T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AMİLOİD BETA 1-42'NİN BİR TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ OLARAK MİTOKONDRİAL DNA TARAFINDAN KODLANAN GENLERİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ZUHAL YURTTAŞ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ERDİNÇ DURSUN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI
TIBBİ BİYOLOİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

Bu çalışma 07.01.2021 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Doç. Dr. Erdinç DURSUN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD

Doç. Dr. Duygu GEZEN AK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji AD

Prof. Dr. Erdem TÜZÜN
İstanbul Üniversitesi
ASDETAE Sinirbilim AD

BEYAN

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

Zuhal YURTTAŞ

İTHAF

Annem/babam ve kardeşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan ve yönlendiren, karşılaştığım tüm zorluklar karşısında beni cesaretlendiren, bu süreçte karşıma çıkan her türlü sorunda çözüm yolu gösteren hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, akademik kişiliği ve başarılarıyla bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Erdinç DURSUN'a, gerek eğitimim boyunca gerekse tez çalışmam ve deneylerim sırasında yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgileriyle beni her zaman aydınlatan ve yol gösteren, akademik desteklerinin yanınında beni her zaman motive eden çalışma prensipleriyle bana örnek olan her zaman çalışmaktan memnuniyet duyacağım sayın Doç. Dr. Duygu GEZEN AK'a katkıları için Prof.Dr. Selma YILMAZER'e ve çalışmamda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, çalışmam boyunca her daim beni destekleyen, beni her durumda motivasyonumu arttıran, yeri geldiğinde kendi iş ve sorumluluklarından ödün verip bana yardım eden yeri dolmaz takım arkadaşlarım başta MSc.Merve ALAYLIOĞLU, MSc.Büşra ŞENGÜL, MSc. Ebru KESKİN ve B.Sc. Pelin SORDU'ya, aynı zamanda dönem arkadaşım olan dostluğu ve yardım severliği ile bulunmaz bir çalışma arkadaşı olan B.Sc.Tugay ÇAMOĞLU'na, her durumda beni motive eden ve destek veren M.Sc. Bilgenur BİLGE'ye ve tez çalışmam boyunca yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşım B.Sc. İdil YÜKSEKEL'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 219Z179

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Alzheimer Hastalığı 4
2.1.1. Amiloid Kaskad Hipotezi ve Amiloid Beta Peptidi'nin Üretimi 8
2.1.1.1. Aβ1-42 Peptidinin Görevleri 13
2.1.1.2. Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde Aβ1-42'nin Rolü 15
2.2. Mitokondri 16
2.2.1. Mitokondri Yapı ve Görevleri 16
2.2.2. Mitokondrial DNA 18
2.2.3. Mitokondride Kodlanan Genlerin Transkripsiyonu 20
2.2.3.1. Mitokondride Çalışan Nükleer Transkripsiyon Faktörleri 21
2.3. Mitokondri ve Nörodejeneratif Hastalıklar 24
2.3.1. Mitokondri'nin Alzheimer Hastalığındaki Rolü 27
2.4. Aβ1-42'nın Mitokondri Lokalizasyonu ve Etkileşimleri 34
2.4.1. Aβ'nın Mitokondriye Translokasyonu 34
2.4.2. Aβ'nın Mitokondrideki Etkileşimleri 35
2.5. Kromatin İmmunopresipitasyon(ChIP) – PCR Yöntemi 37
2.6. SH-SY5Y Hücre Hattı 39
3. GEREÇ VE YÖNTEM 41
3.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü Deneyleri 42
3.1.1. Hücre Açılması ve Çoğaltılması 43

3.1.2. Lamel Yerleştirilen Petrilerin PLO (Poly L Ornithin) Solüsyonu ile Kaplanması 43
3.1.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması 44
3.1.4. Hemasitometri ile Hücre Sayımı 45
3.2. Herhangi Bir Uygulama Yapılmamış SH-SY5Y Hücrelerinde, Aβ1-42'ninMitokondriyal Lokalizasyonunun İmmunfloresan İşaretleme Yöntemiyle Gösterilmesi 45
3.3. BrdU (5-bromo-2′-deoxyuridine)-mtDNA ve mtDNA-Aβ1-42 İmmünfloresan İşaretlemesi 47
3.3.1. SH-SY5Y Hücrelerine Aphidicolin ve BrdU Uygulamaları.....47
3.3.2. BrdU ile etiketlenen hücrelerde Aβ1-42'nin İmmünfloresan Yöntemiyle İşaretlemesi: 49
3.3.2.1. Mitokondri Boyaması ve BrdU işaretlemesi.....49
3.4. SH-SY5Y Hücrelerine Amyloid Beta 1-42 Peptid Uygulaması.....50
3.4.1. Amiloid Beta 1-42 peptidinin hazırlanışı.....50
3.4.2. SH-SY5Y Hücrelerine Aβ1-42 Peptid Uygulaması ve Hücre Kültürü Grupları 51
3.5. Mitokondiral Kromatin İmmunpresipitasyon(ChIP) 51
3.5.1. Mitokondri İzolasyonu Aşaması 52
3.5.2. Mikrokokal Nükleaz Enzimi ile mtDNA'nın Parçalara Ayrılması:.....53
3.5.3. Mitokondriyal Lisiz: 54
3.5.4. Agaroz Boncuklar ile Presipitasyon Aşaması: 55
3.5.5. ChIP Yönteminde Kullanılan Tamponların Hazırlanışı.....56
3.6. qPCR Reaksiyonu 58
3.6.1. Fenol: Kloroform: İzoamilalkol ile DNA İzolasyonu ve EtOH ile Presipitasyon: 60
3.6.2. qPCR Programı 61
3.7. Sitotoksisite Testi.....62
3.8. İstatistiksel Analizler 63
3.8.1. ChIP-qPCR Sonuçlarının Hesaplanması/Analizi.....63
4. BULGULAR.....64
4.1.1. Uygulama Yapılmamış SH-SY5Y Hücrelerinin Mitokondrilerinde Endojen Aβ1-42 Varlığının Gösterilmesi 64
4.1.2. SH-SY5Y Hücrelerinde BrdU ile mtDNA İşaretlemesi 66

4.1.3. SH-SY5Y Hücrelerinde mtDNA-BrdU ile Aβ1-42 kolokalizasyonunun gösterilmesi 67
4.2. Sitotoksisite Ölçüm Sonuçları.....68
4.3. SH-SY5Y Hücrelerinde Kontrol, 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 Uygulamaları Sonucu Aβ1-42'nin bir TF olarak mtDNA'ya Olası Bağlanma Potansiyelinin ChIP-qPCR ile İncelenmesi 69
4.4. SH-SY5Y Hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 Uygulamaları Sonucu TFAM'ın mtDNA D-Loop Bölgesine Bağlanma Kapasitesi Üzerine Etkisinin ChIP-qPCR Deneyleriyle İncelenmesi.....74
5. TARTIŞMA 80
KAYNAKLAR 91
HAM VERİLER 96
FORMLAR 97
ETİK KURUL KARARI 98
PATENT HAKKI İZNİ 99
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....100
ÖZGEÇMİŞ 101

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3- 1 SH-SY5Y Hücre Kültür Medyum İçeriği gösterilmiştir. 42
Tablo 3-2 BrdU işaretlemesinde kullanılan Fosfat/Sitrik asit çözeltisi içeriği gösterilmiştir. 50
Tablo 3-3 Düşük Tuz konsantrasyonlu yıkama tamponu içeriği 56
Tablo 3-4 Yüksek tuz konsantrasyonlu yıkama tamponu içeriği 57
Tablo 3-5 LiCl Tamponu içeriği 57
Tablo 3- 6 TE (Tris-EDTA) Tamponu içeriği 57
Tablo 3-7 ChIP Dilusyon Tamponu içeriği 57
Tablo 3-8 Elusyon Tamponu İçeriği 58
Tablo 3-9. qPCR Reaksiyon Bileşenleri 58
Tablo 3-10 qPCR'de kullanılan mtDNA D-Loop özgül primer çiftleri gösterilmektedir 59
Tablo 3- 11 PCR reaksiyonunun program ve sıcaklık döngüleri verilmiştir. 61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Ekstraselüler alandaki amyloid plakların frontal kortekste immunohistokimya işaretlmesi gösterilmiştir. 6
Şekil 2-2 Hiperfosforile tau proteinlerinin intraselluler alanda oluşturdukları nörofibriler yumaklar ile birlikte amiloid plakların immunohistokimya işaretlemesi gösterilmiştir. ... 7
Şekil 2-3 APP'nin amiloidogenik ve amiloidogenik olmayan yolaklardaki proteolitik işlenmesi gösterilmiştir. 10
Şekil 2-4 Mitokondriyal genom ve mitokondriyal transkripsiyonda görev aldığı bilinen transkripsiyon faktörleri gösterilmiştir. 23
Şekil 2-5 AH'de potansiyel biyobelirteçlerin zaman çizelgesi gösterilmiştir. 29
Şekil 2-6 ChIP yönteminin aşamaları gösterilmektedir [80]. 38
Şekil 3-1 BrdU - mtDNA işaretlemesi ardından Aβ1-42'nin immünfloresan işaretlemesi akış şeması verilmiştir. 47
Şekil 3-2 Mitokondriyal Kromatin İmmunopresipitasyon Akış Şeması 52
Şekil 3-3 ChIP deneylerindeki deney gruplarının şematik gösterimi. 55
Şekil 3-4 mtDNA D-Loop bölgesini hedefleyen primer çiftlerinin D-Loop üzerindeki şematik gösterimi verilmiştir. 60
Şekil 4-1 Uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücrelerinde endojen Aβ1-42'nin fizyolojik koşullarda mitokondri ile kolokalizasyonu gösterilmiştir. 65
Şekil 4-2 Uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücrelerinde endojen Aβ1-42 ve mitokondri kolokalizasyonları gösterilmiştir. 65
Şekil 4-3 SH-SY5Y hücrelerinde mitokondri ile mtDNA'nın kolokalizasyonu gösterilmiştir. 66
Şekil 4-4 SH-SY5Y hücrelerinde Aβ1-42'nin mtDNA-BrdU ile kolokalizasyonu gösterilmiştir. 67
Şekil 4-5 SH-SY5Y hücrelerinde Aβ1-42'nin mtDNA-BrdU ile kolokalizasyonu gösterilmiştir. 68
Şekil 4-6 24 saat süreyle Aβ1-42 uygulanmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların 24. Saatteki salınan LDH miktarları gösterilmiştir. 69
Şekil 4-7 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 μM ve 5 μM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 70

Şekil 4-8 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 70
Şekil 4-9 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 71
Şekil 4-10 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 71
Şekil 4-11 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 72
Şekil 4-12 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 72
Şekil 4-13 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 73
Şekil 4-14 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 73
Şekil 4-15 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 74
Şekil 4-16 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 75
Şekil 4-17 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 76
Şekil 4-18 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 76

Şekil 4-19 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 77
Şekil 4-20 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 78
Şekil 4-21 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 78
Şekil 4-22 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir. 79

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Aβ: Amiloid Beta

AH: Alzheimer Hastalığı

AICD: APP İntraselüler Domain

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

ABAD: Amiloid Bağlayıcı Alkol Dehidrogenaz

APP: Amiloid Prekrüsör Proteini

APOE: Apolipoprotein E

BACE1: Beta-alanı amiloid öncü protein kesim enzimi 1

β: beta

β-sekretaz: Beta sekretaz

γ-sekretaz: Gamma sekretaz

α-sekretaz: alfa sekretaz

α-7nACHhR: 7-alfa nikotonik reseptör

CypD: Siklofilin D

ChIP: Kromatin İmmunopresipitasyon

D-loop: Dicplacement Loop

DP1: dynamin-related protein 1

ETS: Elektron taşıma sistemi

ER: Endoplazmik retikulum

Fis1: Fission 1

GR: Glukokortikoid reseptör

GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz

HSP: Ağır Zincir Promotor

HMG: Yüksek mobilite grubu

ID1/2: DNA-bağlayıcı protein inhibitorü

IGFBP3/5: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein

iNOS: indüklenebilir nitrik oksit sentaz

IMM: İç mitokondrial membran

LSP: Hafif Zincir Promotor

LRP1: LDL reseptör ilişkili protein 1

LMO4: LIM alan transkripsiyon faktörü LMO4

MCI: Hafif Bilişsel Bozukluk

mtDNA: mitokondrial DNA

Mfn1/2: Mitofusin 1/2

MS: Multiple Skleroz

NA: Noradrenalin

NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor

NRF1/2: Nükleer Solunum Faktör1/2

OLIG2: Oligodendrosit Transkripsiyon Faktörü

OPA1: Optik Atrofi 1 proteini

OMIM: Dış mitokondrial membran

OXPHOS: Oksidatif Fosforilasyon Sistemi

PH: Parkinson Hastalığı

POLRMT: Mitokondrial RNA polimeraz

qPCR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

TERF1: transkripsiyon sonlandırma faktörü

TFAM: Mitokondrial transkripsiyon faktör A

TFB2M: Mitokondriyal transkripsiyon faktörü B2

TP53: tümör protein 53

TF: Transkripsiyon Faktör

TIM: İç mitokondrial zar translokazı

TOM: Dış mitokondrial zar translokazı

VDAC: Voltaja bağlı anyon kanalları

VEG-F: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÖZET

Yurttaş, Z. (2020). Amiloid Beta 1-42'nin Bir Transkripsiyon Faktörü Olarak Mitokondrial DNA Tarafından Kodlanan Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi İstanbul.

Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları Alzheimer Hastalığının (AH) erken ortaya çıkan özelliklerden biri olarak kabul edilmektedir. AH patolojisinin major peptidi Aβ1-42'nin mitokondride lokalizasyonu/birikimi gösterilmiştir. Ancak Aβ1-42'nin mitokondrideki görevleri hakkındaki bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. AH'deki mitokondriyal bozuklukların; enzimlerin inhibisyonuyla sınırlı olmayıp, mitokondriyal DNA(mtDNA)'dan kodlanan genlerin ekspresyon değişimlerini de içerdiği belirtilmektedir. AH hastalarında kontrol grubuna göre mitokondriyal gen ekspresyonunun değiştiği bildirilmiştir. Öte yandan Aβ1-42'nin nukleusta lokalizasyonu, nükleer DNA'dan kodlanan bazı genlerin protmotor bölgelerine bağlanıp gen ekspresyonunu etkilediği önceki çalışmalarımızdan ve literatürden elde ettiğimiz bilgilerle kanıtlanmıştır. Mitokondriyal transkripsiyonun temel bileşeni mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM), mtDNA'nın paketlenmesinde ve replikasyonunda rol oynamaktadır. TFAM'ın AH ilişkisi hakkındaki bilgilerimiz yetersiz olup Aβ1-42'nin TFAM'ın fonksiyonları üzerinde etkisi olabilir. Bu bilgilerden yola çıkarak Aβ1-42'nin, direkt mtDNA'ya bağlanarak veya TFAM'ın mtDNA'ya bağlanma kapasitesini değiştirerek mitokondriyal gen ekspresyonunun düzenlenmesine etki edebileceğini düşündük. Çalışmamızda öncelikle SH-SY5Y hücrelerinde endojen Aβ1-42'nin mitokondrideki lokalizasyonu mitokondri boyaması ve Aβ1-42'nin immünfloresan işaretlemesiyle tespit edilmiştir. Aβ1-42-mtDNA kolokalizasyonu mtDNA'yı etiketleyen BrdU (5-bromo-2′-deoxyuridine) tekniği ve Aβ1-42'nin immünfloresan işaretlemesiyle gösterilmişir. Aβ1-42'nin mtDNA'ya bağlanıp bağlanmadığı ve TFAM'ın mtDNA'ya bağlanma kapasitesini nasıl etkilediği; kontrol ile iki farklı dozda Aβ1-42 uygulaması yapılmış hücrelerde Aβ1-42 ve TFAM antikorlarıyla gerçekleştirilen kromatin immünopresipitasyon (ChIP) deneyleri ile araştırılmıştır. Saflaştırılan DNA parçaları mtDNA Dicplacement Loop (D-loop) özgü-primerlerle qPCR ile analiz edilmiştir. Sonuçlarımız Aβ1-42'nin mtDNA D-loop bölgesine bağlanamadığını göstermiştir. 0,1μM Aβ1-42 uygulamasında TFAM'ın mtDNA bağlanma sinyalinin D-loop genelinde diğer gruplara göre düştüğü; 5μM Aβ1-42 uygulamasında TFAM bağlanma sinyalinin yalnızca iki bölgede diğer gruplara göre arttığı saptanmıştır. Çalışmamız, Aβ1-42'nin TFAM'ın mtDNA'ya bağlanma kapasitesini değiştirdiğini gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Amiloid Beta 1-42, Alzheimer Hastalığı, ChIP, Mitokondriyal DNA, TFAM

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 219Z179

ABSTRACT

Yurttaş, Z. (2020). Investigation Of The Effect Of Amyloid Beta 1-42 As A Transcription Factor On The Expression Of Genes Encoded By Mitochondrial DNA. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

Mitochondrial dysfunction is considered one of the early emerging features of Alzheimer's Disease(AD). The accumulation of the amyloid beta1-42(Aβ1-42) in the mitochondria has been shown. However, our knowledge about the roles of Aβ1-42 in mitochondria is very limited. Mitochondrial disorders in AD includes the expression changes of genes encoded from mitochondrial DNA(mtDNA). Moreover, it has been proven that Aβ1-42 can localize in the nucleus, bind to promoter regions of some genes and affect their expression. Mitochondrial transcription factor A(TFAM),plays a role in packaging and replication of mtDNA. Our knowledge about the relation between TFAM and AH is insufficient. So, we thought that Aβ1-42 could affect the regulation of mitochondrial gene expression by directly binding to mtDNA or by changing the binding capacity of TFAM to mtDNA. In our study, the localization of endogenous Aβ1-42 in the mitochondria in SH-SY5Y cells was determined by mitochondrial staining and immunofluorescence labeling of Aβ1-42. We demonstrated the colocalization of the endogenous Aβ1-42 with mtDNA by the immunofluorescence-based BrdU(5-bromo-2′-deoxyuridine) assay. To investigate Aβ1-42-mtDNA intereaction and effects of Aβ1-42 on TFAM-mtDNA binding capacity; we performed chromatin immunoprecipitation(ChIP) assay from SH-SY5Y cells treated with two different doses of Aβ1-42. Elueted DNA fragments were analyzed with qPCR by mtDNA-Dicplacement Loop(D-loop) specific-primers. Our results showed that Aβ1-42 couldn’t bind to the mtDNA-D-loop region. We demonstrated that in 0,1μM-Aβ1-42 treatment, mtDNA binding signal of TFAM decreased trough the D-loop region.In 5μM-Aβ1-42 treatment, we showed that TFAM binding signal increased in only two regions on D-loop region. Our study is the first study to show that Aβ1-42 alters TFAM's binding capacity to mtDNA.

Key Words: Amyloid Beta 1-42,Alzheimer's Disease, ChIP, mitochondrial DNA, TFAM

The present work was supported by the The Scientific and Technological Research Council of Turkey. Project No. Proje No: 219Z179

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mitokondri ve enerji metabolizmasındaki fonksiyon bozuklukları neredeyse tüm ilerleyici ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının, ekstraselüler alanda amiloid beta (Aβ) plakları ve intraselüler alanda nörfibiriler yumakların oluşumu ile karakterize olan Alzheimer Hastalığı'nın (AH) erken bir özelliği olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. AH sürecinde artan amiloid beta 1-42 (Aβ1-42) oligomerleri, mitokondride hasara neden olarak, AH'nin klinik başlangıcından önce nöronal fonksiyon kaybını indüklemekte ve bilişsel gerilemeye yol açmaktadır. Bu durum, beyinde Aβ1-42 plaklarının oluşumu henüz saptanmadan önce, mitokondride enerji metabolizmasının bozulduğunu gösteren çalışmalarla desteklenmektedir. Örneğin AH modeli oluşturulan transgenik genç farelerde amiloid plakları görülmeden önce, sinapslarda bulunan mitokondrilerde hasar görüldüğü kaydedilmiştir.

AH'nin major peptidi Aβ1-42'nin, nörodejenerasyonda, mitokondriyal enzimlerin inhibisyonuna, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artmasına, mitokondriyal membran gözeneklerinin genişlemesine, mitokondrideki membran potansiyelinin değişmesine, buna bağlı olarak ATP üretiminde bozulmalara ve sonuçta apoptozun indüklenmesine neden olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, Aβ1-42'nin AH hastalarının postmortem beyin dokularının mitokondrilerinde lokalizasyonu ve agregasyonu gösterilmiştir. Mitokondrideki Aβ birikimin son derece toksik olduğu düşünülmektedir. Çünkü Aβ birçok mitokondriyal proteinin normal işlevini bozarak, önemli mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına neden olabilir. Bununla birlikte Aβ-mitokondri ilşkisinin nörodejenerasyonun tam olarak neresinde yer aldığı halen tartışılmaktadır. Ayrıca mevcut bilgiler Aβ1-42'nin mitokondrideki görevlerini tam olarak anlamamız için yeterli değildir. Literatürdeki çalışmaların çoğunda Aβ1-42 mitokondri ilişkisi mitokondriyal proteinlerin işlev bozukluğu açısından ele alınmıştır. Ancak aşamalı nörodejenerasyon sürecinde ilerleyen mitokondriyal bozuklukları göz önüne aldığımızda, bu bozuklukların bazı mitokondriyal genlerin ekspresyonlarındaki değişimleri de içerebileceği düşünülebilir. Grubumuzun önceki çalışmasından elde ettiğimiz veriler de gen ekpresyon değişimlerinin nörodejenerasyon-mitokondri ilişkisinde yadsınamayacak derecede önemli bir yeri olduğunu göstermiştir. Grubumuz önceki çalışmasında Parkinson hastalarının lökositlerinde mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanan genlerin ekspresyonlarının sağlıklı kontrollere göre değiştiğini,

ayrıca hastaların ailesel geçmişlerine göre de farklı bir gen ekspresyon profili oluşturduğunu literatürde ilk kez ortaya çıkarmıştır. Benzer şekilde, AH hastaları ve Hafif Bilişsel Bozukluk (MCI) gösteren hastaların lökositlerinde, mtDNA tarafından kodlanan oksidatif fosforilasyon sistemi (OXPHOS) genlerinin ekspresyonları incelenmiş ve bazı genlerin ekspresyonlarının kontrol grubuna göre belirgin derecede değiştiği bildirilmiştir. Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular ve literatür bilgileri bizi mtDNA'daki bu ekspresyon değişimine neyin neden olabileceğini araştırmaya yönlendirmiştir.

Diğer taraftan AH patolojisinin önemli bileşeni Aβ1-42'nin nukleustaki lokalizasyonu literatürdeki bazı çalışmalar ve grubumuz tarafından gösterilmiştir. Kromatin immunopresipitasyon (ChIP) ve Elektroforetik Hareketlilik Kayma Deneyi (EMSA) analizlerini içeren önemli çalışmalarda, Aβ1-42'nin nükleer genomda bazı genlerin promotor bölgelerine bağlandığı ve bir transkripsiyon faktörü (TF) olarak transkripsiyonel düzenlenmede rol alabileceği rapor edilmiştir. Aβ1-42'nin direkt olarak promotor bölgesine bağlandığı genler arasında kendi üretiminde rol oynayan Amiloid Prekrüsor Protein (APP), Beta-Alanı APP Kesim Enzimi 1 (BACE1) ve Apolipoprotein E4 (APOE4) gibi genler de bulunmaktadır. Bulgular, Aβ1-42'nin bir TF gibi çalışarak nükleer DNA'ya bağlanabileceğini göstermektedir. Aβ1-42'nin bir DNA molekülüne bağlanabilme kapasitesi olduğu göz önüne alındığında, mtDNA'ya da bağlanma potansiyelinin olup olmadığı veya mtDNA'nın gen ekspresyonundaki değişimlerin Aβ1-42 aracılığıyla olup olamayacağı sorusu akla gelmektedir. Ancak böyle bir olasılık aynı zamanda, mitokondriye özgül olmayan bir proteinin, gen ekspresyon düzenlenmesine katılabileceğini de önermektedir.

