation of Mitochondria in Ferroptosis. *Life (Basel)*. 2021. 11(3):p.
320. Zhang S, Xin W, Anderson GJ, et al. Double-edge sword roles of iron in driving energy production versus instigating ferroptosis. *Cell Death Dis*. 2022. 13(1):p. 40.
321. Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res*. 2021. 31(2):p. 107-125.
322. Liu M, Fan Y, Li D, et al. Ferroptosis inducer erastin sensitizes NSCLC cells to celastrol through activation of the ROS-mitochondrial fission-mitophagy axis. *Mol Oncol*. 2021. 15(8):p. 2084-2105.

323. Granata S, Votrico V, Spadaccino F, et al. Oxidative Stress and Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Focus on Ferroptosis, Mitophagy and New Antioxidants. *Antioxidants (Basel)*. 2022. 11(4):p.
324. Bonora M, Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front Oncol*. 2014. 4:p. 302.
325. Kinnally KW, Peixoto PM, Ryu SY, Dejean LM. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim Biophys Acta*. 2011. 1813(4):p. 616-22.
326. Kwong JQ, Molkentin JD. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell metabolism*. 2015. 21(2):p. 206-214.
327. Noguchi M, Hirata N, Tanaka T, Suizu F, Nakajima H, Chiorini JA. Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death Dis*. 2020. 11(7):p. 517.
328. Ploumi C, Papandreou ME, Tavernarakis N. The complex interplay between autophagy and cell death pathways. *Biochem J*. 2022. 479(1):p. 75-90.
329. Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ*. 2015. 22(3):p. 367-76.
330. Ma K, Chen G, Li W, Kepp O, Zhu Y, Chen Q. Mitophagy, Mitochondrial Homeostasis, and Cell Fate. *Front Cell Dev Biol*. 2020. 8:p. 467.
331. Thomas RL, Gustafsson AB. Mitochondrial autophagy--an essential quality control mechanism for myocardial homeostasis. *Circ J*. 2013. 77(10):p. 2449-54.
332. Wang Y, Kim NS, Haince JF, et al. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal*. 2011. 4(167):p. ra20.
333. Alano CC, Garnier P, Ying W, Higashi Y, Kauppinen TM, Swanson RA. NAD<sup>+</sup> depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010. 30(8):p. 2967-78.
334. Holze C, Michaudel C, Mackowiak C, et al. Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nat Immunol*. 2018. 19(2):p. 130-140.

335. Pallichankandy S, Thayyullathil F, Cheratta AR, et al. Targeting oxeiptosis-mediated tumor suppression: a novel approach to treat colorectal cancers by sanguinarine. *Cell Death Discov.* 2023. 9(1):p. 94.
336. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 2011. 16(2):p. 123-40.
337. Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem.* 2005. 280(37):p. 32485-92.
338. Song JJ, Rhee JG, Suntharalingam M, Walsh SA, Spitz DR, Lee YJ. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem.* 2002. 277(48):p. 46566-75.
339. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2003. 23(22):p. 8137-51.
340. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol.* 2013. 85(6):p. 705-17.
341. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009. 47(9):p. 1304-9.
342. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 2018. 62(3):p. 341-360.
343. Di Nottia M, Verrigni D, Torraco A, Rizza T, Bertini E, Carrozzo R. Mitochondrial Dynamics: Molecular Mechanisms, Related Primary Mitochondrial Disorders and Therapeutic Approaches. *Genes (Basel).* 2021. 12(2):p.
344. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol.* 2016. 212(4):p. 379-87.
345. Ren L, Chen X, Chen X, Li J, Cheng B, Xia J. Mitochondrial Dynamics: Fission and Fusion in Fate Determination of Mesenchymal Stem Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2020. 8:p. 580070.