Şimdiye kadar sahip olduğumuz bilgiler, mitokondriyal transkripsiyonel düzenlenmenin prokaryotik benzeri bir sisteme sahip olduğu yönündeydi. mtDNA transkripsiyonunun yalnızca nükleer genom kodlu mitokondriye özgü transkripsiyon faktörleri tarafından yönetildiği düşünülüyordu. Bununla birlikte, son bulgular, nukleusta çalışan nükleer TF'lerin de mtDNA transkripsiyonunda görev alabildiğini göstermiştir. mtDNA'ya bağlanan ve transkripsiyonu düzenleyen nükleer TF'ler arasında c-Jun, JunD ve CEBP beta örnek gösterilebilir.

Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM), mtDNA'ya diziye özgü olarak bağlanarak transkripsiyonu başlatmak için kilit bir rol üstlenmektedir. Ayrıca dizi özgüllüğünden bağımsız olarak da mtDNA'ya bağlanabilen TFAM, mtDNA'nın stabilizasyonunu ve replikasyonunu düzenleyerek mitokondriyal genomun

miktarını/seviyesini belirlemede de önemli işlev görmektedir. Bununla birlikte mitokondriyal homeostazda bu denli önemli görevleri üstlenen TFAM'ın nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi de aydınlatılmaya çalışılmaktadır. AH hastalarında yapılan çalışmalarda TFAM ekspresyonun (protein seviyesinde) mtDNA kopya sayısıyla paralel olarak azaldığı gösterilmiştir. TFAM aşırı ekspresyonu yapılan AH modeli oluşturulmuş hücrelerde ise mtDNA'da oksidatif hasarın azaldığı ve Aβ birikiminin önlendiği gösterilmiştir. Literatürden elde ettiğimiz bu bilgiler; AH'de replikasyon veya transkripsiyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin TFAM ile doğrudan bağlantılı olduğunu, bununla birlikte Aβ'nın TFAM üzerinden dolaylı olarak bu değişikliklere etki edebileceğini düşündürmüştür. Çalışmaların çoğu AH hastalarında protein seviyesinde TFAM ekspresyonu ve mtDNA kopya sayısı üzerine odaklanmışken, Aβ1-42'nin TFAM-mtDNA etkileşimi üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tüm bu bulgulardan yola çıkarak oluşturduğumuz hipotezimize göre, Aβ1-42'nin mitokondriyal gen ekspresyonuna direkt olarak mtDNA'ya bağlanarak veya dolaylı yoldan TFAM'ın mtDNA üzerindeki bağlanma kapasitesini değiştirerek etki etme olasılığı vardır. Bu önermenin doğruluğunu test etmek üzere çalışmamızın ilk aşamasında, Aβ1-42'nin; herhangi bir uygulama yapılmamış, fizyolojik doz olarak 0,1 μM ve toksik doz olarak 5 μM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda Aβ1-42 uygulaması yapılmış SH-SY5Y hücrelerinde mtDNA'ya bağlanıp bağlanmadığı araştırılacaktır. Çalışmamızın ikinci aşamasında, Aβ1-42 uygulaması yapılan gruplarda, uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre; TFAM'ın mtDNA D-loop üzerine bağlanma kapasitesinin değişip değişmediği ve böyle bir değişim varsa D-loop'un hangi bölgesinin daha çok etkileneceği araştırılacaktır.

Çalışmamız direkt olarak Aβ1-42'nin mtDNA gen ekspresyon düzenlemesine katılıp katılmadığını ve TFAM-mtDNA bağlanmasında, Aβ1-42'nin etkisini inceleyen ilk çalışma olma niteliğindedir. Bununla birlikte çalışmamızın Aβ1-42'nin mitokondrideki fonksiyonlarını ve mitokondriyal fonksyion bozuklukları ile AH arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına katkıda buluncağını düşünmekteyiz. Ayrıca çalışmamızın AH'de mitokondriyi hedef alan (mitokondri temelli) terapötik yaklaşımların ilerlemesine de katkı sağlayacağı görüşündeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı (AH); amiloid beta 1-42 (Aβ1-42) peptitinin ekstrasellüler alanda beta (β) tabakalar oluşturarak birikimi, hücre içi alanda ise hiperfosforile mikrotübül-ilişkili tau proteininin oluşturduğu nörofibriler yumaklar ile karakterize edilen ilerleyici, nörodejeneratif bir hastalıktır [1-3]. Hücre içinde ve hücreler arasında ortaya çıkan bu agregatlar; nöron içi sinyal iletiminin, aksonal taşımanın ve nörotrofik faktör sentezinin bozulması, mitokondrial fonksiyonlarda hasar, oksidatif stres artışı ve kalsiyum homeostazının değişmesi gibi bir dizi metabolik faaliyetin bozulması sonucu hücre ölümünün tetiklenmesine neden olur [2]. Bununla birlikte AH'de görülen hücresel düzeydeki bu semptomlar, aniden ortaya çıkan ve hızla ilerleyen bir durumdan ziyade, sağlıklı hücrede ortaya çıkan bir fonksiyon bozukluğu ile gelişen ve nöron ölümüyle sonuçlanan, önemli hücresel yolaklardaki kademeli değişimleri kapsar.

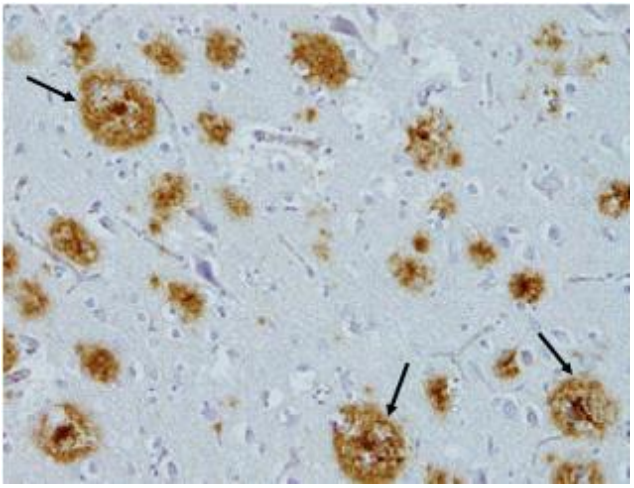
AH en yaygın nörodejeneratif hastalıklardan biridir ve dünya çapında yaşlılarda demans vakalarının % 80'inden fazlasını oluşturmaktadır. AH klinik olarak zihinsel, davranışsal, işlevsel gerileme ve öğrenme yeteneğinin giderek azalmasına yol açar [3, 4]. Özellikle, beyinde, hippokampüste başlayan ve serebral korteksin geniş alanlarını etkileyen AH'de, anormallikler ilk olarak frontal ve temporal lobları içeren beyin dokusunda tespit edilir ve daha sonra bireyler arasında önemli ölçüde değişen oranlarda neokorteksin diğer bölgelerine de yavaşça ilerler [5]. AH, genellikle hastalığın klinik semptomlarının görülme yaşı ile bağlantılı olarak, ailesel ve sporadik olmak üzere iki tipte incelenir. Sporadik vakalar genel olarak geç başlangıçlı ve hastalığın ortaya çıkmasındaki nedenlerin tam olarak bilinmediği vakalardır. Ailesel vakalar ise erken başlangıçlı demans ile karakterize olup, ortak bazı genlerde bazı ortak mutasyonlar veya polimorfizmler gösterilmiştir [5].

AH patofizyolojisinin açıklanması Alois Alzheimer'ın ileri derece demans semptomları gösteren hastasının vefatının ardından beyin dokusunun incelenip senil plaklar olarak adlandırılan amiloid plakları ve hiperfosforillenmiş nörofibriler yumakları gözlemlediği 1906 yılına kadar uzanır[6]. Aslında senil plaklar (amiloid plaklar) ve hastalığın klinik semptomlarının bir kısmı daha önceden bilinse de Dr. Alois, ilk defa hiperfosforile tau birikimlerini postmortem beyinde gümüş boyamayla göstererek,

hastalığı diğer demans türlerinden ayırmış ve AH'nin iki temel patolojik bulgusunu ortaya koymuştur [2, 6]. Bu iki temel patolojik bulgu aşağıda özetlenmiştir:

- **Amiloidik Plaklar:** Amiloidik plakların temelini oluşturan amliod fibriller Aβ1-42 peptidinin çapraz β-tabaka yapısından oluşan fibriler polipeptid agregatlarıdır. AH hastalarında, amiloid fibril üretiminden sorumlu peptit olan Aβ1-42 dimerleri, çözünür oligomerleri ve çözünmeyen fibril agregatlarını oluşturmak üzere kendi kendine birleşir. Bu peptit, nöronal membranların kolesterol bakımından zengin bölgelerinde üretilir ve hücre dışı boşluğa salınır [7]. Aβ1-42 peptidinin üretimi ve özellikleri Bölüm 2.1.1'de detaylı olarak anlatılmıştır. Hangi Aβ1-42 formunun AH'de en çok sorumlu olduğu iyi bilinmemekle birlikte, oligomer formunun hücre için daha toksik olduğu düşünülmektedir. Aβ1-42 peptidi ve amiloid plaklar tipik olarak hücrenin dışında meydana gelir. Ancak önemli kanıtlar Aβ1-42'nin hücre içinde lizozom, endozom, mitokondri ve sitoplazmada da biriktiğini göstermektedir [7]. Amiloid plak oluşumunun bir hücre içi yolunun mevcut olması, hücre dışı amiloid plaklarının tipik olarak başlangıçta hücre içi bir protein spektrumu içerdiği bilgisiyle de tutarlıdır. Örneğin, Aβ plakları yaygın olarak ısı şoku protein ailelerinden; ısı şok proteini 70, ısı şok proteini 20 (Hsp70, Hsp20) veya lizozomal proteazlar içerir [8, 9]. Aβ degredasyonu insülin parçalayıcı enzim (IDE) veya neprilisin (NEP) gibi enzimlerle gerçekleştirilebilir [7].

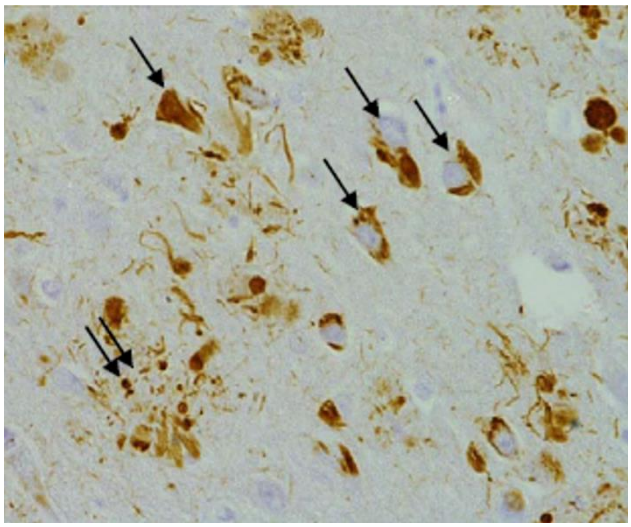
  Spontan çekirdeklenme veya uygun fibril tohumlarının varlığında, Aβ fibrilleri büyür, hücre membranında porlar oluşturmaya başlar. Ayrıca veziküler membranlara da nüfuz ederek multiveziküler cisimlerin işlevini bozar. Sonuçta hücre içi amiloid türleri de dahil olmak üzere tüm hücre içi yapılar ekstraselüler alana salınır. Hücredeki hasarın, esas olarak Aβ peptidinin küçük oligomerik amiloid formlarından kaynaklandığını, ancak peptidin bu formdayken patojenite mekanizmasının kurulmaya devam edeceği düşünülmektedir [7, 10].



Şekil 2-1: Ekstraselüler alandaki amyloid plakların frontal kortekste immunohistokimya işaretlmesi gösterilmiştir.

(Görsel Lane ve Hardy [1]'den alıntılanmıştır).

Nörofibriler Yumaklar: Nörofibriler yumakların ana proteini olan tau, insanlarda kromozom 17 üzerinde mikrotübül ilişkili tau proteini geninden (MAPT) kodlanır. Birçok izoformu bulunan tau proteininin 30'dan fazla fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Normal tau proteini, nöronların hücre iskeletindeki mikrotübülleri stabilize eder, nörit büyümesini, membran etkileşimlerini teşvik eder ve organellerin sinaptik terminallere aksonal taşınmasını kolaylaştırır. Tau proteininin fosforilasyonu mikrotübüle bağlanmasını, böylece mikrotübül stabilizasyonunu düzenler. Hiperfosforile tau proteinleri ise mikrotübüller ile bağlanma yeteneğini kaybedip kendi kendilerine birikme eğilimine sahiptirler. Aynı çözeltideki hiperfosforillenmiş tau proteini ile normal tau proteininin etkileşiminin geniş filamentler ve yumaklar oluşturduğu gözlenmiştir [7]. AH'de tau proteini hiperfosforile olur ve eşleşmiş sarmal filamentler halinde nöronlarda birikerek nörodejenerasyona yol açar. Hiperfosforile tau proteinlerinin mikrotübüller üzerine anormal bağlanması ya da bağlanamama durumu, mikrotübülün stabilizasyonunu bozarak hücre içi iskeletin bozulmasına, anormal aksonal taşınmaya, ayrıca tau ile birlikte birçok farklı proteinin de agregat oluşturarak nörofibriler yumak yapısına katılmasına neden olur [7].



Şekil 2-2 Hiperfosforile tau proteinlerinin intraselluler alanda oluşturdukları nörofibriler yumaklar ile birlikte amiloid plakların immunohistokimya işaretlemesi gösterilmiştir.

(Görsel Lane ve Hardy [1] 'den uyarlanmıştır.)

Multifaktöryel bir hastalık olan AH'nin nöropatolojik bileşenlerinin açıklanmasıyla birlikte, bu bilşenlerin ortaya çıkmasına neden olan mekanizmaları aydınlatmak amacıyla kolinerjik hipotez, amiloid kaskad hipotezi, tau hipotezi, inflamasyon hipotezi, mitokondrial kaskad hipotezi gibi birçok görüş ileri sürülmüştür [4]. Son yirmi yıldır geçerli olan hastalığın moleküler arkaplanını en iyi açıkladığı kabul edilen hipotez Amiloid kaskad hipotezidir. Amiloid kaskad hipotezine göre, beyindeki Aβ1-42 birikimi AH patogenezini tetikleyen birincil etkendir. Bu hipotezde tau proteini içeren nörofibriler yumakların oluşumu da dahil olmak üzere, hastalık sürecinin Aβ1-42 üretimi ile yıkımı arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı ileri sürülmektedir [11]. Aβ1-42'nin nöron kaybına ve nörofibriler yumak oluşumuna nasıl neden olduğu tam olarak açık olmasa da, peptidin kalsiyum homeostazını bozduğu ve intranöronal kalsiyum konsantrasyonlarını arttırdığı bilinmektedir. Bu bilgi nörofibriler yumakların nasıl oluştuğunu açıklayabilir. Nörofibriler yumaklar mikrotübül ilişkili tau proteinin hiperfosforile bir formundan türeyen sarmal filamentlerden oluşur ve tau proteininin fosforilasyonu da hücre içi kalsiyum ile kontrol edilebilir [3]. Bununla birlikte hastalığın karmaşık patofizyolojisi ardındaki moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması için bilim insanları; AH'de nörotransmitter kaybını açıklamaya çalışan nörokimyasal; protein agregasyonun patolojisini anlamak amacıyla patolojik ve AH'nin kalıtsal formlarını araştırmak amacıyla genetik yaklaşımlar geliştirilmişlerdir. Bu üç temel yaklaşım

sayesinde hastalığın anlaşılması için ilerleme kaydedilmiş olsa da, hastalık hala tam olarak anlaşılamamış ve hastalığa kesin bir tedavi bulunamamıştır [6].

2.1.1. Amiloid Kaskad Hipotezi ve Amiloid Beta Peptidi'nin Üretimi

Aβ; nöronlar, astrositler ve mikroglia dahil olmak üzere sadece beyin hücrelerinde değil, aynı zamanda adrenal bez, böbrek, kalp, karaciğer, dalak, pankreas, kaslar, çeşitli kan ve endotel hücreleri gibi periferik organlarda ve dokularda eksprese edilen bir hücre membran proteini olan amiloid prekrüsör proteininin (APP) proteolitik kesiminden üretilir [12]. APP'nin hemen her dokuda ifade edilmekle birlikte nörogelişimde rol oynadığı ve nöronal büyüme için gerekli olduğu bildirilmiştir. APP ayrıca sinaptogenez ve hücre adezyonunda da görev alır [13]. Down sendromuna APP genini içeren kromozom 21 bölgesinin trizomisi neden olduğu için, APP'den üretilen Aβ'nın birikiminin AH'nin erken dönemlerinde oluşmaya başladığı görüşü ileri sürülmüştür [3].

APP'nin proteolitik kesimi *amiloidogenik* ve *non- amiloidogenik* olmak üzere iki farklı yolak üzerinden meydana gelebilir. AH patolojisinde birikimler oluşturan Aβ1-42 peptidinin oluşumu APP'nin amiloidogenik yolaktaki kırpılmasıyla gerçekleşir.

Amiloidogenik yolakta;

APP proteini ilk önce membrana bağlı bir aspartik proteaz enzimi olan beta sekretaz (β-sekretaz) enzimi ile kesime uğrayarak geniş çözülebilir bir ektodomain (sAPPβ) ile bir C-terminal C99 peptidi oluşturur. Ardından C99 peptidinin, bir intramembran çoklu alt ünitelere sahip (multisubunit) proteaz kompleksi olan gama sekretaz (γ-sekretaz) enzimi tarafından kırpılması sonucu Aβ1-42 ya da Aβ1-40 peptidi üretilerek ekstraselüler alana salınır. Geri kalan kısım APP'nin intraselüler domainini (AICD) oluşturur. γ-sekretaz ile kesim sonucu ortaya çıkan peptit popülasyonunun türü C-terminalinde bulunan amino asit sayısına göre değişkenlik göstermektedir. Kesim sonucu oluşan Aβ1-40 ve Aβ1-42'nin amino asit dizileri oldukça benzerdir, aralarındaki tek fark, Aβ1-42'nin C-terminalindeki fazladan bir izolösin ve alanindir. Aβ1-42'nin C-terminalinde iki ekstra amino asiti bulunan bölgenin agregasyon mekanizmaları için çok önemli olduğu doğrulanmıştır. Aβ1-42, diğer Aβ çeşitlerinden daha hidrofobik, fibrillojeniktir ve beyinde biriken başlıca türlerdir. Bununla birlikte proteolitik kesim sonucu oluşan Aβ peptidleri arasında en fazla üretilen Aβ1-40 (40 amino asitlik) peptididir (~% 80-90), bunu 42 aminoasitlik Aβ1-42 peptidi (~% 5-10) takip eder. Bu

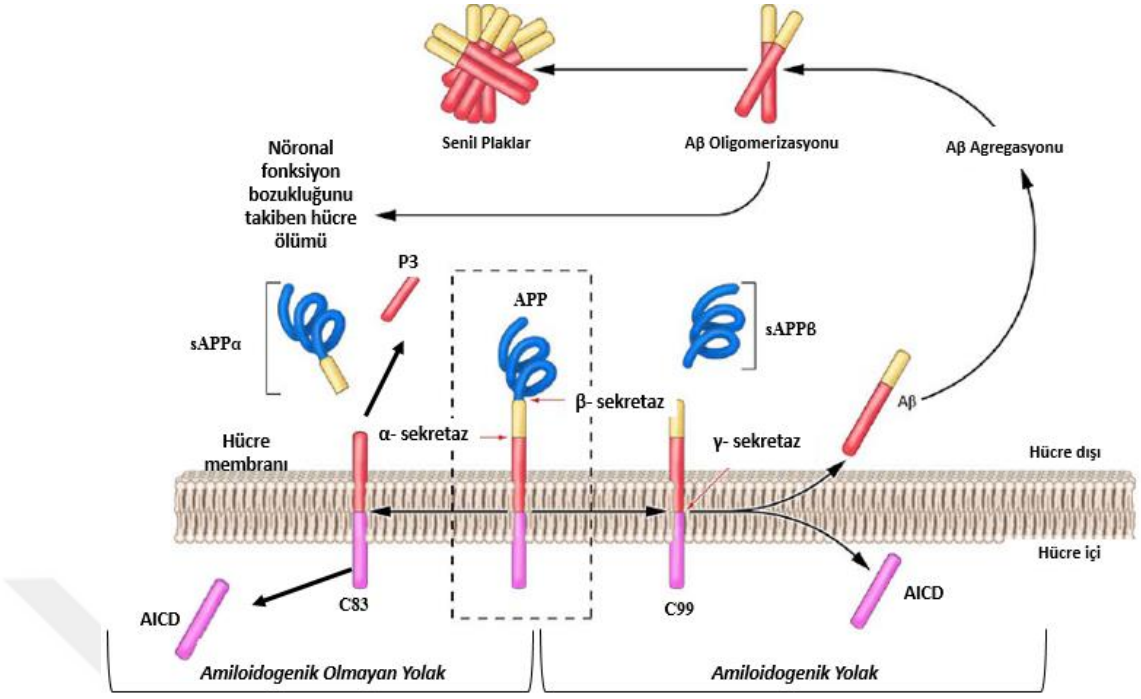
farkın nedeni tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bazı araştırmalar bu durumun Aβ'yı yıkan enzimlerle ilişkili olduğunu öne sürmüştür [13].

Aβ peptidleri, Aβ monomerinin kararsızlığı ve çevresel indükleyici faktörler nedeniyle kolayca bir araya gelebilirler. Bu nedenle, Aβ'nın kendi kendine birikmesi ve agregasyon mekanizması yeterince aydınlatılamamıştır. Aβ monomer konsantrasyonunun artmasıyla veya çevresel faktörlerin etkisiyle, Aβ peptidinin ikincil yapısı, orijinal alfa heliks konformasyonundan bir geçiş konformasyonuna ve son olarak β-tabaka konformasyonuna değişir. Hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı ve aromatik amino asitlerin kümelenmesi gibi etkileşimlerle, çözünür Aβ oligomerleri Aβ öncül fibrillerini ve sonra da olgunlaşmış Aβ fibrillerini oluştururlar. Hem Aβ1-40 hem de Aβ1-42'de hidrofilik amino asitler N-terminal bölgesinde bulunurken, C-terminal bölgesindeki çoğu amino asit hidrofobik özelliktedir. Diğer taraftan Aβ1-42 ve Aβ1-40 monomerleri benzer serbest enerji profiline sahipken dimer formlarının oluşumunda farklı bir süreç izlemektedirler. Ayrıca, Aβ1-42 dimerinin, Aβ1-40 dimerinden daha merkezi bir hidrofobik çekirdekte β-tabaka yapısı oluşturma eğiliminde olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte Aβ1-42'nin sulu çözeltide amfipatik özellikler sergilediği ve C-terminal bölgesinin suda kolayca hidrofobik bir çekirdek oluşturabildiği göstermişlerdir[13]. Aβ1-42'nin C-terminal bölgesine karşı özgül antikorların kullanılması Aβ fibrillerinin oluşumunu önemli ölçüde inhibe edebilir. Ayrıca Aβ1-42'deki Asp-23 ve Lys-28 aminoasitleri arasındaki elektrostatik etkileşimlerin de çekirdek agregasyon bölgesini stabilize ettiği bulunmuştur [14].

Non-amiloidogenik yolak:

Amiloidojenik olmayan yolda, APP'nin hücre dışı alanının bir kısmı, nörotrofik ve nöroprotektif fonksiyonlara sahip sAPPα olarak bilinen çözünür bir hücre dışı fragmanı üretilmek üzere kırpılır.