346. Adebayo M, Singh S, Singh AP, Dasgupta S. Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. *Faseb j*. 2021. 35(6):p. e21620.
347. Twig G, Elorza A, Molina AJ, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo j*. 2008. 27(2):p. 433-46.
348. Rong Z, Tu P, Xu P, et al. The Mitochondrial Response to DNA Damage. Mini Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. 9:p.
349. Liu YJ, McIntyre RL, Janssens GE, Houtkooper RH. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mech Ageing Dev*. 2020. 186:p. 111212.
350. Ranieri M, Brajkovic S, Riboldi G, et al. Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurol Res Int*. 2013. 2013:p. 293893.
351. Cohen MM, Taresté D. Recent insights into the structure and function of Mitofusins in mitochondrial fusion. *F1000Res*. 2018. 7:p.
352. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*. 2007. 178(5):p. 749-55.
353. Wang R, Mishra P, Garbis SD, Moradian A, Sweredoski MJ, Chan DC. Identification of new OPA1 cleavage site reveals that short isoforms regulate mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell*. 2021. 32(2):p. 157-168.
354. Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell*. 2009. 20(15):p. 3525-32.
355. Del Dotto V, Mishra P, Vidoni S, et al. OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell Rep*. 2017. 19(12):p. 2557-2571.
356. Ban T, Heymann JA, Song Z, Hinshaw JE, Chan DC. OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum Mol Genet*. 2010. 19(11):p. 2113-22.
357. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*. 2013. 155(1):p. 160-71.

358. Pyakurel A, Savoia C, Hess D, Scorrano L. Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis. *Mol Cell*. 2015. 58(2):p. 244-54.
359. Escobar-Henriques M. Mitofusins: ubiquitylation promotes fusion. *Cell Res*. 2014. 24(4):p. 387-8.
360. Rakovic A, Grünewald A, Kottwitz J, et al. Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PLoS One*. 2011. 6(3):p. e16746.
361. Kim C, Juncker M, Reed R, et al. SUMOylation of mitofusins: A potential mechanism for perinuclear mitochondrial congression in cells treated with mitochondrial stressors. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021. 1867(6):p. 166104.
362. Anand R, Wai T, Baker MJ, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol*. 2014. 204(6):p. 919-29.
363. Griparic L, Kanazawa T, van der Bliek AM. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol*. 2007. 178(5):p. 757-64.
364. Nagdas S, Kashatus DF. The Interplay between Oncogenic Signaling Networks and Mitochondrial Dynamics. *Antioxidants (Basel)*. 2017. 6(2):p.
365. Kan S, Pi C, Zhang L, et al. FGF19 increases mitochondrial biogenesis and fusion in chondrocytes via the AMPK $\alpha$ -p38/MAPK pathway. *Cell Commun Signal*. 2023. 21(1):p. 55.
366. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001. 12(8):p. 2245-56.
367. Ansari MY, Novak K, Haqqi TM. ERK1/2-mediated activation of DRP1 regulates mitochondrial dynamics and apoptosis in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022. 30(2):p. 315-328.
368. Chen Z, Ma Y, Yang Q, et al. AKAP1 mediates high glucose-induced mitochondrial fission through the phosphorylation of Drp1 in podocytes. *J Cell Physiol*. 2020. 235(10):p. 7433-7448.

369. Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2008. 19(6):p. 2402-12.
370. Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep*. 2011. 12(6):p. 565-73.
371. Otera H, Wang C, Cleland MM, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2010. 191(6):p. 1141-58.
372. Liu R, Chan DC. The mitochondrial fission receptor Mff selectively recruits oligomerized Drp1. *Mol Biol Cell*. 2015. 26(24):p. 4466-77.
373. Ingeman E, Perkins EM, Marino M, et al. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol*. 2005. 170(7):p. 1021-7.
374. Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingeman E, Nunnari J, Hinshaw JE. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*. 2011. 18(1):p. 20-6.
375. Xu L, Wang X, Tong C. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contact Sites and Neurodegeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2020. 8:p. 428.
376. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. 105(41):p. 15803-8.
377. Han XJ, Lu YF, Li SA, et al. CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol*. 2008. 182(3):p. 573-85.
378. Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science (New York, NY)*. 2013. 339(6118):p. 464-7.
379. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science (New York, NY)*. 2011. 334(6054):p. 358-62.

380. Li J, Wang Y, Wang Y, et al. Pharmacological activation of AMPK prevents Drp1-mediated mitochondrial fission and alleviates endoplasmic reticulum stress-associated endothelial dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 2015. 86:p. 62-74.
381. Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, et al. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science (New York, NY).* 2016. 351(6270):p. 275-281.
382. Ježek J, Cooper KF, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants (Basel).* 2018. 7(1):p.
383. Kashatus JA, Nascimento A, Myers LJ, et al. Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell.* 2015. 57(3):p. 537-51.
384. Zunino R, Schauss A, Rippstein P, Andrade-Navarro M, McBride HM. The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci.* 2007. 120(Pt 7):p. 1178-88.
385. Cho DH, Nakamura T, Fang J, et al. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science (New York, NY).* 2009. 324(5923):p. 102-5.
386. Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet.* 2009. 18(R2):p. R169-76.
387. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. 11(12):p. 872-84.
388. Yapa NMB, Lisnyak V, Reljic B, Ryan MT. Mitochondrial dynamics in health and disease. *FEBS Lett.* 2021. 595(8):p. 1184-1204.
389. Tanaka A, Cleland MM, Xu S, et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol.* 2010. 191(7):p. 1367-80.
390. Wang H, Song P, Du L, et al. Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2011. 286(13):p. 11649-58.

391. Wen X, Tang L, Zhong R, Liu L, Chen L, Zhang H. Role of Mitophagy in Regulating Intestinal Oxidative Damage. *Antioxidants (Basel)*. 2023. 12(2):p.
392. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*. 2011. 13(5):p. 589-98.
393. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*. 2007. 282(15):p. 11521-9.
394. Sheng ZH, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature reviews Neuroscience*. 2012. 13(2):p. 77-93.
395. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010. 121(18):p. 2012-22.
396. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*. 2011. 91(4):p. 1447-531.
397. Picca A, Mankowski RT, Burman JL, et al. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. *Nat Rev Cardiol*. 2018. 15(9):p. 543-554.
398. Bohovych I, Chan SS, Khalimonchuk O. Mitochondrial protein quality control: the mechanisms guarding mitochondrial health. *Antioxid Redox Signal*. 2015. 22(12):p. 977-94.
399. Ding Q, Qi Y, Tsang SY. Mitochondrial Biogenesis, Mitochondrial Dynamics, and Mitophagy in the Maturation of Cardiomyocytes. *Cells*. 2021. 10(9):p.
400. Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, Ortega Á L, Pérez S. PGC-1 $\alpha$ , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid Med Cell Longev*. 2020. 2020:p. 1452696.
401. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2012. 23(9):p. 459-66.

402. Kang I, Chu CT, Kaufman BA. The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms. *FEBS Lett.* 2018. 592(5):p. 793-811.
403. de la Cruz López KG, Toledo Guzmán ME, Sánchez EO, García Carrancá A. mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. *Front Oncol.* 2019. 9:p. 1373.
404. Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell.* 2008. 132(2):p. 171-6.
405. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol.* 2018. 28(4):p. R170-r185.
406. Sekine S. PINK1 import regulation at a crossroad of mitochondrial fate: the molecular mechanisms of PINK1 import. *J Biochem.* 2020. 167(3):p. 217-224.
407. Durcan TM, Fon EA. The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. *Genes & development.* 2015. 29(10):p. 989-99.
408. Zhang J, Ney PA. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ.* 2009. 16(7):p. 939-46.
409. Wilhelm LP, Zapata-Muñoz J, Villarejo-Zori B, et al. BNIP3L/NIX regulates both mitophagy and pexophagy. *Embo j.* 2022. 41(24):p. e111115.
410. Zhang W. The mitophagy receptor FUN14 domain-containing 1 (FUNDC1): A promising biomarker and potential therapeutic target of human diseases. *Genes Dis.* 2021. 8(5):p. 640-654.
411. Li G, Li J, Shao R, Zhao J, Chen M. FUNDC1: A Promising Mitophagy Regulator at the Mitochondria-Associated Membrane for Cardiovascular Diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2021. 9:p. 788634.
412. Chu CT, Ji J, Dagda RK, et al. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol.* 2013. 15(10):p. 1197-1205.
413. Melber A, Haynes CM. UPR(mt) regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res.* 2018. 28(3):p. 281-295.