Bu yolakta APP ilk olarak bir proteaz enzimi olan alfa sekretaz (α-sekretaz) ile kesime uğrayıp ardından γ-sekretaz ile ikinci kez kırpılır. Sonuçta çözünür bir hücredışı fragmenti sAPPα, C83 peptidi, P3 peptidi ve AICD oluşur. P3 peptidi de Aβ17-40 ile Aß17-42 peptidlerini içerir ve bu peptidler amiloidogenik değildir [15].



Şekil 2-3 APP'nin amiloidogenik ve amiloidogenik olmayan yolaklardaki proteolitik işlenmesi gösterilmiştir.

(Görsel Spies PE ve ark. [15] 'den uyarlanmıştır.**)**

Görüldüğü üzere, α ve β sekretazlarının, APP'nin kesimi ve Aβ peptidlerinin üretilmesi üzerinde rekabetçi zıt etkileri mevcuttur. Örneğin, artmış α-sekretaz aktivitesi Aβ1-42 üretiminin azalmasına neden olur. Diğer taraftan β-sekretaz enzimini kodlayan Beta-alanı amiloid öncü protein kesim enzimi 1 (BACE1) geni susturuluş farelerin beyinlerinin Aβ1-42 peptidinden yoksun oldukları gösterilmiştir. En az dört alt birimden oluşan (presenilin1/presenilin2, nicastrin, Aph-1, Presenilin arttırıcı protein 2) bir multi protein kompleksi olan γ-sekretaz, sadece Aβ üretiminde değil, aynı zamanda Aβ1-42 ve Aβ1-40 oranlarının belirlenmesinde de kritik bir rol oynayan bir transmembran aspartil proteaz olarak işlev görür [16]. Yapılan çalışmalarda presenilin PS1/PS2 çift mutasyonunun γ-sekretaz enziminin inaktivasyonu ile Aβ1-42 üretiminin olmadığı görülmüştür [17]. APP'nin γ-sekretaz aracılı işlemi hücrelerde intramembran proteoliz mekanizmasının bakterilerden bu yana evrimsel süreçte en iyi korunan örneklerinden biridir [16].

Sonuç olarak, APP transmembran proteininden amilodoigenik yol ile kesimininden oluşan alfa-sarmal protein yapısındaki Aβ1-42 peptitleri kendiliğinden başta çözünebilir oligomerler halinde toplanırken, ardından çözünmeyen fibriler beta-

tabaka konformasyonu oluşturmak üzere birleşerek sonunda yaygın senil plakları oluşturular. Yukarıda da anlatıldığı gibi Aβ1-42, yüksek fibrillizasyon ve çözünmeye karşı direnç oranı nedeniyle plaklar içinde Aβ1-40'tan daha bol miktarda bulunur. Aβ1-42 oligomerlerinin hücre membranı üzerinde porlar oluşturarak hücre homeostazını bozduğu, oksidatif hasara neden olduğu, tau hiperfosforilasyonunu teşvik ettiği, sinapslar ve mitokondri üzerinde toksik etkilere neden olduğu bilinmektedir [18].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, nöronların ilişkili oldukları astrositler ile birlikte, Aβ1-42 oligomerlerinin üretimine katkıda bulundukları gösterilmiştir[4]. Nöronlar tarafından salınan Aβ1-42 oligomerleri, ortak astrositlerinin alfa 7 nikotinik asetilkolin reseptörlerine (a-7nAChR) doğrudan bağlanabilir. Bu reseptörlerden gelen sinyaller astrositlerde nöronal sinapslardan salınan glutamatın ekzositozuna neden olur. Salınan glutamat, astrositlerin ortak nöronlarının ekstrasinaptik N-metil-D-aspartik asit reseptörlerini (NMDAR) aktive eder. Ortaya çıkan sinyaller, kalsiyum giriş çıkışında dalgalanmaları tetikler, oksidatif hasar, mitokondri fonksiyon bozukluğu, kaspaz 3 aktivasyonu, tau hiperfosforilasyonu, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), ROS aşırı üretimini; böylece dendritik dikenleri ile nöronal sinapsları yok eden, nöron ve astrosit hücreleri arasındaki bağlantıyı koparan bir dizi olaya neden olur [4]. Diğer taraftan Aβ1-42 oligomerlerinin beta tabakalar halinde toplanarak oluşturdukları senil plaklar, mikrogliaların aktivasyonuna neden olur. Mikroglial aktivasyon, proenflamatuvar sitokinlerin üretimi ve salınımı ile sonuçlanır. Buna karşılık, bu sitokinler yakındaki astrosit ve nöronları daha fazla Aβ1-42 üretmesi için uyarır, böylece daha fazla Aβ1-42 üretimini ve yayılımını aktive etmiş olur. Aβ1-42 oligomerlerinin, oligodendrositlerinki gibi miyelinde bulunan kolesterol bakımından zengin membranlara zarar verme kabiliyeti de yüksektir [4].

Oligodendrositler ayrıca nöron-astrosit kompleksleri ile de ilişkilidir; Aβ1-42 oligomerleri bu ilişkinin bozunmasına da neden olur. Aβ1-42 oligomer kümelerinin AH'li beyinlerdeki nöronal ve vasküler dejenerasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Aβ1-42 oligomerlerinin neden olduğu oksidatif stres, oligodendrositlerin özellikle duyarlı oldukları bir durumdur. Çünkü oligodendrositlerin indirgenmiş glutatyon (GSH) içerikleri düşüktür ve yüksek bir demir konsantrasyonuna sahiptirler, dolayısıyla oksijen radikallerinin yok edilme mekanizmaları hasarlıdır [4].

Amiloid hipotezinin AH patolojisi ile ilişkili bir başka görüşü de Aβ1-42'nin hücre içi fibriler yumakların oluşumunu başlatmasıdır. Bununla birlikte konuyla ilgili

Aβ1-42 toksisitesinin tau ekspresyonunu ve tau ekspresyonunun da Aβ1-42 toksisitesini modüle edebileceğini gösteren bazı hücre kültürü çalışmaları olsa da, iki molekül arasındaki yolun henüz ne olduğu ile ilgili net bir bulgu bulunmamaktadır. Diğer taraftan nörofibriler yumak oluşumunun, nöronal hücre ölümüne daha yakın zamanda ortaya çıkan biyolojik bir olay olduğu gösterilmiştir. Bu durum FTDP17-T' (Kromozom 17'ye bağlı frontotemporal demans-parkinsonizm) hastalarında MAPT geninde mutasyonların tanımlanması ve transgenik farelerde nörofibriler yumak ilişkili hücre ölümünün modellenmesi ile gösterilmiştir [19].

Bununla birlikte, beyinde histolojik olarak belirlenen çözünmeyen Aβ plaklarının sayısı demans şiddeti ile ilişkili değildir. Amiloid patolojisinin hastalığın semptomatik fazının başlangıcında bir platoya ulaştığı ileri sürülmüştür [1, 20]. AH beyinlerinde gözlemlenen tau patolojisi ise bilişsel düşüşün derecesi ile daha yakın ilişkilidir. Birçok çalışma, fosforile tau'nun miktarında anormal yükselmenin gerekli olduğunu, ancak AH'ye neden olmak için yeterli olmadığını kuvvetle göstermektedir [16].

Genetik, yaşlanmaya bağlı faktörler ve çevresel faktörler, hücrede APP'nin amiloidojenik işlenmesini destekleyen metabolik bir değişime neden olabilirler. Örneğin bir kolestrol taşıyıcı protein olan Apolipoprotein E'nin (APOE) esas olarak 3 farklı alleli tanımlanmıştır (APOE2, APOE3, APOE4) ve bunlardan APOE4 alleli çok sayıda çalışmada hem ailesel erken başlangıçlı hem de sporadik geç başlangıçlı AH ile ilişkilendirilmiştir. % 20-50 olarak tahmin edilen ancak yine de popülasyondan populasyona değişebilen bir oranla ApoE4 aleli, bilişsel bozulma ve bilişsel bozuklukların başlangıç yaşını artıran bir risk faktörüdür. ApoE4 aleli taşıyan bireylerin total LDL kolesterol seviyesi daha yüksektir. Yüksek kolesterol seviyeleri Aβ'nin aşırı üretimi ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte Aβ'nin fizyolojik fonksiyonlarından birinin kolesterol taşınmasını kontrol etmek olduğu ileri sürülmektedir [5]. Hastalığın erken başlangıçlı, kalıtsal olan formunda hastaların yarısından fazlasında, üç farklı gendeki (APP, PSEN1 ve PSEN2) mutasyonlar belirgindir. APP'deki mutasyonlar, APP proteolitik işlenmesinde değişimlere neden olarak Aβ1-42 miktarının aşırı artmasıyla sonuçlanır. Aynı zamanda, PSEN1 ve PSEN2'de görülen mutasyonlar da artmış Aβ1-42 / Aβ1-40 oranlarına neden olduğunu göstermiştir [21]. Aβ1-42 / Aβ1-40 oranındaki artış, mutant APP veya PSEN1 genlerini taşıyan plazmidlerle transfekte edilen hücrelerin üst sıvılarında ve in vivo fare modellerinde tespit edilebilir. Üç farklı gendeki bu

mutasyonların Aβ ürünlerinin oranında benzer değişikliklere yol açmasının, AH patogenezinde ortak yol olduğunu göstermektedir [5].

2.1.1.1. Aβ1-42 Peptidinin Görevleri

4 kDa'lık Aβ1-42 peptidi doğası gereği agregasyon yeteneğine sahiptir, bu özellikleri nedeniyle beta tabaka yapısına sahip olan ve hücre dışı plaklar (nöritik plaklar, senil plaklar) oluşturmak üzere birikebilen fibriller oluşturabilir; ayrıca monomer, dimer veya oligomer olarak mevcut olabilirler [13].

Aβ1-42 peptitleri patolojik koşullarda yüksek miktarlarda üretilse de, normal beyinlerde, özellikle sinaptik aktivite sırasında, düşük seviyelerde bulunurlar. Uzun yıllar boyunca patolojik olmayan durumlarda APP ve Aβ1-42'nin rolü araştırılmamıştır ve Aβ1-42, fizyolojik rolü olmayan bir peptid ve APP'nin katabolizmasının tesadüfi bir ürünü olarak düşünülmüştür[13].

Aβ, AH beyinlerindeki nöritik plaklarla ilişkisi nedeniyle kapsamlı bir şekilde çalışılmakta olup patolojik olmayan koşullarda Aβ varlığı da son yıllarda rapor edilmiştir. Bununla birlikte beyindeki Aβ'nın fizyolojik fonksiyonunu, özellikle sinaptik plastisite ve nöronal hayatta kalmadaki rolünü araştırmak için de çalışmalar mevcuttur. Aβ1-42'nin fizyolojik seviyeleri normal bireylerde sinaptik plastisite için gereklidir. Aβ'nın olumlu veya olumsuz etkilerini dikkate alarak, peptidin nörotrofik veya nörotoksik olmak üzere çift etki gösterdiği önerilmektedir. Bu etkiler, Aβ1-42'nin göreceli konsantrasyonu, hücresel ortamı gibi etkenlerle birlikte bireylerin yaşı ile de ilişkilidir. Yüksek konsantrasyonlarda (nanomolar ila mikromolar) Aβ1-42 nörotoksisiteye ve hücre ölümüne neden olur. Ancak, düşük Aβ1-42 konsantrasyonlarının (pikomolar) trofik sinyal ve sinaptik aktivitenin modülatörü olarak işlev gösterebileceği, hafıza ve öğrenmede etkileri olduğu ileri sürülmüştür. Ek olarak, normal beynin interstisyel sıvısında mikrodiyaliz ile pikomolar düzeyinde Aβ saptanmıştır. Ayrıca, çözünür Aβ1-40 ve Aβ1-42'nin fizyolojik fonksiyonlarının arasında kolesterol de novo sentezi ve sfingomiyelin düzeylerinin kontrolünün yer aldığı bildirilmiştir [13].

Aβ1-42'nin önemli görevlerinden bazıları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- **Bir Antioksidan Olarak Aβ**

Aβ'nın hücre içinde normal nöronlar ve astrositler, nöroblastom hücreleri, fibroblastlar, trombositler, hepatom hücreleri gibi diğer birçok hücrede bir antioksidan

olarak işlev görebileceği gösterilmiştir. Ayrıca, düşük miktarlarda Aβ1-42'nın Cu, Fe ve Zn gibi redoks metallerini yakalama ve böylece diğer ligandlarla redoks döngüsüne katılmalarını önleme özelliği nedeniyle, antioksidan özelliğine sahip olduğu ileri sürülebilir. Özetle, Aβ1-42 bir şelatör ve antioksidan molekül olarak işlev görebilir. Diğer taraftan antioksidan rolü olan Aβ, pro-oksidan (oksidatif strese neden olan molekül) olarak da işlev görebilir [13].

Aβ1-42'nin ekstrasellüler birikintileri, BOS ve plazmada hücre dışı bir metal iyonuna bağlanma potansiyeline sahip olabilir. Yaralanma veya hastalığa yanıt olarak salınan Aβ'nın, oksidatif strese karşı nöroproteiktif etki gösterdikten sonra birikintilerinin yok edilmesi gerekir. Ancak Aβ'nın yıkımı yetersiz kalıp üretim-yıkım arasındaki dengeyi bozan APP/PS1 mutasyonları gibi bir durum söz konusuysa, hücrede aşırı metal birikimi ile birlikte hücre kapasitesini aşan hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi Aβ'nın birikimini daha da şiddetlendirir. Bu şekilde Aβ kendi toksisitesinin dışında, hücredeki antioksidan savunma sisteminin de bozulmasıyla dolaylı olarak H_2O_2 üretimi, oksidatif hasar ve nöronal fonksiyon bozukluğundan sorumlu olabilir [13].

- **Aβ1-42'nin Nörogenezdeki Rolü**

Nöronal pluripotent kök hücreler (NPKH) ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında, Aβ birikimlerinin, büyüme faktörlerinin, trofik faktörlerin ve reseptörlerinin ekspresyonunda ve bu proteinlerin karakteristik dağılımında değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir. Aβ1-42'nin embriyonik NPKH'nin proliferasyonuna etki etmeden farklılaşmasını arttırdığı bildirilmiştir [22]. İlginç bir şekilde, bu etki sadece Aβ1-42 peptidinin çözünür oligomerik formları ile görülmüştür, fakat Aβ1-42'nin monomerik formuyla veya Aβ1-40 ile Aβ25-35 peptidlerinde bu etki gözlenmemiştir[13].

Nöronal sağ kalımı teşvik eden trofik faktörler, esas olarak PI3K / Akt sinyal yolağı üzerinden görev yaparlar. Tau proteinini fosforile eden kinazlardan biri olan glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK-3β) fosforilasyonunun da bu yolağa bağlı olduğu ve bu şekilde PI3K / Akt / GSK-3β sinyal yolunun Aß1-42 tarafından doğrudan etkilendiğine ve AH'de değişebileceğine dair kanıtlar vardır [13].

- **Aβ'nın Kan Beyin Bariyerinin Stabilizasyonundaki Yeri:**

Yapılan önemli bir çalışmada, Aβ1-42'nın kan beyin bariyerinin bütünlüğünü korumak için bir dolgu görevi görebileceği ve bu nedenle Aβ1-42'nın tamamen yok edilmesinin serum bileşenlerinin beyne sızmasına neden olabileceği, bunun da iltihaplanma ile karakterize edilen bir otoimmün yanıta neden olabileceği düşünülmektedir [13].

2.1.1.2. Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde Aβ1-42'nin Rolü

Aβ1-42'nin nükleusta lokalize olabileceği ve agregatlar oluşturabileceği elektron mikroskobu ile gösterilmiştir [23]. Hücre membranında porlar oluşturarak hücre içine girebilen Aβ'nın nükleer membranda da porlar oluşturup nukleusa da benzer şekilde transloke olabileceği öngörülmektedir. Diğer taraftan Aβ ilişkili ölüme neden olan proteinin (AβDIP) etkisiyle çekirdeğe taşındığı gösterilmiştir [24]. Bununla birlikte büyüklükleri 25 kDa'ya varan moleküllerin geçişine izin veren nükleer membran porlarının, 4 kDa olan Aβ1-42'nin de geçişine izin verebileceği ileri sürülmüştür [25].

Nukleusta lokalize olabilen Aβ1-42'nin, hücrede gen ekspresyonunu spesifik olarak değiştirebileceği düşünülmektedir. Hücre içindeki Aβ'nın, apoptoz ile ilişkili tümör proteini 53 (TP53) [26], transkripsiyon faktörü achaete-scute kompleksi homolog 1'in (ASCL1) transkripsiyon seviyelerinde bir artış sağladığı rapor edilmiştir [26-28]. Diğer taraftan Aβ1-42'nin oligodendrosit transkripsiyon faktörü 2 (OLIG2) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [27]. Önemli bir çalışma Aβ1-42'nin kendi üretimine katkıda bulunan AH ile ilişkili genlerden APP, BACE1 ve APOE promotörlerindeki ortak bir dizi olan "KGGRKTGGGG" dizisi ile etkileşime girdiğini göstermiş ve Aβ1-42'nin bir transkripsiyon faktörü olarak muhtemel bir rol oynayabileceği bildirilmiştir [28]. Öte yandan grubumuz herhangi bir uygulama yapılmamış primer nöron kültüründe, antibiyotik uygulamasına cevap olarak sitoplazmada lokalize olan endojen Aβ1-42'nin nukleusa doğru göç ettiğini, burada lokalizasyonunun arttığını literatürde ilk kez göstermiştir [29]. Söz konusu çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ve literatür bilgileri üzerine, primer nöron kültürü hücrelerinde Aβ1-42'nin toksik dozlarında kendi üretimine katkı sağlayan (ADAM10, BACE1, PS-1, PS-2, Nicastrin, APP), AH patolojisinde görev alan (APOE, tau, GSK3α, GSK3β, Cdk5), hafıza gelişiminde işlev gösteren (Grin1, Grin2a ,Grin2b, Grin2c, Grin2d, Grin3, PKCzeta), kolekalsiferol yolağında rol oynayan 1αOHaz geni dahil 20 adet genin ekspresyonları literatürde ilk kez araştırılmıştır. Çalışmamız sonucu Aβ1-42'nin kendi

üretimini indükleyen ve AH gelişimini destekleyen özellikle Presenilin 2 (PS2) ve BACE1 genleri ile tau ilişkili yolakta görev alan genler üzerinde (tau, GSK3β, Cdk5) ekspresyonlarını arttırıcı; NMDAR genleri, APOE4 ,TREM2 genleri üzerinde de ekspresyonu azaltıcı bir etkisi olduğu saptanmıştır. Bu ekspresyon değişimi saptadığımız 12 gene ek olarak grubumuz tarafından daha önce primer nöron kültürlerinde yapılan çalışmalarda Aβ1-42 uygulamasına cevaben iNOS, NGF, VDR ve CYP24a1 genlerinin de mRNA seviyelerinin değiştiği gösterilmiştir [30-32]. Ayrıca Aβ1-35 peptidinin amiloid beta bağlanma domaini (AβID) adı verilen bu diziye bağlanma affinitesinin en yüksek olduğunu belirtmiştir [28]. Öte yandan SH-SY5Y ve HEK293T hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada ChIP analiziyle Aβ1-42'nin genomda düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü-ilişkili protein 1 (LRP1) ve indüklenebilir membran proteini R2 (KAI1) genlerinin promotor bölgelerine bağlanarak gen ekspresyon seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir [33]. Hücre kültüründe Aβ1-42'nin toksik olmayan konsantrasyonları uyguladığında IGFBP3 ve IGFBP5 transkripsiyon düzenleyici genlerden ID2 ve ID1 ve bir transkripsiyon faktörü olan LMO4 genlerinin ekspresyonlarında artış olduğu saptanmıştır [34].

2.2. Mitokondri

2.2.1. Mitokondri Yapı ve Görevleri

Mitokondri; enerji üretimi, kalsiyum homeostazının düzenlenmesi, apoptoz ve fizyon - füzyon yoluyla mitokondri popülasyonun korunması dahil olmak üzere hücrede çeşitli roller oynayan son derece aktif bir organeldir[35].

Endosimbiyotik Teori olarak bilinen mitokondrinin kökeni, mitokondrinin bir zamanlar oksidatif solunum yapabilen ve daha sonra anaerobik bir ökaryotik hücre tarafından yutulan aerobik bakteriler olduğunu belirtir. Bu ökaryotik hücreler ve aerobik bakteriler, aerobik bakterilerin oksidatif solunum yoluyla hücre için verimli bir şekilde enerji ürettikleri simbiyotik bir ilişki kurmuşlardır. Evrimsel sürçte bu bakterilerin modern mitokondrilere dönüştüğü kabul edilir [35, 36].

Bir hücrede yaşam ve ölüm için gerekli olan temel sitoplazmik organel olarak da adlandırabileceğimiz mitokondri:

1) ATP üretimini,

2) hücre içi kalsiyum dengesinin düzenlenmesini,

3) proteaz kaspaz ailesini aktive eden proteinlerin salınmasını,

4) hücrelerin indirgenme-oksidasyon potansiyelinin değiştirilmesini,

5) serbest- radikallerin yok edilmesini sağlar [37].

Mitokondri, iç ve dış mitokondriyal zar olmak üzere çift membrana sahiptir. Dış zar gözeneklidir ve düşük molekül ağırlıklı maddelerin sitozol ile zarlar arası boşluk arasında geçişine izin verir. Mitokondrinin içe doğru kıvrımlı bir şekle sahip iç zarı ise, iyon akışına karşı oldukça etkili bir bariyer sağlar, elektron taşıma sistemini (ETS) barındırır ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün gerçekleştiği, beta-oksidasyon içeren mitokondriyal matriksi kapsar. Mitokondrinin hücredeki diğer organellerden farklı olarak, hücreden bağımsız ribozom organeli ve kendine ait halkasal bir genomu bulunmaktadır [38]. Dolayısıyla mitokondriyal fonksiyonlar hem nükleer genom hem de mitokondriyal genom tarafından kontrol edilir [38].

Mitokondride, mitokondriyal iç zar, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) sistemi ile ATP üretiminden sorumludur. OXPHOS'un bir yan ürünü olarak serbest radikaller de üretilir. Solunum zincirinde, kompleks I ve III elektronları oksijen sızdırır ve süperoksit radikalleri üretilmesine neden olur. Süperoksit radikalleri, H_2O_2ve oksijen üreten manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD) tarafından parçalanır. Kompleks I sadece mitokondriyal matrikse doğru serbest radikallerin salınmasına neden olurken, kompleks III serbest radikalleri hem matrikse hem de membranlar arası boşluğa sızdırır. Ek olarak, a-ketoglutarat dehidrojenaz dahil trikarboksilik asit bileşenleri de matrikste süperoksit radikalleri üretir. Mitokondriyal olarak üretilen bu serbest radikaller ve süperoksit radikalleri, voltaja bağlı anyon kanalları yoluyla sitoplazmaya taşınır ve lipit peroksidasyonuna, protein ve DNA oksidasyonuna katılır [37].

Mitokondri, dinamik bir organeldir ve hücre içindeki mitokondriyal morfoloji ve transport özellikle nöron hücreleri başta olmak üzere birçok hücrenin metabolizmasını etkilemektedir. Mitokondrilerin dış membranları aracılığla birleşmesi olayına füzyon, mitokondrilerin bölünmesi olayına ise fizyon denir. Bu iki faaliyet özel proteinler aracılığla gerçekleşir. Mitokondriyal fizyon 1 proteini (Fis1) ve dinamin benzeri protein 1 (DLP1), fizyona araclık ederken; OPA1, Mfn1 ve Mfn2 proteinleri ise füzyonu gerçekleştirir [39]. Mitokondriyal füzyon ve fizyon, mitokondri fizyolojisinde farklı etkilere neden olur: *fizyon,* mitokondriyal yenilenmeyi ve sağlıklı mitokondri havuzunun korunmasını sağlarken; *füzyon,* mitokondriyal hareketi ve mitokondrilerin akson-sinaps

arasında dengeli dağılımına izin verir. Mitokondrideki füzyon/fizyon dengesinin korunması biyoenerjetik açıdan da çok önemlidir. Dengesiz füzyon mitokondriyal uzamaya yol açarken; dengesiz fizyon, mitokondriyal fonksiyonu bozan aşırı mitokondriyal parçalanmaya yol açar [39].

2.2.2. Mitokondrial DNA

Mitokondride bağımsız bir genomun varlığı ilk olarak tavuk embriyosunda bildirilmiştir [40]. Neredeyse tüm ökaryotlar nükleer genomdan bağımsız olarak, çoklu kopyalar halinde mitokondriyal genom bulundururlar [41]. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise insan mitokondriyal DNA'sının bakteriyal genom benzeri polisistronik bir tarzda kopyalandığı gösterilmiştir [42].

İnsan mitokondriyal genomu, 16569 bç'den oluşan ve 37 geni kodlayan dairesel, çift zincirli, süper sarmal bir moleküldür [43]. Oksidatif fosforilasyonda yer alan 13 protein, iki ribozomal RNA (16S ve 12S rRNA) ve 22 transfer RNA (tRNA'lar) mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanır [37, 44].

Mitokondriyal genom biri hafif (L) diğeri ağır (H) zincir olarak adlandırılan iki adet DNA zincirinden oluşmaktadır. Guanin ve timin nükleotitlerince daha zengin olan DNA zinciri, ağır zincir olarak isimlendirilmiştir. Ağır zincirden 28 gen kodlanırken, hafif zincir geri kalan 9 geni kodlamaktadır [43]. rRNA genlerinin tümü de GT-ce zengin ağır zincir tarafından kodlanır [45].

Ağır zincir oksidatif fosforilasyon sisteminin (OXPHOS) 12 altünitesini kodlamaktadır. Bunlar:

- NADH ubikinin oksiredüktaz altüniteleri:
    - NADH dehidrogenaz altünite 1(MT-ND1),
    - NADH dehidrogenaz altünite 2 (MT-ND2),
    - NADH dehidrogenaz altünite 3 (MT-ND3),
    - NADH dehidrogenaz altünite 4(MT-ND4),
    - NADH dehidrogenaz altünite 4L(MT-ND4L),
    - NADH dehidrogenaz altünite 5 (MT-ND5),
- sitokrom oksidaz Bc1 altünitesi:
    - Cytochrome B (CytB),
- sitokrom oksidaz altüniteleri:

- Cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1),
- Cytochrome c oxidase subunit 2 (CO2),
- Cytochrome c oxidase subunit 3 (CO3),

- ATP sentaz altünitelerinden:
  - ATP sentaz altünite 6 (ATP6)
  - ATP sentaz altünite 8 (ATP8)

genleridir.

Ayrıca 2 adet ribozomal,

- 12S rRNA ve
- 16S rRNA geni ile 14 tRNA geni ağır zincirden kodlanmaktadır[43].

Mitokondiral DNA'nın hafif zincirinden ise

- 8 adet tRNA ve
- NADH ubikinin oksiredüktaz geni olan NADH dehidrogenaz altünite 6 (MT-ND6) kodlanmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda mitokondriyal genomun genetik içeriği yeniden incelenmiş ve daha önce gözden kaçan proteine kodlanmayan transkriptler tanımlanmıştır [42].

mtDNA üzerinde kodlama yapmayan, yani protein ürününe çevrilmeyen bir DNA bölgesi mevcuttur. D-loop adı verilen bu bölge, memelilerde mitokondriyal genomun replikasyonu ve transkripsiyonu için bilenen kontrol dizilerini içeren, mtDNA'nın üç iplikli yapıdaki yaklaşık 1100 nükleotidlik kodlanmayan bölgesidir [42].

D-loop, mitokondriyal genlerin promotor bölgeleri olan hafif zincir promotor (LSP) ve ağır zincir promotor (HSP) bölgeleri ile 7S DNA olarak bilinen üçüncü kısa bir DNA zincirinin kararlı bir şekilde birarada bulunmasıyla oluşmuştur [41, 42]. İşlevsel önemiyle birlikte, birçok çalışma D-loop bölgesinin mitokondrial genomun evrimsel süreçte en hızlı değişen kısmı olduğunu göstermiştir [46]. Mitokondrideki D-loop bölgesinin varlığı kırk yılı aşkın bir süredir bilinmesine rağmen, bu yapının neden sentezlendiği ve korunduğu anlaşılamamıştır. Bununla birlikte D-loop bölgesindeki kısa 7S DNA zincirinin ağır zincirin replikasyonunda primer olarak kullanıldığı düşünülmektedir [41].

mtDNA'nın replikasyonu hücre döngüsünden bağımsızdır ve bugüne kadar, sadece birkaç enzimin sürece katıldığı bilinmektedir, aralarında mitokondriyal DNA polimeraz γ (POLG , aynı zamanda 3′ – 5 ′ eksonükleaz / proofreading aktivitesine

sahiptir) ve Twinkle (bir DNA helikaz) özellikle önemlidir, çünkü bu genlerdeki mutasyonların farklı mitokondriyal hastalıklara sebep olduğu saptanmıştır [47].

2.2.3. Mitokondride Kodlanan Genlerin Transkripsiyonu

Mitokondri; bağımsız genomu, polisitronik transkriptleri ve mitokondriyal transkripsiyonu düzenleyen mekanizmaları ile hücrenin geri kalanından ayrılan, evrimsel olarak korunmuş, prokaryotik benzeri bir sisteme sahiptir. Bununla birlikte mtDNA transkripsiyonunun nükleer DNA tarafından kodlanan mitokondriye spesifik faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir [42].

mtDNA transkripsiyonunun üç adet temel bileşeni bulunmaktadır:

1. Bakteriyofaj T7 RNA polimeraza yapısal benzerliği olan *mitokondriyal RNA polimeraz* (POLRMT);
2. *Mitokondriyal transkripsiyon faktörü B2* (TFB2M); ve
3. *Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A* (TFAM).

Ayrıca mtDNA transkripsiyonunda görev alan, bir transkripsiyon uzama faktörü (TEFM) ve bir transkripsiyon sonlandırma faktörü (mTERF1) de mevcuttur [42, 43].

TFB2M ve TFB1M, maya mitokondriyal transkripsiyon faktörünün antik memeli kopyalarıdır ve bakteriyel rRNA dimetiltransferazın homologlarıdır. Bunlardan TFB2M esas olarak bir mitokondriyal transkripsiyon başlatma faktörü özelliği kazanmış olup, TFB1M ise metil transferaz aktivitesini korumuştur [42].

Yüksek mobilite grubu (HMG) proteinlerinin bir üyesi olan, mitokondriyal DNA'nın D-loop bölgesindeki HSP1 ve LSP promotorlarına spesifik olarak bağlanıp transkripsiyon aktivasyonunu başlatan TFAM, HMG protein ailesinin diğer üyelerine benzer şekilde dizi özgüllüğünden bağımsız olarak da DNA'ya bağlanabilir, DNA'yı sarabilir, bükebilir ve çözebilir. TFAM, histonla ilişkili proteinlerden yoksun olan mtDNA üzerinde histon benzeri bir görev üstlenip DNA üzerinde U-dönüşler oluşturarak mitokondriyal genomu sarar, daha kompakt ve organize bir yapıda bulunmasını sağlar [48]. TFAM, insan D-loop bölgesinde doğal olarak bulunan ve mtDNA replikasyonunda da rol oynayan dizi üzerindeki G-dörtlü yapılara yüksek bir afinite ile bağlanabilmektedir [49]. Bu bulgular TFAM'ın mtDNA transkripsiyonuyla birlikte, replikasyonunda da önemli bir eleman olduğunu göstermektedir. TFAM geni susturulan farelerde mtDNA eksikliğine ve mitokondriyal enerjitik bozukluklara bağlı olarak embriyonik dönemde ölüm görülmesi, TFAM'ın hayati fonksiyonlar üstlendiğini göstermektedir [48, 50].

Ayrıca TFAM'ın yaşa bağlı olarak mtDNA'ya bağlanma affinitesinin arttığı ve bu artışın mtDNA'da yaşa bağlı oluşan hasarın onarımıyla ilgili olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla DNA onarımında rol oynadığı ve DNA'yı hasarlara karşı koruduğu düşünülmektedir [49].

mtDNA transkripsiyonu, transkripsiyon başlangıç noktasının yukarısındaki bir bölgeye TFAM bağlanmasıyla başlatılır. TFAM ilk olarak HSP1 ve LSP promotörlerinin yukarısındaki yüksek afiniteli bağlanma bölgelerine bağlanır ve mtDNA'da keskin bir bükülmeye neden olur. Bu bölgeler DNase I ayak izi ile LSP ve HSP1 transkripsiyon başlangıç bölgelerine göre -12,-35 pozisyonuna denk gelmektedir. LSP promotör bölgesindeki 180 ° 'lik bir bükülme, transkripsiyon başlangıç alanına göre mitokondriyal transkripsiyon kompleksinin doğru konumlandırılması için önemlidir. TFAM-mtDNA kompleksi, TFAM'ın C-terminal bölgesine lokalize etkileşimler yoluyla POLRMT'yi yapıya katar ve böylece bir transkripsiyon başlama öncesi kompleks oluşturur. Ardından transkripsiyon başlama kompleksinin diğer elemanı TFB2M komplekse katılır. Transkripsiyon başlatma öncesi kompleksine TFB2M alımı, promotor ile POLRMT'nin katalitik bölgesinin bağlanmasını kolaylaştırır. Son olarak, mitokondriyal transkripsiyon uzama faktörü (TEFM) kompleks ile etkileşerek zincirin uzamasını sağlar [42].

mtDNA transkripsiyon düzenleme sisteminin nukleustan ayrı bir ortamda gerçekleşmesine rağmen, mitokondriyal prokaryotik progenitörlerinin konakçının düzenleyici ortamına uyum sağladığı, dolayısıyla bu şekilde nükleer transkripsiyon düzenlenmesine uyum sağlayabileceği bildirilmiştir. mtDNA transkripsiyon sistemi, polististronik mtDNA transkriptlerinin oluşturulması ve POLRMT'nin faj benzeri yapısı gibi bazı eski prokaryotik özellikleri korumaktadır. Ancak geleneksel görüşten farklı olarak son yıllarda yapılan çalışmalar mtDNA transkripsiyonunun yalnızca mitokondriye özel faktörler tarafından değil, aynı zamanda bilinen nükleer transkripsiyon faktörleri tarafından da düzenlendiğini göstermiştir [42, 51].

2.2.3.1. Mitokondride Çalışan Nükleer Transkripsiyon Faktörleri

Potansiyel olarak nükleer transkripsiyon faktörleri mitokondriyal gen anlatımında doğrudan veya dolaylı olmak üzere iki şekilde görev alabilmektedirler.

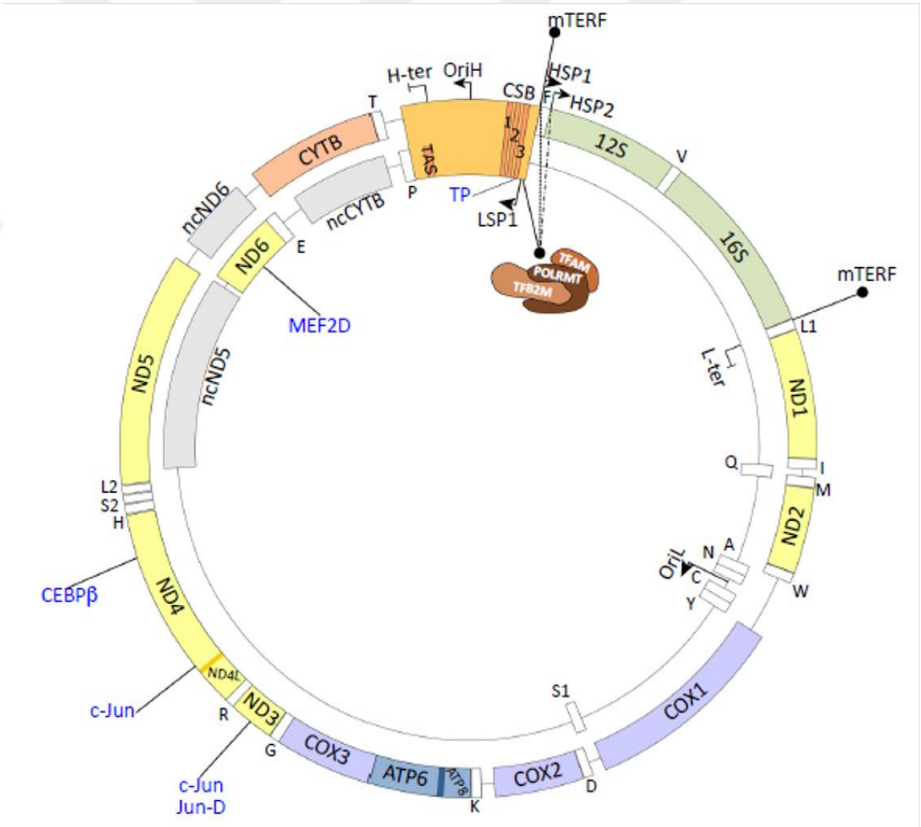
Nükleer TF'lerin, nükleusta kodlanan mitokondriyal genlerin anlatımlarını düzenleyebilmesi "dolaylı düzenleme" olarak adlandırılmaktadır. Bu gen ürünleri mitokondrinin yapısına katılan, biyoenerjitik fonksiyonlarda görev alan proteinler ya da

mitokondriyal TF'lerdir. Nükleer solunum faktörleri 1 ve 2 (NRF-1 ve NRF-2) dolaylı yoldan görev yapan TF'lere örnek gösterilebilir [51].

Doğrudan düzenleme yolunda ise, nükleer TF'ler mitokondriye transloke olup doğrudan mtDNA'ya bağlanarak mitokondrial gen anlatımını düzenleyebilmektedir. Böyle bir düzenleme için ilk kanıtlar nükleusu çıkartılmış hücrelere yapılan tiroid uygulamasında, D-loop ve 12S rRNA genine bağlanan tiroid hormonunun mitokondriyal gen anlatımını değiştirdiğinin belirlenmesiyle ortaya çıkmıştır [42]. Böylece nükleer TF'lerinin mitokondriyal gen anlatımının düzenlenmesinde doğrudan görev alabileceği ve bu işlemi nükleustan bağımsız yapılabileceği kanıtlanmıştır. Memelilerde, mitokondriyal gen anlatımlarında görev aldığı en iyi tanımlanan nükleer TF'lere CREB, p53, Stat3 ve östrojen reseptörü örnek gösterilebilir [42].

Şimdiye kadar yapılan kromatin immunpresipitasyon-dizileme (ChIP-Dizileme) sonuçlarının taranmasıyla ve çoklu ChIP deneylerine ait bilgilerden yola çıkarak yapılan bir çalışmada, insan hücrelerinde c-Jun, JunD ve CEBP betanın mtDNA'ya bağlandığı kanıtlanmıştır [52]. Bir hücrede eksprese edilen bir TF bazı spesifik mitokondrial genlerin ekspresyonunu değiştiriken, farklı bir nükleer TF mitokondrial genomda farklı bir ekspresyon profiline sebep olabilir. Örneğin, stres ve enfeksiyona karşı hücresel tepkileri düzenleyen nükleer faktör-kappa β (NF-κβ) transkripsiyon faktörleri ailesi üyelerinin mitokondriye lokalize olduğu bildirilmiştir. Bu ailenin bir üyesi olan p65 (RelA)'in p53 yokluğunda insan hücrelerinde mtDNA D-loop bölgesine bağlanarak, mtDNA tarafından kodlanan CO3 ve CytB mRNA'larının seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir [42, 53]. Başka bir çalışmada CREB'nin mtDNA D-loop bölgesine bağlanmasının ardından miyosit arttırıcı faktör 2D'nin (MEFD2) de mtDNA'ya bağlanarak transkripsiyonun düzenlenmesine katıldığı gösterilmiştir [54]. Nükleer genomda transkripsiyon faktörü olarak çalışan bazı streoid hormon reseptörlerinin de mitokondriyal genoma bağlandığı bildirilmiştir. Steroid hormon reseptörlerinden östrojen reseptörünün, kalp hücrelerinin mitokondrilerinde mtDNA'ya bağlandığı ve bunu takiben kompleks V gen ekspresyonunda bir artış olduğu gösterilmiştir [55]. Diğer bir streoid hormon reseptörü olan glukokortikoid reseptörünün (GR), nükleer genomda tanıdığı glukokortikoid duyarlı elementlere (GRE) benzer şekilde mitokondriyal genomdaki sekanslara da bağlanıp mitokondriyal transkripsiyona doğrudan etki ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmada HepG2 hücrelerinin GR'nin, mitokondrial genomun düzenleyici D-loop bölgesine bağlandığı bildirilmiştir [56]. Yüksek glukoz içeren kültür medyumunda çoğaltılan sığır

retinal endotel hücrelerinde mtDNA transkript seviyesi ile ilişkili olduğu düşünülen DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) için D-loop bağlanması rapor edilmiştir [57]. Bu bulgu, mtDNA gen ekspresyonunun düzenlemesinde epigenetik modifikasyonlar için bir rol önermekle birlikte, önemli bir tartışma konusudur [57]. G-dörtlü tekrarları içeren sekanslarda mitokondriyal Lon proteaz için in vivo mtDNA bağlanması rapor edilmiştir, ancak bu gözlemin mtDNA transkripsiyonundaki önemi belirsizliğini korumaktadır[58]. Sinyal iletiminde görev alan ve bir transkrpsiyon faktörü olan STAT3'ün, farklı hücre tiplerinde, farklı hedef genleri aktive etme potansiyelini mtDNA'ya bağlanarak da gösterdiği bildirilmiştir. STAT3'ün hem keratinositlerde hem de embriyonik kök hücrelerde mtDNA'ya bağlanabildiği rapor edilmiştir [42, 59]. Keratinositlerde STAT3'ün, solunum zinciri genlerinin ekspresyonunu azalttığı, ana mitokondriyal transkripsiyon faktörü TFAM ile etkileşime girerek transkripsiyonel bir baskılayıcı gibi davrandığı, ETS aktivitesinin azalmasına yol açtığı görülmektedir[42].



Şekil 2-4 Mitokondriyal genom ve mitokondriyal transkripsiyonda görev aldığı bilinen transkripsiyon faktörleri gösterilmiştir.

CSB, korunmuş dizi blokları; TAS, sonlanma ilişkili dizi; TP, yeni keşfedilen transkripsiyon duraklatma sitesini temsil eder. Oklar, replikasyon orijinlerini (OriH, OriL) ve promotörlerin (HSP1, HSP2 ve LSP) yönünü gösterir. Transkripsiyon başlatma kompleksi (POLRMT, TFAM ve TFB2M) kahverengi bulutlar olarak belirtilmiştir. (Görsel Gilad Barshad [42]'den uyarlanmıştır).

2.3. Mitokondri ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar, yavaş ilerleyen, genellikle fizyolojik olarak birbiriyle ilişkili nöronal sistemlerin kaybı ile karakterizedir. Bunun yanında nörodejeneratif hastalıklar, beyin ile sınırlı olmayıp sistemik hastalıklardır. Hücrede fonksiyon kaybının belirli nöroanatomik paternleri ile ilişkili klinik semptomlar tipik olarak başlangıçta biliş, hareket, güç, koordinasyon, işitme, görme veya otonomik kontrolü etkileyip etkilemediklerine göre kategorize edilir. Bu hastalıklar arasında AH, Parkinson Hastalığı (PH),Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) ve Huntington Hastalığı (HH) gibi hastalıklar sayılabilir. Söz konusu hastalıkların genetik alt yapısı olmasına rağmen hastalıkların çoğu sporadik ve yaşa bağlı bir gelişim gösterir[37, 60].

Birçok nörodejeneratif hastalık mitokondrial fonksiyon bozuklukları ile anormal mitokondriyal morfoloji gösterir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, anormal mitokondriyal DNA'nın, mitokondri ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime giren mutasyona uğramış nükleer proteinlerin veya bilinmeyen nedenlerin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Çoğu durumda, nöronlarda fonksiyon kaybı ve sonuçta nöron ölümüne neden olan hastalıkların patolojisinde mitokondrinin nerede durduğu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun nörodejenerasyonun hangi adımında görev aldığı halen belirsizdir [37, 60].

Yukarıda da anlatıldığı gibi mitokondrilerin ATP üretimi, hücre içi Ca^{+2} homeostazı, ROS oluşumu ve apoptoz gibi birçok hücre içi fonksiyonda merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Nöronlar, yüksek enerji ihtiyaçları nedeniyle çok sayıda mitokondri bulunduran hücrelerdir. Dolayısıyla nöronların vücudumuzdaki diğer hücrelere kıyasla mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna daha hassas oldukları söylenebilir. mtDNA mutasyonlarının neden olduğu mitokondriyal hastalıklar genel olarak farklı sistemleri ve dokuları etkileyen çok semptomatik hastalıklardır. Kas koordinasyonunun kaybı, kas zayıflığı, görme sorunları, işitme sorunları, öğrenme güçlükleri, solunum bozuklukları ve bunama gibi bir çok semptom bulunabilir. En çok etkilenen dokular ise miyositler ve nöronlar gibi post-mitotik dokulardır. Bu durum, mtDNA mutasyonları taşıyan ve anneden kalıtılan hastalıkların semptomlarının, vücudun en aerobik iki dokusu olan merkezi sinir sistemini ile kaslarda en fazla oranda görülmesiyle desteklenmektedir [60]. Bu özel duyarlılığın nedenleri, bu hücrelerin enerji

ihtiyaçlarının diğer hücrelere kıyasla çok fazla olmasının yanında hücrelerin proliferatif olmayan doğasından yatmaktadır, bu da yüksek seviyede hasar görmüş veya mutasyona uğramış mtDNA içeren hücreleri ortadan kaldırmayı zorlaştırmaktadır [61].

Nörodejenerasyonda mitokondriyal bozukluğun bir sonucu olarak hücrede artan ROS aktivitesi, süperoksit radikallerinin yok edilememesi, hücresel homeostazın bozulmasının en önemli nedeni arasında gösterilir. Diğer yandan ETS'nin farklı komplekslerindeki eksiklikler çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Genellikle PH ile kompleks I, HH ile kompleks II ve kompleks III ilişkilendirilir. AH'de nörodejenerasyondan en fazla etkilenen merkezi sinir sistemi bölgelerinde kompleks IV eksikliğinin görüldüğü vurgulamıştır. Genellikle oksidatif fosforilasyon bozukluğunun yüksek oranda görüldüğü beyin bölgelerinde, kompleks IV inaktivasyonu olan nöronların daha fazla kaybedileceği ileri sürülmüştür. Kompleks IV eksik nöronların AH'de normal beyinlere kıyasla daha yüksek oranda görüldüğü ve kompleks IV eksikliğinin, mutant mtDNA seviyelerinin artmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir [37, 60]. Bununla birlikte, bu karmaşık mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının, belirli bir hastalığa özel olmadığı, bunun gibi bir ilişkilendirmenin her zaman doğru bir önerme olamayacağı da belirtilmektedir [60].

Aşağıda PH, MS, ALS, HH gibi ilerleyici nörodejeneratif hastalıkların mitokondriyal yapı ve fonksiyonlarındaki bozukluklar kısaca özetlenmiştir. AH ve mitokondriyal bozuklukları ise Bölüm 2.3.1'de detaylı şekilde anlatılacaktır.