414. Muñoz-Carvajal F, Sanhueza M. The Mitochondrial Unfolded Protein Response: A Hinge Between Healthy and Pathological Aging. *Front Aging Neurosci.* 2020. 12;p. 581849.
415. Gupta RC. Rotenone. In: Wexler P, ed. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Academic Press; 2014:185-187.
416. Heinz S, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Ellinger-Ziegelbauer H. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Sci Rep.* 2017. 7;p. 45465.
417. Stowe DF, Camara AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2009. 11(6);p. 1373-414.
418. Giordano S, Dodson M, Ravi S, et al. Bioenergetic adaptation in response to autophagy regulators during rotenone exposure. *J Neurochem.* 2014. 131(5);p. 625-33.
419. Xiao B, Kuruvilla J, Tan EK. Mitophagy and reactive oxygen species interplay in Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.* 2022. 8(1);p. 135.
420. Oprea TI. Exploring the dark genome: implications for precision medicine. *Mammalian Genome.* 2019. 30(7);p. 192-200.
421. Cai T, Lim H, Abbu KA, Qiu Y, Nussinov R, Xie L. Genome-wide Prediction of Small Molecule Binding to Remote Orphan Proteins Using Distilled Sequence Alignment Embedding. *bioRxiv.* 2020.p. 2020.08.04.236729.
422. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res.* 2015. 4(3);p. 256-269.
423. McWilliam H, Li W, Uludag M, et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research.* 2013. 41(Web Server issue);p. W597-600.
424. Chen YL, Li XL, Li G, et al. BRD4 inhibitor GNE987 exerts anti-cancer effects by targeting super-enhancers in neuroblastoma. *Cell Biosci.* 2022. 12(1);p. 33.
425. Jin S, Diano S. Mitochondrial Dynamics and Hypothalamic Regulation of Metabolism. *Endocrinology.* 2018. 159(10);p. 3596-3604.

426. Lindfors C, Nilsson IA, Garcia-Roves PM, et al. Hypothalamic mitochondrial dysfunction associated with anorexia in the anx/anx mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. 108(44):p. 18108-13.
427. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol*. 2019. 1916:p. 99-103.
428. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol*. 2019. 1916:p. 69-74.
429. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013. 3(3):p. 71-85.
430. Motulsky HJ, Brown RE. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics*. 2006. 7:p. 123.
431. Cunarro J, Casado S, Lugilde J, Tovar S. Hypothalamic Mitochondrial Dysfunction as a Target in Obesity and Metabolic Disease. *Frontiers in endocrinology*. 2018. 9:p. 283.
432. Haigh JL, New LE, Filippi BM. Mitochondrial Dynamics in the Brain Are Associated With Feeding, Glucose Homeostasis, and Whole-Body Metabolism. *Frontiers in endocrinology*. 2020. 11:p. 580879.
433. Ramírez S, Gómez-Valadés AG, Schneeberger M, et al. Mitochondrial Dynamics Mediated by Mitofusin 1 Is Required for POMC Neuron Glucose-Sensing and Insulin Release Control. *Cell metabolism*. 2017. 25(6):p. 1390-1399.e6.
434. Scorrano L. Mitochondrial Apoptosis Regulation by Bcl-2 Family Members. In: McManus LM, Mitchell RN, eds. *Pathobiology of Human Disease*. Academic Press; 2014:170-174.
435. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*. 2003. 160(2):p. 189-200.

436. Scorrano L. Mitochondrial Dynamics. In: Lennarz WJ, Lane MD, eds. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*. Academic Press; 2013:135-139.
437. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008. 456(7222):p. 605-10.
438. Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacín M, Zorzano A. Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes*. 2006. 55(6):p. 1783-91.
439. Sidarala V, Zhu J, Levi-D'Ancona E, et al. Mitofusin 1 and 2 regulation of mitochondrial DNA content is a critical determinant of glucose homeostasis. *Nat Commun*. 2022. 13(1):p. 2340.
440. Zhang X, Du L, Zhang W, Yang Y, Zhou Q, Du G. Therapeutic effects of baicalein on rotenone-induced Parkinson's disease through protecting mitochondrial function and biogenesis. *Sci Rep*. 2017. 7(1):p. 9968.
441. Li J, Jiang R, Cong X, Zhao Y. UCP2 gene polymorphisms in obesity and diabetes, and the role of UCP2 in cancer. *FEBS Lett*. 2019. 593(18):p. 2525-2534.
442. Bertholet AM, Kirichok Y. Mitochondrial H(+) Leak and Thermogenesis. *Annu Rev Physiol*. 2022. 84:p. 381-407.
443. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*. 2000. 26(4):p. 435-9.
444. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, et al. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*. 2008. 454(7206):p. 846-51.
445. Yoon NA, Jin S, Kim JD, et al. UCP2-dependent redox sensing in POMC neurons regulates feeding. *Cell Rep*. 2022. 41(13):p. 111894.
446. Jin S, Yoon NA, Liu ZW, et al. Drp1 is required for AgRP neuronal activity and feeding. *Elife*. 2021. 10:p.
447. Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol*. 2020. 40(13):p.