PH, çoğunlukla motor (tremor, postüral instabilite, rijidite ve bradikinezi) ve motor dışı semptomlar (yorgunluk, depresyon, anksiyete, uyku bozuklukları, otonomik bozukluklar) ile karakterize edilen ikinci en yaygın ilerleyici nörodejeneratif bozukluktur [60, 62]. Motor semptomların nedeni, orta beyinde bulunan ve substantia nigra'yı (SN) oluşturan dopaminerjik nöronların dopamin yetersizliğinden kaynaklı spesifik kaybıdır. PH'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun ve nörodejenerasyonda özellikle elektron taşıma zincirinin I ve IV komplekslerinin rolü son yıllarda önem kazanmıştır. 1989 yılında, birkaç grup idiyopatik PH'li hastaların substantia nigrada, trombositlerde ve iskelet kasında kompleks I aktivitesinin azaldığını bildirmiştir [60]. Bu çalışmaları destekleyen nitelikte bir başka çalışmada ise kompleks I inhibitörü olan rotenon uyguluanan sıçanlarda substantia nigrada nöronların kaybı ve alfa sinuklein açısından zengin inkluzyon cisimcikleri (Lewy

cisimcikleri) oluşumu ile karakterize edilen PH benzeri bir sendrom gelişmiştir [60]. Farklı gruplar tarafından postmortem PH beyinlerinde ve PH hastalarının kan örneklerinde mtDNA gen ekspresyonunda bazı OXPHOS genlerinde ekspresyon seviyelerinde de değişim gösterilmiştir [43, 44, 63]. Ayrıca mtDNA üzerindeki polimorfizmlerin solunum zinciri aktivitesi ve ROS üretimini etkilediği ve bazı haplotiplerin PH geliştirmek için daha yüksek veya daha düşük risk faktörleri sağlayabileceği önerilmiştir [60]. Ailesel PH'de otozomal dominant ve/veya resesif olarak kalıtılabilen mitokondri ilişkili birkaç nükleer gen mutasyonu da tanımlanmıştır. Örneğin, bir ubikuitin ligaz olan ve mitokondriyi korumada görev alan E3 ubikitin-protein ligaz (PARKIN) ile hücrede apoptoza karşı koruma sağlayan mitokondride lokalize bir kinaz olan fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) ile indüklenen kinaz 1 (PINK1) mutasyonları PH ile ilişkisi gösterilmiş önemli mutasyonlardan bazılarıdır [60]. Tüm bu çalışmaların dışında PH hastalarının mitokondrial gen ekspresyonu da bir takım değişiklikler gösterdiği bulunmuştur. Önemli bir çalışma PH hastalarının postmortem beyin dokolarında mtDNA gen ekspresyon değişikliklerini incelemiştir. Grubumuz önceki çalışmasında yaş ve aile geçmişlerine göre sınıflandırılan PH hastalarının lökositlerinden mtDNA tarafından kodlanan OXPHOS alt ünitelerine ait 13 genin ve nükleer DNA'da kodlanan PARKIN ve PINK1 genlerinin ekspresyon seviyelerini araştırmıştır. Çalışmamız sonucu PARKIN ve PINK1 gen ekspresyonunun bütün PH hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre önemli derece düştüğü saptanmıştır. mtDNA kodlu 13 genden MT-ND4, MT-ND5 ve MT-ND6, MT-CYB, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-ATP6 ve MT-ATP8'in ekspresyonlarının tüm PH hastalarında arttığı görülmüştür. Bununla birlikte sınıflandırdığımız PH hastalarından elde edilen bu ekpresyon profillerinin; hastaları kendi arasında hem yaş hem de ailesel geçmişlerine göre sağlıklı kontrollerden ayıran belirli bir patern oluşturduğu literatürde ilk kez gösterilmiştir. Aynı çalışmada mtDNA kopya sayısı da ölçülmüş ve hastalar ile kontroller arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir [44].

ALS, hızla ilerleyen halsizlik, kas atrofisi, kas dizartri, disfaji, üst ve alt motor nöronların dejenerasyonunun neden olduğu dispne ile karakterize bir motor nöron hastalığıdır [60]. ALS hastalarında yapılan çalışmalarda tuhaf, dev ve dikenli morfolojiye sahip mitokondrilerin normal morfolojidekilere göre sayıca daha fazla oldukları tespit edilmiştir. ALS hastalarında kas ve beyinde artmış mtDNA delesyonları da bulunmuştur. Aynı zamanda nöronların aksonlarında anormal mitokondrial birikimler rapor edilmiştir.

Mitokondriyal ETS aktivitelerindeki değişiklikler, ALS'li hastalardan alınan biyopsiler ve ALS hayvan modellerini kullanan birkaç grup tarafından kaydedilmiştir [60]. Sporadik ALS hastalarında ise azalmış kompleks IV aktivitesi bildirilmiştir. Ayrıca, mtDNA mutasyonları olan bazı hastalarda, spesifik bir ALS fenotipi teşhis edilmiştir [43, 60].

MS, miyelin kaybı ile karakterize kronik bir enflamatuvar otoimmün hastalıktır. Bu hastalığın etiyolojisi büyük ölçüde bilinmemekle birlikte genetik, çevresel ve enfektif ajan temeline dayanan hipotezler ileri sürülmektedir. MS hastalarının kortikal nöronlarında TFAM, PGC1a ve NF1 genlerinin ekspresyonunda değişikliklerin bulunmasıyla hastalığa mitokondrial bir bakış açısı önerilmiştir. Ayrıca MS hastalarının postmortem beyinlerinde yapılan çalışmalarda OXPHOS kompleks I ve kompleks III aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Diğer taraftan MS hastalarında farklı mtDNA mutasyonları ve delesyonları tespit edilmiştir. Ancak bu mutasyonların direkt olarak hastalığa neden olup olmadığı halen tartışılmaktadır [43, 60].

Yukarıda da anlatıldığı gibi, mitokondriyal anormalliklerin geç başlangıçlı nörodejeneratif hastalıkların yanında, mitokondriyal süreçlerde görev alan genlerin mutasyonları aracılığıyla hastalıkların ailesel formlarında da etkili olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, mitokondriyal anormallikler nörodejeneratif hastalıkların gelişimini veya ilerleyişini etkileyen faktörlerdir. Ancak; örneğin bazı yaşlı kişileri PH gelişimine, diğerlerini ise AH'ye karşı neyin duyarlı kıldığı hala belirsizdir. Epigenetik faktörler ve yaşam tarzı aktiviteleri, bu hastalıklara yaşa bağlı duyarlılığa katkıda bulunabilir [37].

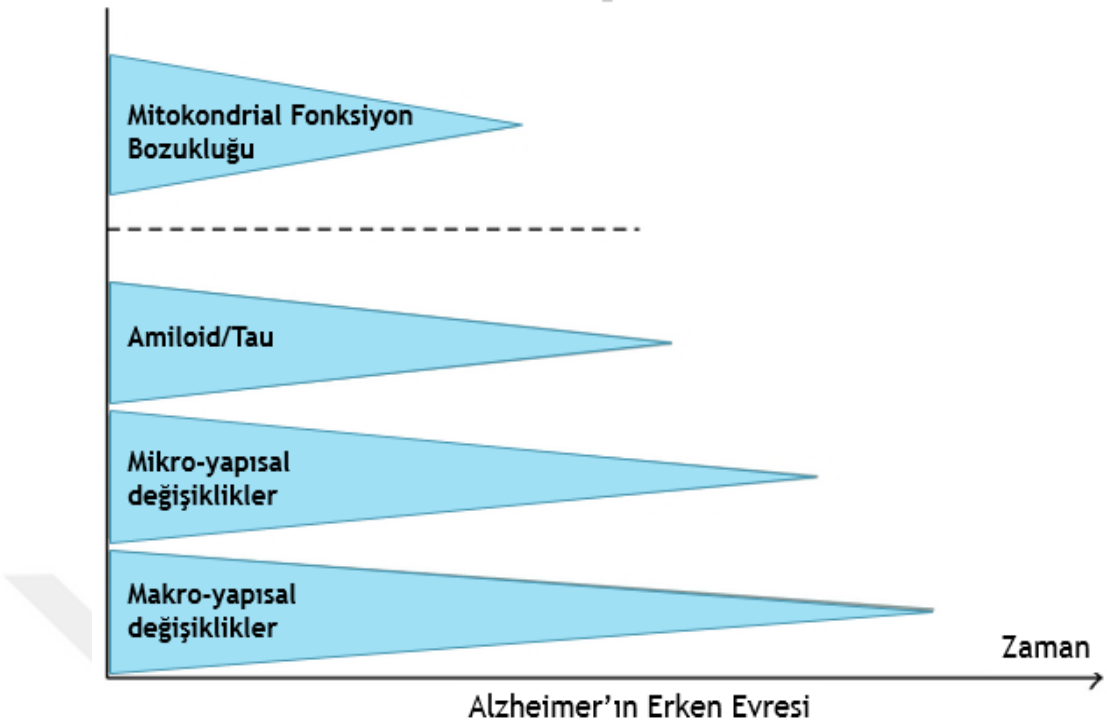
2.3.1. Mitokondri'nin Alzheimer Hastalığındaki Rolü

AH, hafıza ve bilişsel işlevlerin kaybını içeren, kognitif bozukluklarla karakterize yaşa bağlı olarak ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Daha önce Bölüm 2.1'de detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi AH hastalarının postmortem beyinlerinde iki ana patolojik bulgu gözlenmiştir:

1) hücre içi nörofibriler yumaklar ve
2) hücre dışı Aβ1-42 birikimleri.

AH patogenezi çok sayıda moleküler ve hücresel olayı içermesine rağmen, AH gelişiminde erken ortaya çıkan iki temel bulgu vardır. Bunlar, mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ve sinaptik hasardır.

Normal kognitif ve bilişsel aktiviteler için, nöronlar arasındaki iletişimin, ATP üretiminin ve sinaptik aktivitenin normal olması gerekmektedir. Ancak yaşlı bireyler ile AH hastalarında bu aktiviteler kesintiye uğramıştır. Genellikle sinapslarda ve sinaptik mitokondrilerdeki Aβ1-42 birikiminin ATP üretimindeki aksamalarla sinaptik veziküllerin ve nörotransmitterlerin salınmasını etkilediği gösterilmiştir. Ek olarak AH hastalarının nöronlarında mitokondriyal trafiğin de yüksek derecede kesintiye uğradığı görülmektedir. Sağlıklı nöronlarda mitokondriler hücre gövdesinden akson, dendrit ve sinapslara doğru anterograde hareket göstererek buralarda ATP üretirler. Ardından yeterli ATP tedariği sağlandığında retrograde hareket ile hücre gövdesine geri dönerler. AH nörolarında ise bu mekanizma inaktif ya da hasarlı mitokondrilerden dolayı anormallik göstermektedir [37]. Bununla birlikte Aβ1-42'nin nörodejenerasyona nasıl yol açabileceği pek açık değildir. Olası bir mekanizma, Aβ1-42'nin mitokondriyal fonksiyona müdahale etmesidir. Hücre kültüründe yapılan çalışmalarda Aβ1-42 uygulamasının ardından Aβ içeriğini koruyan izole edilmiş mitokondrilerde genel olarak azalmış solunum kapasitesi, sitokrom oksidaz, a-ketoglutarat ve piruvat dehidrojenaz dahil olmak üzere bazı anahtar enzimlerin inhibisyonu gösterilmiştir[60]. Subletal konsantrasyonlarda kısa süreliğine Aβ1-42 uygulaması yapılmış sıçan primer nöron kültürü hücrelerinde belirgin bir hücre ölümü olmamasına rağmen, hücre içi mitokondri hareketlerinin hızlı bir şekilde bozulduğu gösterilmiştir [64]. İlginç olarak yine Aβ1-42 uygulaması yapılmış hücrelerde mtDNA kopya sayısının arttığı, ancak normal morfolojiye sahip mitokondrilerin azaldığı görülmüştür [60]. Dolayısıyla AH hastalarında oksidatif fosforilasyon bozukluğu, reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması, mitokondriyal dinamiklerin değiştirilmesi ve mitokondriyal proteinlerle etkileşim gibi bir dizi yoldan mitokondriyal fonksiyon bozukluğu görülebilir.



Şekil 2-5 AH'de potansiyel biyobelirteçlerin zaman çizelgesi gösterilmiştir.

AH'nin klinik tanısından önce; Aβ agregasyonu ardından mikro ve makro yapısal değişikliklerin zamana bağlı bir şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir. Son araştırmalar, AH'nin patofizyolojik aşamalrında mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun birincil olarak meydana geldiği; AH'li beyinde mikro ve makro yapısal değişikliklere yol açtığına işaret edilmektedir. (Görsel Ferencez [65] 'den uyarlanmıştır).

Postmortem AH beyinlerinde yapılan çalışmalar, beyinde artan oksidatif hasar seviyelerini ortaya çıkarmıştır. Mitokondri, hücresel ROS üretiminin birincil kaynağı olduğundan, bir organizma yaşlandıkça mitokondriyal enzimlerin oksidatif hasara karşı özellikle savunmasız olacağı düşünülmektedir. Mitokondriyal enzimlerde görülen hasar, elektron taşınmasında kusurlara neden olur ve ROS üretimini teşvik eder. Redoks proteomik analizi, AH hastalarında VDAC, aconitase, GAPDH ve laktat dehidrojenaz dahil olmak üzere bir dizi mitokondriyal proteinin oksidatif olarak modifiye edildiğini göstermiştir [66]. APP mutant farelerde artmış Aβ seviyeleri, bilişsel ilişkili beyin bölgelerinde glikoz metabolizmasını değiştirmiştir. Ayrıca, mitokondri hedefli antioksidanların Aβ ile indüklenen mitokondriyal hasarı azalttığı gösterilmiştir. Birlikte ele alındığında, mitokondriyal kaynaklı oksidatif stresin kendisi, oksidatif stresi artıran ve mitokondriyal fonksiyonu bozan Aβ1-42 üretimini indükleyebilir ve Aβ1-42 seviyelerini artıran bir ileri besleme döngüsü sağlayabilir [13].

Aβ1-42 hücre membranında porlar oluşturarak hücre içi Ca^{+2} girşinin artmasına neden olduğu gibi, mitokondriyal membran geçiş gözeneklerinde de porlar oluşturarak, mitokondrideki Ca^{+2} seviyesinin artmasına da neden olur. Bu durum mitokondriyal membrana zarar vererek mitokondrinin yapısal ve fonksiyonel anormalliklerine yol açabilir. Sadece Aβ1-42'nin oligomer formunun nöronlara büyük bir Ca^{+2} girişini indüklediğini ve mitokondriyal Ca^{+2} aşırı yüklenmesini teşvik ettiği belirtilmiştir [67]. Ayrıca Aβ1-42'nin neden olduğu bu porlar, sitokrom c salınımına yardımcı olarak apoptozu indükleyebilir [67]. APP transgenik farelerde yapılan bir çalışma Aβ1-42 seviyesi ile H_2O_2seviyesinde parallellik göstermiştir. Aynı çalışmada transgenik farelerde APP'nin ve Aβ1-42'nin mitokondri ile aralarında fiziksel bir etkileşim bildirilmiştir [60, 68].

Hücresel düzeyde yapılan araştırmalarda mitokondride tespit edilen fonksiyonel değişimlerin yanısıra, AH hastalarında mitokondriyal-yapısal dinamiklerin de değiştiği bildirilmiştir. AH hastalarının beyinlerinde, bu hastalarla yaş parallelliği gösteren sağlıklı bireylerin beyinlerine kıyasla, normal mitokondri içeriğinin önemli ölçüde daha düşük, var olan mitokondrilerin de krsitalarının hasarlı olduğu belirtilmiştir [60]. AH hastalarından alınan beyin doku örneklerinde özellikle piramidal nöronların mitokondrilerinde, kırık krista, bazen de iç zarın tamamen kaybı gibi yapısal bozukluklar tespit edilmiştir. Ayrıca sporadik AH vakalarının fibroblastlarındaki mitokondrilerin, sağlıklı kontrollerin mitokondrilerinden belirgin olarak farklı, uzamış/sosis şeklini aldıkları ve birlikte yüksek derecede ağsı bir yapı oluşturdukları belirtilmiştir [69]. Benzer morfolojik değişiklikler APP'yi yüksek miktarda eksprese eden nöronlarda da gösterilmiştir. Bu nöronların mitokondrileri heterojen morfoloji göstermektedirler; hücrelerin yaklaşık %50'si parçalanmış/fragmente mitokondri içerirken bazılarında mitokondrilerin uzamış, ağ benzeri yapılar gösterdiği bildirilmiştir [70]. Diğer taraftan AH beyinlerinin nöronlarında önemli ölçüde artmış mitokondriyal boyut (şişik mitokondri) ve azalan mitokondri sayısı, AH beyninde anormal mitokondriyal dinamiklerinin bir diğer kanıtıdır. Bu morfolojik farklılıklar, fizyon / füzyon proteinlerinin ekspresyonundaki farklı paterne bağlı olabilir. Örneğin AH fibroblastlarında azalmış DLP1 ekspresyonu, ancak değişmemiş OPA1 ekpresyonu gösterilmiştir. AH ve HBB hastalarının periferal kan lenfositlerinde DLP1'in önemli ölçüde azaldığını, ancak Fis1'in arttığı rapor edilmiştir [35]. Bu hastaların periferik hücrelerinde de mitokondriyal hasar ve artmış oksidatif stresin saptandığı rapor

edilmiştir. Aynı zamanda bu bulgular, mitokondriyal dinamiklerdeki eksikliklerin sistemik olduğu hipotezini de deskteklemektedir. Tüm bu bulguların yanında mitokondrial yapısal bozuklukların, özellikle de şişmiş mitokondri morfolojisinin nedeni, tam olarak anlaşılamamaktadır. Benzer morfolojik değişim, mitokondri füzyonunu sağlayan mitofusin2 (Mfn2) proteinini üretmeyen farelerin beyinlerinde de tespit edilmiştir. Füzyon proteinlerinin azalması ve Fisl proteininin artması ile AH beyinlerinde meydana gelen mitokondriyal fragmentasyonun temeli açıklanabilir [35, 67].

Mitokondrial kompleks IV, pirüvat dehidrogenaz kompleks ve alfa ketogluterat enzimlerinin AH' de aktivitelerin azaldığı bilinmektedir. On tanesi nükleer DNA ve üç tanesi mtDNA genleri tarafından kodlanan 13 protein alt biriminden oluşan COX enzimi, mitokondri solunum sistemindeki ETS'nin son basamak enzimdir ve sitokrom c'den elektron alır. 1990 yılında, AH hastalarının trombositlerinde yetersiz COX aktivitesi bulunmuştur [71]. Tüm bu bulgular AH'de mitokondrial hasarın meydana geldiğini ve AH'de ortaya çıkan mitokondrial fonksiyon kaybının beyin sınırlı olmaktan ziyade sistemik olduğunu kanıtlamıştır. Diğer taraftan COX aktivitesindeki düşüş Alzheimer Hastalığının ön basamağı olarak kabul edilen MCI hastalarında da bildirilmiştir [71].

APP transgenik farelerde yapılan bir çalışmada, bilişsel semptomların ortaya çıkmasından aylar önce, mitokondriyal genlerin ekspresyonun değiştiği gösterilmiştir. Bu durumun iki aylık farelerde görülmesi mitokondriyal değişimlerin hastalığın erken bir özelliği olarak kabul edilmesini destekler niteliktedir [68]. Başka bir çalışmada ise MCI hastalarının lökositlerinde nükleer genom tarafından kodlanan OXPHOS alt ünitelerinin ekspresyonunun azaldığı diğer taraftan mtDNA'dan kodlanan bazı OXPHOS genlerinin ise ekspresyonun arttığı gösterilmiştir. AH hastalarında özellikle kompleks IV ekspresyonunda düşüş görülmüştür [72].

Oksidatif stres, AH patofizyolojisinde anahtar bir özellik haline geldiğinden, AH-oksidatif stres ilişkisinde mitokondrinin rolü önemli yer tutmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi, mitokondri, mtDNA moleküllerinin birden fazla kopyasını içerir ve her hücrede bol miktarda mitokondri bulunur. Bu da bazı somatik mutasyonların hücrede görülme etkisini potansiyel olarak azaltır. Diğer taraftan mtDNA replikasyonları ile mutasyonların klonal olarak çoğaltılması, somatik mtDNA mutasyonlarını çok etkili kılabilir. Ayrıca, insanlarda dağılmış heteroplazmik somatik mtDNA mutasyonlarının yaşlanma ile birlikte kademeli olarak birikmesi, mtDNA'ya zararlı etkiler kazandırabilir,

böylece yaşın neden AH ve diğer nörodejeneratif hastalıklar için en büyük risk faktörü olarak kabul edildiğini bir kez daha açıklar. 75 yaşından küçük AH hastalarında kortikal nöronların mtDNA'sının, yaş uyumlu kontrollerden 15 kat daha fazla yaygın 5 kb'lık bir mtDNA delesyonuna sahip olduğunu göstermiştir [73].

AH hastalarında mtDNA kontrol bölgesinde, sağlıklı bireylere kıyasla çok daha fazla sporadik mutasyon olduğu ve mtDNA kontrol bölgesindeki birkaç mutasyonun AH'ye özgü olduğu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar, bilinen mtDNA transkripsiyon ve replikasyon düzenleyici elemanlarının bulunduğu bölgelerde meydana gelmiştir, bu nedenle kontrol bölgesindeki mtDNA mutasyonları beyindeki postmitotik hücrelerde kritik bir seviyeye ulaştıklarında, mitokondriyal homeostaz (örn., COX aktivitesi) için birtakım zararlı fonksiyonel sonuçlara neden olurlar. mtDNA'daki bu mutasyon artışının temelini araştıran çalışmalarda AH hastalarının serebral korteksinde ve serebellumunda mtDNA'da oksitlenmiş guanin nükleotid (8-hidroksi-2-deoksiguanozin) seviyeleri ölçülmüştür. AH hastalarındaki mtDNA'nın, yaş uyumlu kontrol gruplarına göre 3 kat daha fazla oksidatif hasara uğramış olduğu tespit edilmiştir [60]. Aslında, artan somatik mtDNA mutasyonlarının beyne özgü olmadığı görülmektedir, çünkü mtDNA kontrol bölgesi mutasyon seviyeleri aynı AH hastalarından alınan kan örneklerinden türetilen lenfoblastoid hücre hatlarında da artmıştır. Bu bulgular AH hastalarında mitokondriyal enzimatik fonksiton bozukluğu gibi, mtDNA'daki mutasyonların da sistemik olduğu gözlemiyle tutarlıdır [43, 60].

mtDNA—AH ilişkisinin önemini arttıran, biyokimyasal çalışmalar AH'deki mtDNA değişikliklerinin ROS oluşumunu arttırdığını ve AH patogenezini etkilediğine dair kanıtlar sağlamaktadır. Önemli bir çalışmada AH hastalarının mtDNA'sı izole ederek mtDNA içermeyen hücre hatlarına aktarılmıştır. Sonuçta AH hastalarının mtDNA'sı aktarılan hücrelerde; COX aktivitesinde biyokimyasal hasar, ROS seviyesinde artış ve AH hastalarının nöronlarında gözlemlenen kalsiyum kullanımındaki kusurlarla birlikte serbest radikallerin yıkımında görev alan enzimlerin aktivitesinde de artış gösterilmiştir [71].