448. Liu S, Pi J, Zhang Q. Mathematical modeling reveals quantitative properties of KEAP1-NRF2 signaling. *Redox Biol.* 2021. 47:p. 102139.
449. Gonçalves FB, Morais VA. PINK1: A Bridge between Mitochondria and Parkinson's Disease. *Life (Basel)*. 2021. 11(5):p.
450. Ge P, Dawson VL, Dawson TM. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2020. 15(1):p. 20.
451. Truban D, Hou X, Caulfield TR, Fiesel FC, Springer W. PINK1, Parkin, and Mitochondrial Quality Control: What can we Learn about Parkinson's Disease Pathobiology? *J Parkinsons Dis.* 2017. 7(1):p. 13-29.
452. Quinn PMJ, Moreira PI, Ambrósio AF, Alves CH. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta Neuropathol Commun.* 2020. 8(1):p. 189.
453. Vizziello M, Borellini L, Franco G, Ardolino G. Disruption of Mitochondrial Homeostasis: The Role of PINK1 in Parkinson's Disease. *Cells.* 2021. 10(11):p.
454. Narendra D, Walker JE, Youle R. Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012. 4(11):p.
455. Wurzer B, Zaffagnini G, Fracchiolla D, et al. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *Elife.* 2015. 4:p. e08941.
456. Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy.* 2010. 6(8):p. 1090-106.
457. Rojas-Charry L, Cookson MR, Niño A, Arboleda H, Arboleda G. Downregulation of Pink1 influences mitochondrial fusion-fission machinery and sensitizes to neurotoxins in dopaminergic cells. *Neurotoxicology.* 2014. 44:p. 140-8.

## 7. EKLER

### 7.1. ETİK KURUL KARARI



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)

#### ETİK KURUL KARARI

| Protokol No                                                                                                                                                                                                                                  | Toplantı Tarihi | Toplantı Sayısı      | Karar No  | Proje Yürütücüsü        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------|-----------|-------------------------|
| 2020-875                                                                                                                                                                                                                                     | 30.10.2020      | 2020/10              | 2020/10-5 | Prof. Dr. Bayram Yılmaz |
| 'Hipotalamik Arkuat Çekirdekte FAM163A Proteininin ve Mitokondriyal Aktivitenin Beslenme Davranışı Üzerine Etkilerinin <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> Modellerde Araştırılması' isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür. |                 |                      |           |                         |
| Hayvan Türü / Irkı                                                                                                                                                                                                                           |                 | Toplam Hayvan Sayısı |           | Hayvanın Cinsiyeti      |
| Fare / AgRP                                                                                                                                                                                                                                  |                 | 112                  |           | Erkek                   |

| Görevi        | Adı Soyadı                      | Katılım Durumu |
|---------------|---------------------------------|----------------|
| Başkan        | Prof. Dr. Bayram YILMAZ         |                |
| Başkan Vekili | Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA        |                |
| Üye           | Dr. Veteriner Hekim Engin SÜMER |                |
| Üye           | Prof. Dr. M. Ece GENÇ           |                |
| Üye           | Prof. Dr. Rukset ATTAR          |                |
| Üye           | Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE      |                |
| Üye           | Doç. Dr. Ediz DENİZ             |                |
| Üye           | Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR        |                |
| Üye           | Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL     |                |
| Üye           | Hakan GÖKSEL                    |                |
| Üye           | Ahmet ŞENKARDEŞLER              |                |



T.C.  
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)