Mitokondriyal genler sık polimorfik varyasyonlar içerirler. Bununla birlikte normal mtDNA gen ürünleri, ncDNA'dan kodlanan polimorfik varyasyonlar içeren nükleer mitokondrial proteinlerle birlikte çalışabilirler. Bu durumda çoğu mtDNA polimorfizmleri ile AH riski arasında epidemiyolojik bir ilişki kurulması zorlaşır.

mtDNA’nın AH patogenezine tam olarak nasıl katıldığı bilinmemesine rağmen, maternal kalıtımın hastalık riskini etkilediği düşünülmektedir. Aslında birçok çalışma AH'de direkt maternal kalıtımın etkisi olduğuna dair bir kanıt bulunmadığı söylerken, bazı epidemiyolojik çalışmalar maternal kalıtımın AH riskini güçlü bir şekilde etkilediğini belirtmektedir. Etkilenen bir ebeveyni olan AH hastaları arasında, etkilenen annelerin babalara oranı 3: 1'dir [73].

AH patolojisinde yaygın moleküler görüş amyloid kaskad hipotezi olmuştur. Ancak AH’de ortaya çıkan ve yukarıda anlatılan söz konusu mitokondrial bozuklukların çoğunun AH’de Aβ plaklarının oluşumundan önce, erken dönemde ortaya çıkması ve hastalığın ilerlmesine katkıda bulunması gibi bulgulardan yola çıkarak 2004 yılında “mitokondriyal kaskad hipotezi” önerilmiştir [74]. Mitokondriyal kaskad hipotezinde, mitokondri, AH patolojisi ve nörodejenerasyonun merkezinde yer almaktadır. Hipotez, AH’deki mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun; amiloidogenezi, tau fosforilasyonunu ve hücre döngüsünü tetiklediğini varsayar. Aβ1-42 fragmanları mitokondriyal fonksiyonu olumsuz etkiler, bu da mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun Aβ1-42 toksisitesinin bir sonucu olduğunu düşündürür, ayrıca AH fare modellerindeki çalışmalar Aβ1-42 oligomerizasyonunun mitokondriyal fonksiyonu yüksek oranda bozduğunu göstermektedir. Aβ1-42 öncül proteini olan APP, endoplazmik retikulum (ER) sinyal peptidi sayesinde ER’delokalize olabilmektedir. Mitokondrial kaskad hipotezine göre, APP’nin Aβ1-42 peptidilerini oluşturduğu proteolitik kırpılması, ağırlıklı olarak mitokondriyle fiziksel ve biyokimyasal etkileşim halindeki ER’nin bir kompartmanı olan ayrıca, γ-sekretaz aktivitesi bulunan mitokondriye bağlı ER membranları (MAM)'da meydana gelir [43, 75]. AH'de MAM fonksiyonu ve ER – mitokondri fiziksel etkileşimi artar, böylece AH'nin ayrıca bir ER-mitokondriyal iletişim ve MAM fonksiyon kaybı hastalığı olduğu ileri sürülür. Bu hipotez, amiloid kaskadı dışında, mitokondriyal disfonksiyon, yüksek kolesterol seviyeleri, yağ asitleri ve fosfolipitlerin değişen metabolizması ve anormal kalsiyum homeostazı gibi hastalıkta meydana gelen diğer biyokimyasal değişiklikleri de açıklayabilmektedir [43]. Mitokondriyal kaskad hipotezi de yaşlanma fenomenlerini dikkate alır. Mitokondriyal fonksiyonlardaki değişiklik bir eşik değere ulaştığında ve biyoenerjetik homeostaz artık sürdürülemezse, AH patolojisi ve semptomları ortaya çıkabilir.

Yukarıda belirtildiği gibi, AH’de mitokondriyal hasar sistemik olduğundan

AH'de değişen mitokondriyal fonksiyon, nörodejenerasyonun bir sonucunu temsil etmeyebilir. Birçok araştırmacı, mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının AH gelişiminde küçük bir rol oynayabileceğine inanmasına rağmen, hücre kültürü ve transgenik fare çalışmaları da dahil olmak üzere çeşitli çalışmaların sonuçları beyin mitokondriyal biyoenerjetik kusurlarının (oksidatif hasar, COX aktivitesi, oksijen tüketimi ve H_2O_2 üretimi) Aβ plaklarının oluşumundan önce geldiğini göstermektedir [60, 67].

2.4. Aβ1-42'nın Mitokondri Lokalizasyonu ve Etkileşimleri

2.4.1. Aβ'nın Mitokondriye Translokasyonu

Son yıllarda AH modeli oluşturulmuş fare beyinlerinde ve postmortem AH beyin dokularında yapılan çalışmalarda nöron hücrelerinin mitokondrial membranlarında Aβ1-42 birikimi saptanmıştır [68]. Hücre içi ve mitokondriyal Aβ birikiminin hücre dışı Aβ1-42 birikiminden önce meydana geldiği düşünülmektedir. Ancak Aβ'nın mitokondriyal membranlara taşındığı mekanizma tam olarak anlaşılamamakla birlikte, immüno-elektron mikroskopisi, hücre altı fraksiyonlama ve immünoblotlama teknikleri kullanılarak Aβ1-42'nin mitokondrial alımını araştıran çalışmalar, Aβ'nın mitokondrinin dış zarında bulunan translokazlar aracılığı ile taşındığını göstermektedir [67]. Bununla birlikte immüno-elektron mikroskopi çalışmaları Aβ'nın mitokondrilerin iç zarının kristasında lokalize olabildiğini göstermiştir [76].

Aβ'nın mitokondriye taşınması iki şekilde gerçekleşebilir:

1. Ekstraselüler Aβ'nın endositoz ve veziküler sistemler sayesinde hücre dışından hücre içine alınıp taşınabildiği ve mitokondrial proteinlerin transportunu sağlayan iç mitokondriyal zar translokaz (TIM) / dış mitokondriyal zar translokaz (TOM) protein kompleksleri aracılığıyla mitokondriye transportunun gerçekleşebileceği gösterilmiştir. Mitokondrial transport proteinlerinin çalışma mekanizması, taşınacak olan proteinin bir mitokondriyal sinyal peptidini tanıması ile gerçekleşmektedir. Ancak bazı durumlarda TOM kompleksi peptidlerin alfa heliks sarmal yapısını ayırt ederek taşınmayı gerçekleştirebilir. Aβ mitokondriyal sinyal peptidi taşımamasına rağmen, mitokondriye lokalize olabilmektedir. Bu durum Aβ'nın alfa heliks yapısının TOM kompleksi tarafından tanınmasıyla sağlanmaktadır [76].

2. Bunun yanında diğer bir seçenek olarak mitokondriye bağlı ER membranlarında Aβ üretimini takiben, Aβ'nın mitokondriye alımı gerçekleşebilir. APP'nin bir ER sinyal peptidi ve mitokondriyal hedefleme sinyalini barındıran asidik amino asitler ile zenginleştirilmiş bir bölgesi vardır. APP'deki asidik alanın, mitokondriyal translokasyon sisteminde birikmesine neden olan, TOM ve TIM proteinleri ile stabil kompleksler oluşturabildiği gösterilmiştir. MAM'da aktif γ-sekretaz kompleksi bulunur, bu protein kompleksi potansiyel olarak mitokondri çevresinde Aβ üretimine neden olur. Mitokondrial membranlara yakın bir alanda üretilen Aβ peptidleri mitokondri içerisine TIM/TOM kompleksleri aracılığıyla girebilir[76]. Ayrıca, translokasyon kanalları içinde biriken APP, mitokondriyal zarlar arası boşlukta (IMS) bulunan Omi proteazı ile parçalanırken, mitokondri dışındaki APP C terminal kısmı a / β-sekretazlar ile kesime uğrayabilir. Bununla birlikte, intramitokondriyal Aβ üretimi üzerine araştırmalar devam etmektedir [76].

2.4.2. Aβ'nın Mitokondrideki Etkileşimleri

a. Aβ'nın İç Mitokondrial Membran (IMM) ve Dış Mitokondrial Membran (OMIM) İle İlşkisi

Aβ peptidleri veya APP, mitokondriyal proteinlerin mitokondriye giriş-çıkışını engelleyecek şekilde mitokondri ile etkileşime geçebilir. Mitokondriyal proteinlerin ya da metabolik ürünlerin taşınmasında ortaya çıkan hasar, başlangıçta mitokondriyal bütünlüğü bozmak için yetersizdir, ancak zamanla daha fazla mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olur. Aβ, mitokondride protein giriş çıkışını sağlayan TIM ve TOM proteinleriyle doğrudan etkileşerek ya da dolaylı mekanizmalarla da protein giriş-çıkışını sekteye uğratabilir. Mitokondrinin hücre için önemi ve OXPHOS altünitelerinin bir kısmının nükleer genom tarafından kodlanıp mitokondriye taşındığı göz önüne alındığında, mitokondrideki protein taşınımının az bir hasara uğratılmasının bile hücredeki metabolik aktivitelerin bozulmasına neden olabileceği görülmektedir. Ayrıca, mitokondriye protein taşınmasındaki düşüş, artan ROS ve azalmış mitokondriyal membran potansiyelinden önce gelmekte ve mitokondri aktivitesinin kademeli olarak bozulmasına neden olabileceği düşünülmektedir [67, 77].

Özetle; dış ve iç mitokondriyal membranlarda ve matrikste Aβ1-42 bulunmuştur. Dış membrana lokalize olan Aβ, nükleer kodlanmış mitokondriyal proteinlerin mitokondriye taşınmasını engeller ve AH nöronlarında ETS aktivitelerini ve ATP üretimini bozar [67].

b. Aβ'nın Fizyon/ Füzyon proteinleri ile ilişkisi:

Mitokondriyal dinamiklerin mitokondrial fonksiyonlar üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Yukarıda anlatıldığı gibi birçok bulgu mitokondriyal Aβ'nin bozulmuş mitokondriyal dinamiklerde rol oynayabileceğini göstermektedir [6]. Mitokondriyal dinamiklerin bozulması, Aβ1-42 'nın direkt olarak bu dinamiklerden sorumlu proteinlerin üzerine etkisinden kaynaklanabileceği gibi, dolaylı olarak da söz konusu proteinlerin işleyisini dengesizliğe uğratabilir [77]. Aβ1-42'nın monomer ve oligomer formlarının mitokondride fizyondan sorumlu DLP1 ile fiziksel etkileşimleri gösterilmiştir. AH beynindeki bu anormal etkileşimler hastalığın ilerlemesiyle artmaya devam eder. Ancak bu etkileşimin DLP1 fonksiyonunu ve mitokondriyal fizyon / füzyon dengesini tam olarak nasıl etkilediği açık değildir [77].

c. Aβ'nın Alkol Dehidrogenaz Enzimi ile ilişkisi:

Aβ'nın mitokondrideki hedeflerinden biri de, mitokondriyal matriks proteini olan amyloid bağlayıcı alkol dehidrogenaz (ABAD) enzimidir [60, 67, 77]. Kısa zincirli dehidrojenaz / redüktaz ailesinin bir üyesi olan ABAD, n-izopropanol ve beta-estradiol dahil olmak üzere çeşitli alkol substratlarına karşı enzimatik aktivite gösterir. Bu nedenle, ABAD, asetil-CoA molekülünün TCA döngüsüne katılmasını teşvik ederek, özellikle stres koşullarında keton kullanımının kolaylaştırılmasını sağlayan, mitokondriyal fonksiyon için önemli bir proteindir. ABAD-Aβ kompleksi, ABAD'a NAD^+ bağlanmasını engelleyerek solunum enzimlerinin aktıvitelerinin azalmasına neden olur. Aβ'nın ABAD enzimine spesifik bağlanması özellikle stres koşulları altındaki hücrelerin enerji metabolizmasında hasara ve hücre ölümüne neden olur [77]. ABAD ile Aβ1-42 arasındaki bağlantının bloke edilmesinin nöronlarda Aβ1-42 kaynaklı apoptozu ve serbest radikal üretimini baskılayabildiği gösterilmiştir [60].

d. Aβ Siklofilin D ile Etkileşime girebilir:

Siklofilin D (CypD), mitokondriyal membranların geçiş gözeneklerinin açılmasını önleyen ve mitokondrinin yapı ve işlevini koruyan bir proteindir. Elektron ve konfokal mikroskopi teknikleri kullanılarak, Aβ'nın mitokondriyal matriks proteini olan CypD ile etkileşime girdiği gösterilmiştir [67]. Mitokondriyal Aβ'nın CypD ile etkileşime girmesi mitokondriyal geçiş gözeneklerinin yapısının bozulmasıyla, serbest radikal üretimini

arttıran, sinaptik hasara neden olan ve sonunda apoptozu tetikleyen bir dizi olaya yol açar. AH postmortem beyinlerinde, CypD geni susturulmuş farelerde, APP transgenik farelerde ve çift mutant farelerde (APP transgenik ve CypD genleri susturulan fareler), Aβ ve CypD arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Ayrıca Aβ ile CypD etkileşiminin azaltılması için, hücrede oluşturulan CypD eksikliğinin Aβ ile indüklenen mitokondriyal oksidatif stresi azalttığı, sinaptik fonksiyonu iyileştirdiği ve çift mutant farelerde bilişsel eksiklikleri hafiflettiği belirtilmiştir [67, 77].

2.5. Kromatin İmmunopresipitasyon(ChIP) – PCR Yöntemi

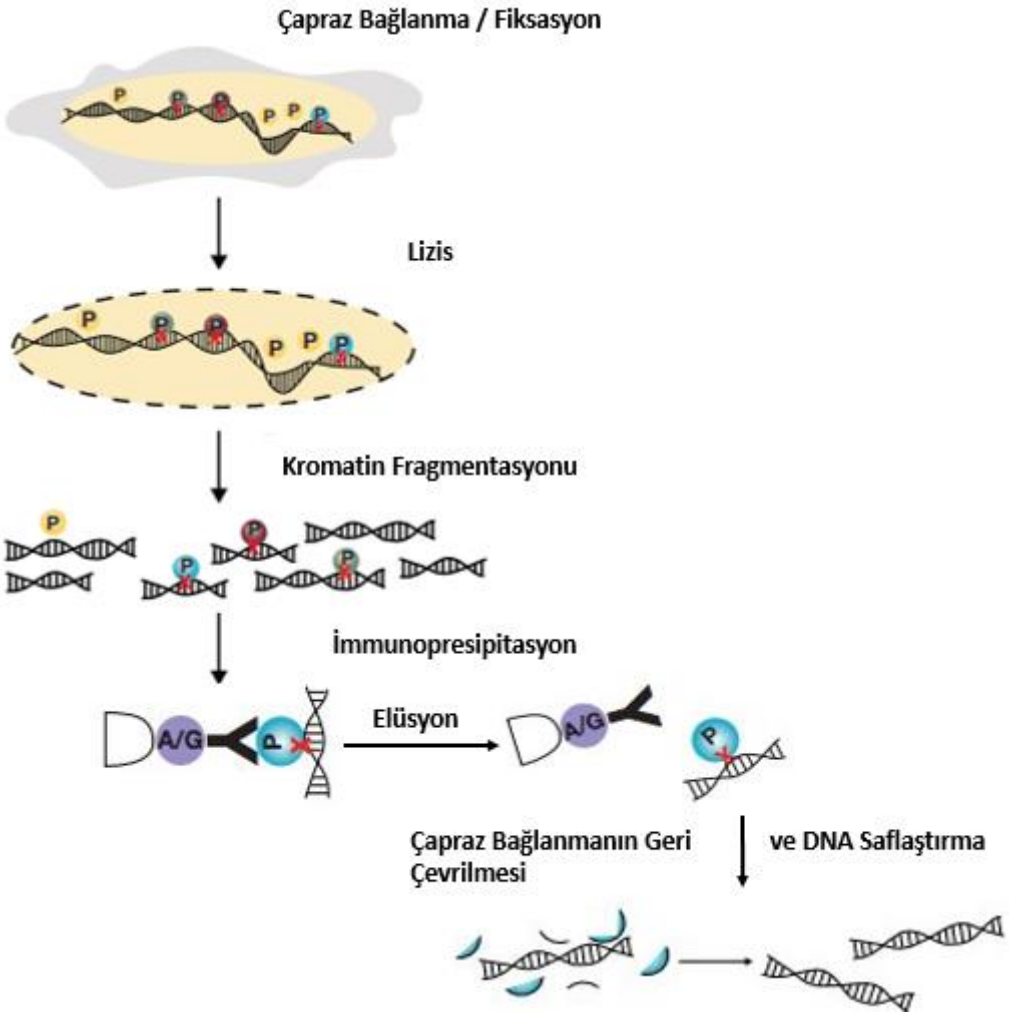
Kromatin immünopresipitasyonu (ChIP), bir protein ile DNA bölgesi arasındaki *in vivo* fiziksel etkileşimi/bağlantıyı araştırmak için kullanılan önemli bir tekniktir. ChIP esas olarak DNA'ya direkt ya da bir kompleks aracılığıyla bağlanan hedef proteinin, proteine spesifik bir antikor ile immünopresipitasyonunu ve sonuçta elde edilen DNA parçalarının analizini kapsamaktadır [78].

ChIP metodu,

- DNA-protein etkileşimlerinin genom üzerinde belirlenmesi,
- transkripsiyon faktörlerinin DNA üzerinde bağlanma bölgelerinin ve DNA bağlanma motiflerinin tespit edilmesi,
- gen ekspresyonunu düzenlenmesinde görev alan proteinlerin DNA ile fiziksel etkileşimlerinin belirlenmesi ve bu etkileşimlerin gen aktivasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması için kullanılan bir yöntemdir [78, 79].

ChIP deneyi sonucu elde edilen DNA parçalarının analizinde kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), dizi analizi ya da microarray tabanlı ChIP-on ChIP yöntemi kullanılabilmektedir[79].

ChIP-qPCR yöntemi, elde edilen DNA parçalarının qPCR yöntemi ile analiz edilmesi esasına dayanır. qPCR ile kombinlenen ChIP yönteminde analiz için, bir DNA bölgesin hedef olarak seçilmelidir. ChIP deneyi sonucunda elde edilen DNA parçaları hedef bölgeye spesifik primerler kullanarak tespit edilmeye çalışılır.



.

Şekil 2-6 ChIP yönteminin aşamaları gösterilmektedir [80].

ChIP yöntemi genel olarak aşağıdaki adımları içermektedir:

- **Fiksasyon:** DNA'ya bağlandığı düşünülen hedef proteinin DNA bağlanmasının korunmasını sağlamak ya da bağlanma affinitesi düşük bir proteinse bağlanmayı güçlendirmek için hücreler formaldehit ile muamele edilerek, proteinlerin DNA'ya çapraz bağlanması sağlanır. Bu çapraz bağlanma aynı zamanda ChIP'in ilerleyen aşamalarında da DNA-protein etkileşimlerinin korunmasını sağlamaktadır.
- **Lizis:** Presipitasyon deneylerinde hücre membranının parçalandığı ve sitozolün uzaklaştırıldığı aşamadır. Kullanılacak fragmentasyon tekniğine bağlı olarak lizis aşaması fragmentasyon öncesi ya da sonrası yapılabilir.
- **Fragmentasyo**n: DNA'nın ve ona bağlı proteinin, antikor ile presipitasyonu için daha kısa DNA parçalarına gereksinim vardır. Fragmentasyon aşaması kromatin

halinde paketlenen DNA zincirlerinin 150-250 bç'lik parçalara bölünmesini sağlar. Fragmentasyon işlemi fiziksel olarak sonikasyon aracılığıyla ya da enzimatik yöntem (microkokal nükleaz) ile gerçekleştirilebilir.

- **İmmunpresipitasyon:** DNA/protein komplekslerinin proteine özgü primer antikor ile etiketlenmesi sağlanır. Hedef proteine özgü antikorun dışında ChIP deneylerinde hedefi olmayan normal IgG antikoru negatif kontrol olarak ve hedefi bilinen bir genel transkripsiyon faktörüne özgül antikor (örn; RNA Polimeraz III) pozitif kontrol olarak kullanılmalıdır.

Ardından DNA-protein-antikor kompleksine A/G agaroz, sefaroz ya da manyetik boncuklar eklenerek presipitasyon gerçekleştirilir. Immunpresipitasyonun ardından bağlanmayan DNA fragmentlerinin ve antikorların uzaklaştırılması aşaması önemli bir yer tutmaktadır. Farklı tuz konsantrasyonları ve içeriklerine sahip birçok tampon çözelti ile DNA-protein-antikor-boncuk kompleksi yıkanmalıdır.

- **Elüsyon:** Elüsyon aşaması DNA-protein çapraz bağlanmasının tersine çevrilme reaksiyonu ile başlar. Bu adımda DNA, kendisine bağlı olan moleküllerden (boncuk, antikor, protein) özgürleşir. Böylece kompleksten ayrılan proteinler proteinaz enzimi ile parçalanır. Ayrıca RNA kontaminasyonun engellenmesi amacıyla RNaz ile muamele gerçekleştirilir.
- **DNA saflaştırılması**: Kompleksten ayrılan DNA parçalarının saflaştırılması fenol kloroform izoamil alkol yöntemi ardından yüksek tuz konsantrasyonu ile presipite edilerek gerçekleştirilir.
- **qPCR:** Elde edilen DNA parçaları, spesifik primerle PCR yapılarak agaroz jel elektorforezinde görüntülenebilir ya da SYBR green/probe temelli qPCR reaksiyonu ile analiz edilir.

2.6. SH-SY5Y Hücre Hattı

İnsan nöroblastoma hücreleri, SH-SY5Y, nörotoksisite, oksidatif stres ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır [81]. Orijinal olarak 1970 yılında 4 yaşındaki bir kıza ait metastatik nöroblastomun kemik iliği biyopsisinden kültüre edilip çoğaltılan SH-SY5Y hücreleri, ana SK-N-SH soyunun bir alt soyudur. Biedler'in grubu tarafından yapılan ilk çalışmalar, farklılaşmış SK-NSH hücrelerinin, morfolojik olarak farklı iki fenotip içerdiğini göstermiştir: nöroblast benzeri hücreler ve epiteliyal hücreler [82]. Nöroblast benzeri

morfolojiye sahip hücreler, katekolaminerjik nöronların tirozin hidroksilaz (TH) ve dopamin-β-hidroksilaz karakteristikleri için pozitif özellik gösterirken, epiteliyal benzer hücreleri bu enzimatik aktivitelere sahip değildir [82]. Ayrıca SH-SY5Y hücreleri, nöronal belirteçlerle karakterize edilen daha olgun bir nöron benzeri fenotipe farklılaştırılabilirler.

SH-SY5Y hücre hattının ilk karakterizasyonu, dopamin-y-hidroksilaz aktivitesini ve düşük oranda kolin asetil-transferaz, asetilkolinesteraz ve butiril kolinesteraz, bazal noradrenalin (NA) salımı ve tirozin hidroksilaz aktivitesini göstermiştir. Tirozin hidroksilaz, katekolamin sentez yolunun hız sınırlayıcı enzimidir ve tirozini, dopamin β hidroksilaz ile NA'ya dönüştürülen dopaminin öncüsü olan L-dopa'ya dönüştürür. Bu nedenle, SH-SY5Y hücre hattı, hem dopamin hem de NA sentezleyecek potansiyele sahip olduğundan bir katekolaminerjik fenotip gösterebilir. Farklılaşma indükleyici ajanlarla yapılan uygulamanın ardından, SH-SY5Y hücreleri, morfolojik olarak daha uzun, benzer işlevlere sahip birincil nöronlara benzer hale gelir [83]. Nöronal farklılaşma, nevritik süreçlerin oluşumu ve uzaması, plazma zarının uyarılabilirliği, sinaptofisin-pozitif fonksiyonel sinapsların oluşumu ve nörona özgü enzimlerin, proteinlerin üretilmesi, nörotransmitterlerin salınması gibi bir dizi spesifik olayı gerektirir. Araştırmacıların SH-SY5Y nöroblastom hücrelerini kültür ortamının manipülasyonu yoluyla daha olgun, nöron benzeri bir fenotipe sahip hücrelere dönüştürme yeteneği, sinirbilim araştırmaları alanında çok sayıda fayda sağlamıştır. Avantajlar arasında, farklılaşma öncesi büyük ölçekli çoğalma kapasitesi, birincil nöronlara kıyasla göreceli kolaylık ve düşük maliyet bulunmaktadır. Ek olarak, SH-SY5Y hücreleri insandan türetilmiş olduklarından, kemirgen birincil kültürlerinde doğal olarak bulunmayacak olan bir dizi insana özgü protein ve protein izoformu eksprese ederler[84].