### ETİK KURUL KARARI

| Protokol No                                                                                                                                                                                                                                | Toplantı Tarihi | Toplantı Sayısı      | Karar No   | Proje Yürütücüsü      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------|------------|-----------------------|
| 2022-49                                                                                                                                                                                                                                    | 13.12.2022      | 2022/12              | 2022/12-01 | Prof.Dr.Bayram Yılmaz |
| 'Hipotalamik Arkuat Çekirdekte FAM163A Proteinin ve Mitokondriyal Aktivitenin Beslenme Davranışı Üzerine Etkilerinin <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> Modellerde Araştırılması' isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür. |                 |                      |            |                       |
| Hayvan Türü / Irkı                                                                                                                                                                                                                         |                 | Toplam Hayvan Sayısı |            | Hayvanın Cinsiyeti    |
| Fare / C57BL                                                                                                                                                                                                                               |                 | 28                   |            | Erkek                 |

| Görevi        | Adı Soyadı                  | Katılım Durumu |
|---------------|-----------------------------|----------------|
| Başkan        | Prof. Dr. Bayram YILMAZ     |                |
| Başkan Vekili | Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA    |                |
| Üye           | Dr. Engin SÜMER             |                |
| Üye           | Prof. Dr. M. Ece GENÇ       |                |
| Üye           | Prof. Dr. Rukset ATTAR      |                |
| Üye           | Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE  |                |
| Üye           | Prof. Dr. Özlem MALKONDU    |                |
| Üye           | Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR    |                |
| Üye           | Doç. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL |                |
| Üye           | Atakan Mücahit YAVUZ        |                |
| Üye           | Ahmet ŞENKARDEŞLER          |                |

## 7.2. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|     |                |        |         |
|-----|----------------|--------|---------|
| Adı | Cihan Süleyman | Soyadı | Erdoğan |
|-----|----------------|--------|---------|

### Öğrenim Durumu

| Derece        | Alan                                        | Mezun Olduğu Kurumun Adı     | Mezuniyet Yılı |
|---------------|---------------------------------------------|------------------------------|----------------|
| Doktora       |                                             |                              |                |
| Yüksek Lisans | Molecular Biology and Environmental Biology | Roskilde University          | 2015           |
| Lisans        | Moleküler Biyoloji ve Genetik               | İstanbul Teknik Üniversitesi | 2013           |
| Lise          | Fen Bilimleri                               | Kadıköy Anadolu Lisesi       | 2009           |

# Başarılmış birden fazla sınav varsa (KPDS, ÜDS, TOEFL; EELTS vs), tüm sonuçlar yazılmalıdır

| Bildiği Yabancı Dilleri | Yabancı Dil Sınav Notu (#) |
|-------------------------|----------------------------|
| İngilizce (Yökdl)       | 97,5                       |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| Görevi                       | Kurum                                                  | Süre (Yıl - Yıl)                   |
|------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Teknik Personel              | Yeditepe Üniversitesi                                  | Devam etmekte (2017-devam etmekte) |
| Akademik Asistan             | Roskilde University (in collaboration with Evolva A/S) | 3 ay (2016-2016)                   |
| Akademik Asistan             | Roskilde University                                    | 11 ay (2013-2014)                  |
| Öğrenci Laboratuvar Asistanı | İstanbul Teknik Üniversitesi                           | 1 yıl (2012-2013)                  |
| Staj                         | Roskilde University                                    | 3 ay (2012-2012)                   |
| Staj                         | İstanbul Teknik Üniversitesi                           | 3 ay (2011-2011)                   |
| Öğrenci Laboratuvar Asistanı | İstanbul Teknik Üniversitesi                           | 6 ay (2011-2011)                   |

### Bilgisayar Bilgisi

| Program          | Kullanma becerisi |
|------------------|-------------------|
| Microsoft Office | Çok iyi           |
| GraphPad Prism   | Çok iyi           |
| SPSS             | İyi               |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

### Bilimsel Çalışmaları

#### SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Khoubbieh F, <b>Erdogan CS</b> , Onel T, Yildirim E, Sumer E, Yaba A & Yilmaz B. (2023) Effect of Methylphenidate on the onset of puberty and reproductive organ development in rats. <i>Physiol Behav.</i> 114204. doi: 10.1016/j.physbeh.2023.114204. Epub ahead of print.                                |
| Mete F, Eyuboglu S, Vitrinel A, Kilic U, <b>Erdogan CS</b> , Kilic E & Yilmaz B. (2023) Hyperthermia alters neurobehavior by affecting cell proliferation and neuronal survival in young male rats. <i>Int J Dev Neurosci.</i> doi: 10.1002/jdn.10258. Epub ahead of print.                                 |
| Günelan E, Karagöz ME, Cıvaş CC, Bilgin VA, <b>Erdogan CS</b> , Güven A, Yılmaz B & Gemici B. (2023) The effect of maternal period nutritional status on oro-sensorial fat perception and taste preference in rats. <i>Mol Cell Biochem.</i> doi: 10.1007/s11010-023-04703-5. Epub ahead of print           |
| Onel T, <b>Erdogan CS</b> , Aru B, Yildirim E, Demirel GY. & Yaba A. (2023). Effect of rapamycin treatment in human seminoma TCam-2 cells through inhibition of G1-S transition. <i>Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.</i> doi: 10.1007/s00210-022-02371-8. Online ahead of print.                        |
| Yavuz Y, Yesilay G, Guvenc Tuna B, Maharramov A, Culha M, <b>Erdogan CS</b> , Garip GA. & Yilmaz B. (2022). Investigation of effects of transferrin-conjugated gold nanoparticles on hippocampal neuronal activity and anxiety behavior in mice. <i>Mol Cell Biochem.</i> , doi: 10.1007/s11010-022-04632-9 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Erdogan CS</b> , Al Hassadi Y, Aru B, Yılmaz B & Gemici B. (2022). Combinatorial effects of melatonin and paclitaxel differ depending on the treatment scheme in colorectal cancer <i>in vitro</i> . Life Sci., 308:120927. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120927.             |
| Hmmam HM, Ethemoglu MS, Yalcin M, <b>Erdogan CS</b> , Yılmaz B & Kacar M. Investigation of effects of fluoxetine on the bronchial smooth muscles by the isolated organ bath system. (2022). Biol Futur., doi: 10.1007/s42977-022-00130-7. Epub ahead of print.             |
| Al-Obaidi, ZAF, <b>Erdogan, CS</b> , Sümer, E, Özgün, HB, Gemici, B, Sandal, S & Yılmaz, B. (2022). Investigation of obesogenic effects of hexachlorobenzene, DDT and DDE in male rats. Gen Comp Endocrinol., 327:114098. doi: 10.1016/j.ygcen.2022.114098.                |
| Yaba, A., Agus, S., Yildirim, E., <b>Erdogan, CS</b> . & Yılmaz B. (2020). Interaction of the mTERT telomerase catalytic subunit with the c-Abl tyrosine kinase in mouse granulosa cells. J Recept Signal Transduct Res., 40(4):365-373. doi: 10.1080/10799893.2020.173541 |
| Ethemoglu, MS, Kutlu, S, Seker, FB, <b>Erdogan, CS</b> , Bingol, CA & Yılmaz B. (2019). Effects of agomelatine on electrocorticogram activity on penicillin-induced seizure model of rats. Neurosci Lett., 690:120-125. doi: 10.1016/j.neulet.2018.09.014                  |
| Ethemoglu, MS, Seker, FB, Akkaya, H, Kilic, E, Aslan, I, <b>Erdogan, CS</b> & Yılmaz, B. (2017). Anticonvulsant activity of resveratrol-loaded liposomes in vivo. Neuroscience., 57:12-19. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.05.026                                         |
| <b>Erdogan, CS</b> Mørup-Lendal, M, Dalgaard, LT & Vang, O. (2017). Sirtuin 1 dependent and independent effects of resveratrol in INS-1E $\beta$ -cells. Chem Biol Interact., 264:52-60. doi: 10.1016/j.cbi.2017.01.008                                                    |
| <b>Erdogan, CS</b> & Vang, O. (2016). Challenges in Analyzing the Biological Effects of Resveratrol. Nutrients, 8(6), 353. doi: 10.3390/nu8060353                                                                                                                          |
| <b>Erdogan, CS</b> , Hansen, BW & Vang, O. (2016). Are invertebrates relevant models in ageing research? Focus on the effects of rapamycin on TOR. Mech Ageing Dev., 153, 22-29. doi: 10.1016/j.mad.2015.12.004                                                            |

#### Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

|  |
|--|
|  |
|--|

#### Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

|  |
|--|
|  |
|--|

#### Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

|  |
|--|
|  |
|--|

#### Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifikalari/Ödülleri)

|                                                    |
|----------------------------------------------------|
| Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası – Mayıs 2017 |
|----------------------------------------------------|