Farklılaşmamış SH-SY5Y hücreleri sürekli olarak çoğalır, olgunlaşmamış nöronal belirteçleri eksprese eder ve olgun nöronal belirteçlerden yoksundurlar ancak olgunlaşmamış katekolaminerjik nöronlara çok yakındırlar. Dolayısıyla hem farklılaşmamış hem de farklılaştırılmış SH-SY5Y hücreleri, nöronal benzeri hücreler gerektiren in vitro deneyler için kullanılmaktadır [84].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında, nükleer genomda DNA'ya bağlanma aracılığıyla gen ekspresyonuna etki edebildiği bilinen Aβ1-42'nin, mtDNA'ya bağlanarak mitokondrial gen ekspresyonunun düzenlenmesine katılma olasılığını araştırdık. Bu kapsamda, çalışmamızda Aβ1-42'in endojen, sublethal ve toksik seviyelerinin farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücrelerinde mtDNA'ya bağlanma potansiyeli incelenmiştir.

Bu amaçla ilk olarak uygulama yapılmamış ve farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücrelerinde endojen Aβ1-42'nin mitokondri ile kolakalizasyonu araştırılmıştır. Ardından Aβ1-42'nin mtDNA ile koloklize olup olmadığı çift immünfloresan yöntemi ve mtDNA işaretmeleme esasına dayanan BrdU (5-bromo-2′-deoxyuridine) tekniği ile incelenmiştir. BrdU ile mitokondriyal DNA işaretleme prensibi, bir timidin analoğu olan BrdU'nun DNA replikasyonu sırasında reaksiyona katılarak yeni sentezlenen zincire (Timin yerine) girmesini ve daha sonra BrdU'nun tespit edilmesi için anti-BrdU primer antikoruyla işaretlenmesini esas alan bir yöntemdir. BrdU'nun DNA zincirine katılımı yalnızca replikasyon sırasında gerçekleşeceğinden dolayı nükleer DNA replikasyonunda da yeni sentezlenen zincirde Timin bazının yerini alabilir. Ancak çalışmamızda amacımız sadece mtDNA'da işaretleme yapabilmek olduğundan, BrdU işaretlemesinden önce DNA polimeraz alfa inhibitörü olan aphidicolin uygulanmış, böylece nükleer DNA'nın replikasyonunun durdurulması sağlanmıştır

Aβ1-42'nin endojen, sublethal ve toksik seviyelerinin mtDNA'ya bir transkripsiyon faktörü (TF) olarak bağlanma potansiyeli, mitokondri izolasyonu ardından kromatin immunpresipitasyon (ChIP) deneylerini takiben D-loop bölgesine spesifik primerler kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR veya qPCR) ile incelenmiştir. Nükleer DNA kontaminasyonunu engellenmek üzere, ChIP deneyleri mitokondri izolasyonu yapıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir, böylece yapılan ChIP deneyi sonucu elde edilen DNA parçaları yalnızca mtDNA'yı içermektedir. ChIP deneylerinden 24 saat önce ilgili gruplar için kültür medyumuna 0,1 μM ve 5 μM Aβ1-42 uygulaması yapılmıştır. Tüm gruplarda Aβ1-42 veya TFAM antikoru ile ChIP gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan DNA parçaları qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. ChIP-qPCR sonuçlarının analizi; ChIP deney ve pozitif kontrol grubundan elde edilen sinyallerin negatif kontrole göre kat artışının hesaplanması yoluyla analiz edilmiştir. Çalışma kapsamındaki hücre kültürleri, Aβ1-42 uygulamaları, ChIP-qPCR deneyleri ile

analizleri, BrdU ve immünfloresan işaretlemeleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü Deneyleri

Çalışmamızda kullanılan insan SH-SY5Y hücrelerinin kültür deneyleri; Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda aşağıda anlatılan protokole göre gerçekleştirilmiştir.

İnsan nöroblastoma kökenli SH-SY5Y hücrelerinin (ATCC® CRL2266) ilk ekimi 100 mm çapındaki petrilere (Corning 3506) yapıldı.

Kültür deneyleri başlanmadan önce hücrelerin MEM+ F12+ kültür medyumu içeriği aşağıdaki tabloda verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3- 1 SH-SY5Y Hücre Kültür Medyum İçeriği gösterilmiştir.

MEM kültür medyumu (Gibco, 31095-029) ile F12 (Gibco, 21765-029) (1:1 oranında) kültür medyumu içerisine;
% 10 Fetal Sığır Serumu FBS (Gibco, 10270106)
%1 Sodyum piruvat(100mM) (Sigma,P2256-100G)
%1 MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco,11140050)
%1 Antibiotic-Antimycotic 100X (Gibco 15240-062) Yalnızca hücre ilk açıldığında eklenir.

Hazırlanan taze kültür medyumu 0,22µm'lik filtreden (JetBiofil, PE-204-250) geçirildi. Kullanıma kadar +4 $^{0}C^{'}$ de saklandı.

Hücrelerin medyumu 3-4 günde bir taze medyum ile değiştirildi.

Hücreler açıldığında %1 antibiyotik içeren kültür medyumu bulunan petrilere ekildi.

Daha sonra medyum değişiminde antibiyotik içermeyen kültür medyumu ile değişiklik yapıldı.

Her kullanımdan önce kültür medyumu önceden su banyosunda 37 ^{0}C'ye ısıtıldı.

3.1.1. Hücre Açılması ve Çoğaltılması

Sıvı azot tankında %5 DMSO (Sigma, D-8779) içeren kültür ortamında dondurulmuş hücreler, 2 dk 37 ^{0}C'de derece su banyosunda dikkatlice çözündürüldü.

Ardından su banyosundan alınan tüpün etrafı %70 izopropanol ile silinerek dezenfekte edildi ve Sınıf II biyolojik güvenlik kabinine alındı.

Hacmi 1 ml olan hücre süspansiyonu önceden hazırlanıp 37 ^{0}C'ye getirilen 9 ml'lik MEM+ F12 + kültür medyumu içerisinde çözündürüldü.

125 g X 6 dk santrifüj yapıldı.

Süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 ml taze MEM+, F12+ kültür medyumu ile hücreler yeniden çözündürüldü. Böylece hücreler dondurma medyumu içerisinde bulunan DMSO solüsyonundan arındırılmış oldu.

Önceden kültür medyumu eklenmiş ve 37^{0}C, %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edilmiş 100 mm'lik kültür petrisine hücre ekimi gerçekleştirildi.

Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında pasaj yapıldı.

İmmünfloresan deneylerinde kullanılacak hücreler 11mm'lik yuvarlak lamel içeren 24 kuyulu petrilere, ChIP deneylerinde kullanılacak hücreler ise yeniden 100 mm'lik petrilere pasajlanmıştır.

3.1.2. Lamel Yerleştirilen Petrilerin PLO (Poly L Ornithin) Solüsyonu ile Kaplanması

BrdU ve immünfloresan işaretlemelerin gerçekleştirileceği hücreler PLO kaplı 11mm'lik yuvarlak lameller üzerine ekildi. PLO (Sigma, P4957) solüsyonu MilliQ dH_2O içerisinde 1:50 oranında karıştırıldı.

Hazırlanan kaplama solüsyonu 0,22 µm filtrelerden geçirildi.

24 kuyuluk petrinin (Corning, 3526) kuyularına otoklavlanmış steril yuvarlak lameller (11 mm) yerleştirildi.

Hazırlanan PLO solüsyonundan alınarak lamel yerleştirilmiş kuyulara konuldu.

PLO kaplaması için petriler 2 saat 37^0C, %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası 3 kez MilliQ dH_2O ile yıkama yapıldı ve yıkamalar sonunda petrinin her bir kuyusuna daha önce hazırlanan taze kültür medyumu son hacim 500 µl olacak şekilde koyuldu.

Petriler hücre ekimi gerçekleştirilene kadar 37^0C, %5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.1.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Pasajlanması

Pasaja başlanmadan önce 24 kuyulu petrilerin PLO kaplaması yapıldı ve 100 mm'lik petrilere taze kültür medyumu eklenerek 37^0C, %5 CO_2 içeren inkubatore kaldırıldı. (ChIP deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan hücreler).

100 mm'lik petride çoğaltılan hücrelerden kültür medyumu çekildi.

Hücreler bir kez %0,25 (v/v)'lik Tripsin EDTA (Gibco, 25200-056) solüsyonu ile yıkandı.

Ardından petriye %0,25 (v/v)'lik Tripsin EDTA solüsyonu konularak 5 dk, 37^0C, %5CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi.

Hücrelerin durumu mikroskopta kontrol edildi.

Hücrelerin petri tabanından ayrıldığı gözlemlendikten sonra, tripsin-EDTA solüsyonu ile eşit hacimde (1:1 oranında) taze kültür medyumu eklenerek tripsin nötralizasyonu sağlandı.

Hücreler 15 ml'lik bir tüpe toplandı.

Hücreler 125 g, 6 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler önceden 37 ^{0}C'ye ısıtılmış taze kültür medyumu ile sulandırılıp pipetaj ile homojen hale getirildi.

Hemasitometre ile hücre sayımı yapıldı.

100 mm'lik kültür petrilerine %30, 24 kuyulu kültür petrisine %10 yoğunlukta hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

3.1.4. Hemasitometri ile Hücre Sayımı

Taze kültür medyumunda çözündürülüp homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak 0,2 ml'lik tüpe kondu.

Tripan mavisi boyasından (GibcoBRL, 15250061. Invitrogen Inc., New York, USA) 10 µl alındı ve hücrelerle aynı 0,2 ml'lik tüpte karıştırıldı.

Tripan mavisi ve hücre süspansiyonundan oluşan karışımdan 10'ar µl alınarak hemasitometrinin her iki bölmesine ayrı ayrı yüklendi.

Hücrelerin ters mikroskopta (Leica DMIL, Leica Microsystems Ltd.,Heerbrugg, GE) sayımı yapıldı.

Hücre sayımı iki kez farklı araştırıcılar tarafından tekrar edildi.

Toplam hücre sayısı aşağıda formül ile hesaplandı.

Hücre Sayısı = Her iki bölmede sayılan hücre sayısı/2 x 2 x Hücrelerin Çözündürüldüğü Medyum Hacmi $x10^4$

3.2. Herhangi Bir Uygulama Yapılmamış SH-SY5Y Hücrelerinde, Aβ1-42'ninMitokondriyal Lokalizasyonunun İmmunfloresan İşaretleme Yöntemiyle Gösterilmesi

Aβ1-42-mtDNA etkileşimlerini sorgulamadan önce hiçbir uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücrelerinde Aβ1-42'nin mitokondride lokalize olup olmadığını araştırdık. Bu amaçla mitokondri ve Aβ1-42'nin immünfloresan tekniklerle işaretlemesini gerçekleştirdik. Mitokondri işaretlemesi için mitokondri boyası olan MitoTracker™ Red CMX Ros (Invitrogen, M7512) boyası kullanılmıştır.

Mitotracker, mitokondriyal membran potansiyelini kullanarak canlı hücreler içindeki mitokondrileri etiketleyen, ticari olarak temin edilebilen bir floresan boyadır. Mitotracker, mitokondrideki tiyol gruplarına kimyasal olarak reaktiftir ve mitokondri, negatif membran potansiyelini koruduğu sürece boyama gerçekleşmektedir. Mitotracker, mitokondriye kalıcı olarak bağlanma sağlar. Ayrıca, çoklu işaretlemelerin mitokondriyal fonksiyonu azalttığı deneylerde de iyi sonuç vermesi bakımından tercih edilmektedir. Mitotracker boyasının çoklu işaretlemelerde kullanabilme özelliğinden çalışmamız için

de yararlanılmıştır. Mitotracker ile işaretlenen canlı hücreler, fiksasyonu takiben anti-Aβ1-42 antikoru ile işaretlenmiştir ve Aβ1-42 lokalizasyonu aşağıdaki protokole göre takip edilmiştir.

Fenol kırmızısı içermeyen HBSS 10X (Gibco,14065-049) alınarak 37°C'de ısıtıldı.

Isıtılan HBSS içerisine; stok MitoTracker (ThermoFisher, M7512) boyası 1:1000 olacak şekilde eklenip karıştırıldı. Böylece mitokondri işaretleme solüsyonu hazırlandı.

Hücrelerden kültür medyumu uzaklaştırıldı ve HBSS içerisinde hazırlanan MitoTracker solüsyonu kuyulara eklendi.

Hücreler MitoTracker solüsyonu ile 20 dk boyunca, 37 °C'de % 5 $C0_2$ içeren inkübatörde inkübe edildi.

3 kez 5'er dk önceden 37 °C'de ısıtılmış PBS ile yıkama yapıldı.

Ardından hücreler % 3,7 paraformaldehit (pH.7,4) (Sigma, 15812-7) solüsyonu ile 15 dk oda sıcaklığında fikse edildi.

3 kez 7'şer dk PBS ile yıkama yapıldı.

Yıkamaların ardından her kuyuya % 30 keçi serumu ve % 0.02 Triton X-100 (Sigma, X-100) içeren PBS (T-PBS) ile hazırlanan bloklama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı.

Hücrelere; % 1,5 keçi serumu ve % 0,02'lik T-PBS içerisinde 1:100 oranında sulandırılan anti Aβ1-42 primer antikoru (Abcam,ab10148) eklendi.

Hücreler primer antikor solüsyonu ile +4 C^0'de karıştırıcı üzerinde gece boyu inkübe edildi.

Primer antikor solüsyonu kuyulardan çekilerek 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı.

Ardından hücreler %1,5 keçi serumu ve %0,02'lik TPBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan keçi anti tavşan Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, A11034) etiketli sekonder antikoruyla 1 saat oda sıcaklığında, karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda hücreler 3 kez 5'er dk oda sıcaklığında PBS ile yıkandı.

İlk yıkamanın sonunda, dH_2O ile 1:15000 oranında sulandırılmış DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (SantaCruz, sc-3598) kuyulara eklenerek 15 sn oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından kuyulardan uzaklaştırıldı. Böylece nukleusun işaretlenmesi amaçlandı. 2 kez daha 5 dk PBS ile yıkama yapıldı.

Görüntüleme için yuvarlak lameller Prolong Diamond kapama medyumu (ThermoFisher, P36970) damlatılan lamın üzerine kapatıldı.

Biotek Lionheart FX görüntüleme cihazinda ve konfokal mikroskobu (Leica TCS SPE Confocal System) ile görüntüleme yapıldı.

3.3. BrdU (5-bromo-2′-deoxyuridine)-mtDNA ve mtDNA-Aβ1-42 İmmünfloresan İşaretlemesi

Aβ1-42'nin mtDNA'ya fiziksel olarak bağlanma durumu, protein-DNA etkileşimini immünfloresan temellere dayanarak inceleyen BrdU tekniği ile araştırılmıştır. BrdU kimyasalı bir Timin analoğudur. DNA replikasyonu sırasında Timin bazı yerine geçer. Ardından BrdU'nun özgül primer antikoru ve sekonder antikoru ile işaretlenmesi mtDNA'yı görünür kılar. DNA-BrdU işaretlemesi ardından başka hedef bir proteinin de çift immünfloresan yöntemi ile işaretlenmesi, protein-DNA kolokalizasyonunun araştırılmasına olanak sağlar. Çalışmamızda mtDNA'yı hedeflediğimiz için nükleer DNA replikasyonunun durdurulması amacıyla hücrelere önce DNA polimeraz alfa inhibitörü aphidicolin uygulanmıştır, ardından hüreler BrdU ile muamele edilmiştir.



Şekil 3-1 BrdU - mtDNA işaretlemesi ardından Aβ1-42'nin immünfloresan işaretlemesi akış şeması verilmiştir.

3.3.1. SH-SY5Y Hücrelerine Aphidicolin ve BrdU Uygulamaları

Lameller üzerinde çoğaltılan yaklaşık %30-%40 yoğunluğa ulaşan hücrelere aşağıdaki uygulamalar yapıldı. Nükleer DNA replikasyonunun inhibe edilmesi için kullanılan aphidicolin (Sigma, A0781) DMSO ile çözündürülerek 30mM stok çözelti hazırlandı.

Hücrelerin medyum değişimi içerisinde 20 µM aphidicolin olacak şekilde hazırlanan taze kültür medyumu ile yapıldı.

Hücreler aphidicolin içeren kültür medyumu ile 1 saat , % 5 CO_2 içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi.

1 saat sonunda DMSO ile çözdürülerek hazırlanan, stok çözeltisi 1 mM olan BrdU (Sigma, B23151) solüsyonundan, son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde hücrelerin kültür medyumuna uygulandı.

Aphidicolin, BrdU işaretlemesi boyunca kültür ortamında bulundu. Hücreler BrdU işaretleme solüsyonu ile 72 saat boyunca, % 5 CO_2 içeren inkübatörde 37 °C 'de inkübe edildi.

Lameller üzerindeki hücreler 72 saat boyunca inkübasyonun sonunda %3,7 paraformaldehit solüsyonu (pH:7,4) (Sigma 15,812-7) ile 15 dk oda sıcaklığında fikse edildi. (Mitotracker-BrdU boyaması yapılan kontrol gruplarında fiksasyondan önce mitotracker boyası uygulanmış 30 dk inkübasyondan sonra fikse edilmiştir.)

Hücreler 3 kez PBS ile yıkandı ardından %0,1'lik T-PBS ile 20 dk oda sıcaklığında permeabilize edildi.

Permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırıldı.

Permeabilize edilen hücrelerde DNA denatürasyonu ve BrdU epitopunun açığa çıkarılması amacıyla asit yıkamaları yapıldı.

Hücreler ilk olarak buz üzerinde 1N HCl çözeltisi ile 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonİnkübasyon sonunda solüsyon uzaklaştırıldı.

Ardından 2N HCl çözeltisi her kuyuya eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonİnkübasyon sonunda solüsyon uzaklaştırıldı.

Nötralizasyon amacıyla fosfat/sitrik asit tamponu her kuyuya eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyonyapıldı.

Fosfat sitrik asit tamponu uzaklaştırılan hücrelere 3 kez 2'şer dk olmak üzere %0,1 TPBS ile yıkama yapıldı.

Yıkamaların ardından %5 keçi serumu (Gibco, 16210064) içeren %0,1'lik TPBS solüsyonunda 1:100 oranında hazırlanan anti BrdU primer antikoru (ThermoFisher, B35128) uygulanarak oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde gece boyu inkübe edildi.

İnkubasyon sonrası hücreler %0,1 TPBS ile 3 kez 2'şer dk bekletilerek yıkandı.

Yıkamaların sonunda %5 keçi serumu içeren %0,1'lik TPBS ile 1:200 oranında olacak şekilde sulandırılan keçi anti fare Alexa Fluor 488 etiketli sekonder antikoru (ThermoFisher, A11001) eklendi. Hazırlanan işaretleme solüsyonu herbir kuyuya eklenerek 1 saat oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde, karanlıkta inkübe edildi.

3.3.2. BrdU ile etiketlenen hücrelerde Aβ1-42'nin İmmünfloresan Yöntemiyle İşaretlemesi:

1 saat inkübasyon sonrası kuyular 3 kez 5'er dk PBS ile yıkandı.

Yıkamaların ardından her kuyuya % 10 keçi serumu ve % 0.02 TPBS ile hazırlanan bloklama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.

3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı.

Hücrelere; % 1,5 keçi serumu ve % 0,02'lik TPBS içerisinde 1:100 oranında sulandırılan anti Aβ1-42 primer antikoru (Abcam, ab10148) eklendi.

Hücreler primer antikor solüsyonu ile $+4C^0$'de karıştırıcı üzerinde gece boyu inkübe edildi.

Primer antikor solüsyonu kuyulardan çekilerek 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı.

Ardından hücreler %1,5 keçi serumu ve %0,02'lik TPBS içerisinde 1:200 oranında keçi anti tavşan Alexa Fluor 568 (Abcam, ab175471) etiketli sekonder antikoruyla karanlıkta, 1 saat oda sıcaklığında, karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda hücreler 3 kez 5'er dk oda sıcaklığında PBS ile yıkandı.

Ilk yıkamanın sonunda sonra dH_2O ile 1:15000 oranında sulandırılmış DAPI (SantaCruz, sc-3598) kuyulara eklenerek 15 sn oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından kuyulardan uzaklaştırıldı. Böylece nukleusun işaretlenmesi amaçlandı. 2 kez daha 5 dk PBS ile yıkama yapıldı.

Görüntüleme için lameller Prolong Diamond kapama medyumu (ThermoFisher, P36970) damlatılan lamın üzerine kapatıldı**.**

Biotek Lionheart FX görüntüleme cihazinda ve konfokal mikroskobu (Leica TCS SPE Confocal System) ile görüntüleme yapıldı.

3.3.2.1. Mitokondri Boyaması ve BrdU işaretlemesi

BrdU işaretlemesinin mitokondrial DNA'da gerçekleştiriğini teyit etmek amacıyla kontrol gruplarında MitoTracker™ Red CMX Ros boyası (Invitrogen, M7512) ile mitokondri işaretlemesi yapılmıştır. Mitokondri ile BrdU kolakolizasyonun belirlenmesi için BrdU kimyasalı uygulanan hücrelerde mitokondri boyaması ardından BrdU'nın immünfloresan işaretlemesi yapılmıştır.

Fenol kırmızısı çermeyen HBSS 10X (Gibco, 14065-049) alınarak 37°C'de ısıtıldı.

Isıtılan HBSS içerisine; 200 µM stok MitoTracker (ThermoFisher, M7512) boyasından 1:1000 olacak şekilde eklenip karıştırıldı. Böylece mitokondri işaretleme solüsyonu hazırlandı.

Hücrelerden BrdU ve aphidicolin içeren kültür medyumu inkübasyon sonunda uzaklaştırıldı ve HBSS içerisinde hazırlanan MitoTracker solüsyonu kuyulara eklendi.

Hücreler MitoTracker solüsyonu ile 20 dk % 5 $C0_2$, 37 °C'de inkübe edildi.

3 kez 5'er dk önceden 37 °C'de ısıtılmış PBS ile yıkama yapıldı.

Hücreler % 3,7 paraformaldehit (pH.7,4) ile 15 dk oda sıcaklığında fikse edildi. Ardından 3 kez 7'şer dk PBS ile yıkama yapıldı.

Daha sonra yukarıda anlatılan BrdU'nun işaretlenmesi için gerekli basamaklar permeabilizasyon ve asit yıkamaları gerçekleştirildi.

Hücreler %5 keçi serumu ve % 0,1 T-PBS içerisinde hazırlanan anti BrdU primer antikoru ile gece boyu +4 °C'de inkübe edildi.

PBS ile 3 kez 5'er dk yıkamalar yapıldı.

Hücreler, %5 keçi serumu ile % 0,1 T-PBS içinde 1:200 oranında sulandırılan keçi anti tavşan Alexa Fluor 488 işaretli sekonder antikor (ThermoFisher, A11034) solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Lameller Prolong Diamond (ThermoFisher, P36970) kapatma medyumu ile lam üzerine kapatıldı.

Biotek Lionheart FX görüntüleme cihazinda görüntüleme yapıldı.

Tablo 3- 2 BrdU işaretlemesinde kullanılan Fosfat/Sitrik asit çözeltisi içeriği gösterilmiştir.

0,2 M Na_2HPO_4
0,1 M Sitrik Asit

*% =v/v

3.4. SH-SY5Y Hücrelerine Amyloid Beta 1-42 Peptid Uygulaması

- SH-SY5Y hücrelerine yalnızca ChIP deneylerinde kullanılacak gruplarda Aβ1-42 uygulaması yapılmıştır. Uygulama ChIP deneyinden 24 saat önce gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Amiloid Beta 1-42 peptidinin hazırlanışı

- Liyofilize olarak temin edilen 1 mg Aβ1-42 peptidi (Millipore AG912. Millipore Corp. California, USA) 220 µM stok olacak şekilde steril PBS ile dikkatlice çözündü.

- 37 °C'de, 1000 rpm'de ısıtıcılı karıştırıcıda gece boyunca inkübe edildi.
- Ertesi gün hazırlanan 220 µM stok Aβ1-42 peptidi -20'°C'ye kaldırıldı. Uygulamaya kadar burada saklandı.

3.4.2. SH-SY5Y Hücrelerine Aβ1-42 Peptid Uygulaması ve Hücre Kültürü Grupları

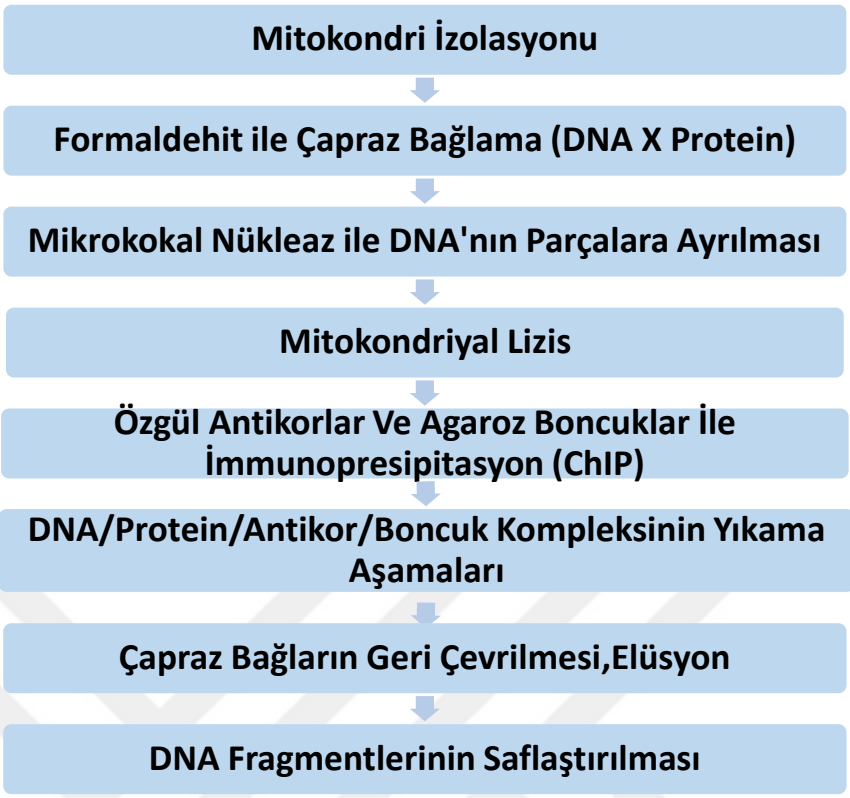
- **5 µM Aβ1-42 Uygulanan Grup:** Kültür medyumu taze medyum ile değiştirilmiş petrilere 5 µM uygulama yapıldı. 24 saat sonra ChIP deneyi gerçekleştirildi.
- **0,1 µM Aβ1-42 Uygulanan Grup:** Kültür medyumu taze medyum ile değiştirilmiş petrilere 0,1 µM uygulama yapıldı. 24 saat sonra ChIP deneyi gerçekleştirildi.

Aβ1-42 peptidi uygulanan gruplarda peptidin petri geneline yayılması amacıyla medyum içerisine farklı noktalardan pipet ile bırakıldı.

- **Kontrol Grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmamış hücre grubudur. 24 saat sonra ChIP deneyi gerçekleştirildi.

3.5. Mitokondiral Kromatin İmmunpresipitasyon(ChIP)

Kromatin immunpresipitasyon yönteminde aşağıdaki akış şeması izlenmiştir (Şekil 3-2):



Şekil 3-2 Mitokondriyal Kromatin İmmunopresipitasyon Akış Şeması

100 mm'lik petriler üzerinde çoğaltılmış hücrelerden kültür medyumu uzaklaştırıldı. Hücreler PBS içerisinde kazıyıcı yardımıyla kaldırıldı. Her biri ayrı ayrı 15 ml'lik tüplere toplandı.

Pipetaj yapılarak hücrelerin homojen dağılması sağlandı.

Tüplerden yaklaşık $2x10^7$ hücre olacak şekilde alınarak ayrı 15 ml'lik tüplere toplandı.

3.5.1. Mitokondri İzolasyonu Aşaması

Mitokondri izolasyonu Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (ThermoFisher , 89874) kiti ile üreticinin talimatlarına göre gerçekleştrilmiştir.

Başlamadan Önce: A ve C solüsyonlarına EDTA içermeyen proteaz-fosfataz inhibitor kokteyli (Halt Protease-Phosphotase Inhibitor Coctail, ThermoFisher, 78443) eklendi.

15 ml'lik tüplere toplanan hücreler 850 g x 2 dk santrifüj edildi.

Üst sıvı atıldı. Üzerine A solüsyonu eklendi. Orta hızda vorteks yapıldı ve buz üzerinde 2 dk inkübe edildi.

Solüsyon B eklendi. 5 sn orta hızda vorteks yapıldı.

5 dk buz üzerinde inkübe edildi her dakikada bir maksimum hızda vorteks yapıldı.

Solüsyon C eklendi. Bu adımda örnekler 2 ml'lik tüplere aktarıldı. Tüpler birkaç kez alt üst edilierek karıştırıldı. Bu adımda vorteks yapılmadı.

700g, 10 dk +4 ^{0}C de santrifüj yapıldı.

Süpernatant yeni bir 2 ml'lik tüplere aktarıldı. 12000 g, 15 dk, +4 ^{0}C'de santrifüj yapıldı.

Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı (sitozol fraksiyonu).

Bu aşamada pellet izole mitokondrileri içermektedir.

Pelletin üzerine önceden proteaz-fosfataz inhibitörü eklenmiş C solüsyonundan eklendi.

12.000 g, 5 dk santrifüj yapıldı. **Süpernatant atıldı.**

İzole edilen mitokondriyal pellette çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirildi.

Pelletin üzerine 1:1 %1 formaldehit (%=v/v) (Sigma, 4768) konuldu, 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

0,125 M glisin solüsyonu çapraz bağlanma reaksiyonunun durdurulması amacıyla eklendi. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

12.000 g X 2 dk RT'de santrifüj edildi.

Üst sıvı atıldı. 2 kez PBS ile 1'er dk oda sıcaklığındaa bekletilerek yıkama yapıldı. Yıkamalar arasında 12.000 g 2 dk oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.

Üst sıvı atıldı pellet ile devam edildi.

3.5.2. Mikrokokal Nükleaz Enzimi ile mtDNA'nın Parçalara Ayrılması:

mtDNA'nın parçalara ayrılması aşaması Pierce Chromatin ChIP Prep Module (ThermoFisher, 26158) ticari kiti ile üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir.

Başlamadan Önce: 100 µl 1X MNase Digestion Buffer Working solüsyonun hazırlanması için 0,1 µl DTT eklendi.

Belirtilen oranda DTT eklenmiş MNase Digestion Buffer Working solüsyonu içerisine 10U/ µl Mikrokokal nükleaz enzimi eklenerek karışım hazırlandı. Her bir tüpe hazırlanan karışımdan konuldu.

En yüksek hızda 10 sn vorteks yapıldı.

37 ^{0}C'de ısıtıcı blok üzerinde 15 dk inkübe edidi. Tüpler her 5 dk'da bir 10 kez alt üst edilerek karıştırıldı.

MNase Stop solüsyonu reaksiyonun sonlandırılması için eklendi. Örnekler orta hızda vorteks ve 5 dk buz üzerinde inkübe edildi.

12.000 x g 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

3.5.3. Mitokondriyal Lisiz:

Başlamadan Önce: TBS (Tris Buffer Saline) (ThermoFisher, 28379) içinde hazırlanmış % 2 CHAPS çözeltisi içerisine EDTA içermeyen Halt Protease-Phosphotase Inhibitor Coctail (ThermoFisher, 78443) 1X olacak şekilde eklendi.

Pelletlere % 2 CHAPS solüsyonu eklendi.

Örnekler yüksek hızda 1 dk vortekslendi.

18000 rpm, 2 dk santrifüj edildi.

Süpernatant (mitokondriyal lizatı içerir) yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.

Ön temizleme (Preclear) Aşaması:

***Başlamadan Önce:** ChIP dilusyon tamponu içerisine çalışma konsantrasyonu 1X olacak şekilde EDTA içermeyen proteaz-fosfataz inhibitor kokteyli (ThermoFisher, 78443) eklendi.

Her tüpe yeterli miktardaChIP dilüsyon tamponu konuldu.

Ardından uygun miktarda ChIP Grade A/G Agaroz Boncuklar (ThermoFisher, 26159) kesik uç ile eklendi. Örnekler, 1 saat +4 ^{0}C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi

13.000 rpm 10 dk +4'de santrifüj yapıldı.

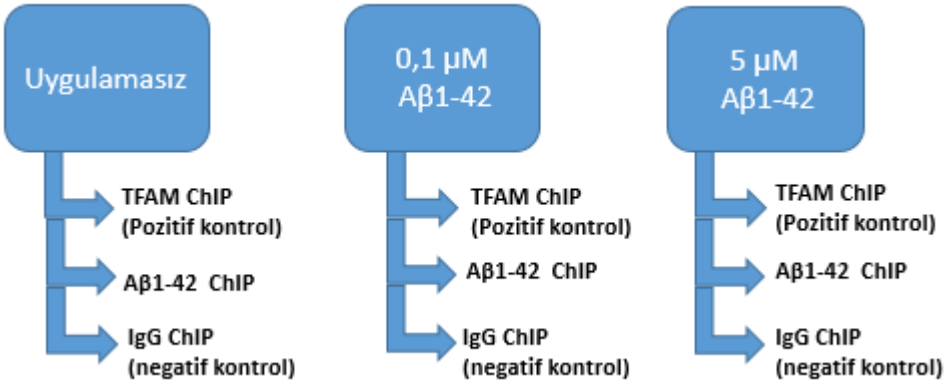
Tüplerden totral hacmin %10'u olacak şekilde input örneği alındı. Çapraz bağların geri çevrilmesi aşamasına kadar -20 ^{0}C'de saklandı.

Süpernatantlar üçe bölünerek 3 ayrı tüpe aktarıldı.

Süpernatantlara; anti Aβ1-42 primer antikoru (Abcam, ab10148), pozitif kontrol olarak anti TFAM (ThermoFisher, PA5-27865) primer antikoru ve negatif kontrol olarak normal tavşan IgG (ThermoFisher, 026102) eklendi.

Örnekler gece boyu +4 ^{0}C 'de shaker üzerinde inkübe edildi.

NOT: ChIP deneylerinde mtDNA'ya spesifik dizi bağlanma ve spesifik olmayarak da bağlanabildiğini bilinen TFAM antikoru ile presipitasyon pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte Aβ1-42 uygulamasının yapıldığı gruplarda TFAM'ın mtDNA bağlanma affinitesinin değişip değişmediğini araştırdığımız için deney grubu olma özelliğindedir. ChIP deneylerinin özgüllüğünü belirlemek için negatif kontrol olarak normal tavşan IgG ve antikor içermeyen yalnızca agaroz boncuk bulunan negatif kontrol grupları ile presipitasyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-3 ChIP deneylerindeki deney gruplarının şematik gösterimi.

3.5.4. Agaroz Boncuklar ile Presipitasyon Aşaması:

Geceboyu inkübasyonun ardından agaroz boncuklardan 20-50 µl eklendi.

4 saat +4 ^{0}C de shaker üzerinde inkübe edildi.

13000 rpm 5 dk santrifüj +4 ^{0}C de yapıldı. Süpernatant atıldı.

Pelletler sırasıyla aşağıdaki tamponlarla yıkandı:

Düşük Tuz Konsantrasyonlu YıkamaTamponu

Yüksek Tuz Konsantrasyonlu YıkamaTamponu

LiCl Tamponu

Örnekler yanda verilen sırayla herbir tampon ile 2'şer kez yıkandı.

Birinci yıkamalarda +4 ^{0}C'de çalkalayıcı üzerinde 5 dk inkübasyon yapıldı.

İkinci yıkamalarda +4 ^{0}C'de çalkalayıcı üzerinde 5 dk inkübasyon yapıldı.

Örnekler her yıkamadan sonra 3000 rpm 2 dk +4 ^{0}C'de santrifüj edildi. Üst sıvılar atıldı.

TE tamponu ile yıkamalar 2 kez ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Yıkamaların sonunda 3000 rpm 2 dk oda sıcaklığındaa santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı. DNA/protein/antikor/boncuk kompleksine elüsyon tamponu (ET) eklendi. 15 dk oda sıcaklığındarotasyonda inkübe edildi.

13.000 rpm 4 dk oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.

Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Pelletin üzerine yeniden aynı hacimde ET eklenerek 15 dk rotasyonda oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar 13.000 rpm 4 dk RT 'de santrifüj yapıldı. Süpernatant alınarak diğer süpernatant ile birleştirildi.

Input örneklerinin toplamhacmi eşit olacak şekilde ET ile tamamlandı.

Çapraz bağlanmanın geri çevrilmesi için örneklere 5 M stok NaCl çözeltisinden 0,2 M olacak şekilde NaCl eklendi.

65 ^{0}C de blok ısıtıcı üzerinde gece boyu inkübasyon yapıldı.

3.5.5. ChIP Yönteminde Kullanılan Tamponların Hazırlanışı

Hazırlanan tamponlar deterjan bazlı maddelerin eklenmesinden önce 0,2 µm'lik filtreden geçirilmiştir.

Tablo 3- 3 Düşük Tuz konsantrasyonlu yıkama tamponu içeriği

% 0.1 SDS* (Sigma L-4509. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE)
% 1 Triton X-100* (Sigma X-100. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE)
2mM EDTA (Santa Cruz, sc-286969)

20mM Tris-Cl pH: 8.1 (Sigma T-6066. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE)
150 mM NaCl (Sigma S-3014. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE)
100 ml dH_2O ile tamamlandı.
*%=v/v

Tablo 3- 4 Yüksek tuz konsantrasyonlu yıkama tamponu içeriği

% 0.1 SDS*
% 1 Triton X-100*
2mM EDTA
20mM Tris-Cl, pH: 8.1
500 mM NaCl
100 ml dH_2O ile tamamlandı.
*%=v/v

Tablo 3- 5 LiCl Tamponu içeriği

0.25 M LiCl (Sigma L-9650. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE)
% 1 NP-40* (Sigma, NP40S)
%1 Deoxycholate Sodium Salt** (ThermoFisher, 89905)
1mM EDTA
10 mM Tric-Cl, pH:8.1
100 ml dH_2O ile tamamlandı.
*%=v/v
**%=w/v

Tablo 3- 6 TE (Tris-EDTA) Tamponu içeriği

10 mM TrisCl (Sigma T-6066. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) pH: 8.1
1 mM EDTA(Santa Cruz, sc-286969)
100 ml dH_2O ile tamamlandı.

Tablo 3- 7 ChIP Dilusyon Tamponu içeriği

% 0.01 SDS *
% 1.1 Triton X-100 *
167 mM NaCl
16.7 mM Tris-Cl, pH: 8.1
100 ml dH_2O ile tamamlandı.
*%=v/v

Tablo 3- 8 Elusyon Tamponu İçeriği

% 1 SDS *
0,2 M NaHCO3 (Sigma S8761. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE)
100 ml dH_2O ile tamamlandı.
*%=v/v

3.6. qPCR Reaksiyonu

ChIP deneylerinde elde edilen DNA parçalarının mtDNA D-loop bölgesine spesifik primer çiftleriyle gerçek zamanlı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3- 9. qPCR Reaksiyon Bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	**Hacim:**
SybrGreen Master Mix (ThermoFisher, A25742)	5 µl
Primer Forward:	0,5 µl
Primer Reverse:	0,5 µl
DNA:	4 µl
	Total Reaksiyon Hacmi: 10 µl

Reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımından 6 µl alınarak 96 kuyulu PCR mikroplakalarına dağıtıldı.

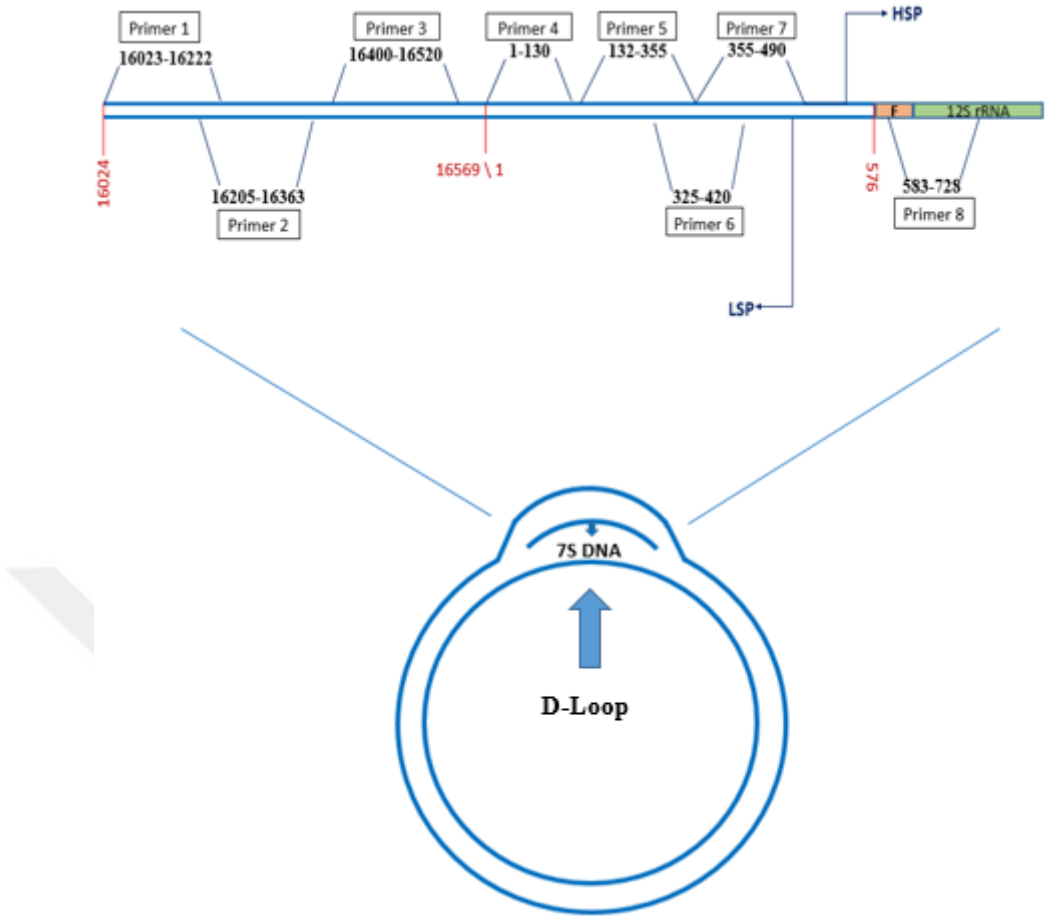
Herbir kuyuya 4 µl ChIP-DNA örneği eklendi, reaksiyon Roche LightCycler 480 cihazında gerçekleştirildi. PCR programı bölüm 1.5.1'de belirtilmiştir:

PCR'de kullanılan primer çiftlerinden Primer 2, 3, 4, 6, 7, 8 Yang ve ark. 2014'ten uyarlanmıştır [85]. Primer 1 ve 5 Primer3 (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus) primer dizayn online yazılım programı kullanılarak sentezlenmiştir.

Aşağıda dizileri ve lokasyonları verilen liyofilize halde temin edilen primerler tedarikçinin belirlediği miktara uygun olarak sulandırılmıştır.

Tablo 3- 10 qPCR'de kullanılan mtDNA D-Loop özgül primer çiftleri gösterilmektedir.

	Lokasyon	Ileri (Forward) (5'-3')	Lokasyon	Geri (Reverse) (5'-3')
Primer1	16023-16042	GTTCTTTCATGGGGAAGCAG	16222-16201	GGTTGATTGCTGTACTTGCTTG
Primer2	16205-16225	CAAGTACAGCAATCAACCCTC	16363-16343	GACGAGAAGGGATTTGACTGT
Primer3	16400-16419	CCACCATCCTCCGTGAAATC	16520-16501	GACCCTGAAGTAGGAACCAG
Primer4	1-19	GATCACAGGTCTATCACCC	130-112	CAGATACTGCGACATAGGG
Primer5	132-151	CTTTGATTCCTGCCTCATCC	355-336	GGGTTTGGCAGAGATGTGTT
Primer6	325-345	CACAGCACTTAAACACATCTC	420-400	GTGCATACCGCCAAAAGATAA
Primer7	355-377	CCAAAAACAAAGAACCCTAACAC	463-490	TATTGATGAGATTAGTAGTATGGGAGTG
Primer8	583-602	GTCTTACCTCCTCAAAGC	728-709	GAGGGTGAACTCACTGGAAC



Şekil 3-4 mtDNA D-Loop bölgesini hedefleyen primer çiftlerinin D-Loop üzerindeki şematik gösterimi verilmiştir.

Gece boyu inkübasyon sonrası örneklere RNaseA (Invitrogen, EN0531) (20 mg/ml)'dan örnek başına 20 µg olacak şekilde eklendi.

Örnekler 37 ^{0}C de 30 dk inkübe edildi.

Proteinase K (ThermoFisher, 26160) (stok: 20mg/ml)'den örneklere 25 µg olacak şekilde eklendi. 2 saat 56 ^{0}C de blok ısıtıcı üzerinde inkübe edildi.

3.6.1. Fenol: Kloroform: İzoamilalkol ile DNA İzolasyonu ve EtOH ile Presipitasyon:

Örnek hacmiyle 1:1 oranında fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) (pH:8.0) tüpe eklendi.

30 sn vorteks yapıldı. 10 kere hızlıca çalkalandı.

16.000 rpm 10 dk santrifüj yapıldı.

Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. Yeni tüp ile devam edildi.

0,5 M olacak şekilde 10 M amonyum asetat stok çözeltisinden eklendi.

Örnek hacminin 2 katı olacak şekilde %100 EtOH eklendi.

Örnekler 10 kere alt-üst edilerek karıştırıldı.

Gece boyu -20 ^{0}C'de presipitasyon için inkübe edildi.

Ertesi gün örnekler 18.000 rpm 30 dk +4 ^{0}C de santrifüj edildi.

Süpernatant atıldı. Pellete 1 ml %70'lik EtOH eklendi.

5 dk RT inkübe edildi. Ardından odasıcaklığında 15 dk, 18.000 rpm'de santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası EtOH dikkatli bir şekilde olabildiğince uzaklaştırıldı.

Tüm tüplere DNaz RNaz içermeyen dH_2O eklendi ve DNA'nın çözünmesi için nazikçe karıştırıldı.

Örnekler qPCR deneyine kadar -20 ^{0}C'de saklandı.

3.6.2. qPCR Programı

Tablo 3- 11 PCR reaksiyonunun program ve sıcaklık döngüleri verilmiştir.

Program Adı	Sıcaklık	İnkubasyon	Sıcaklık değişim oranı (ºC/sn)	Döngü Sayısı
*UDG Aktivasyonu	50 ^{0}C	2 dk	4.4	1 döngü
DNA Polimeraz Aktivasyonu	95 ^{0}C	2 dk	4.4	1 döngü
**Amplifikayson	95 ^{0}C	15 sn	4.4	40 döngü
	60 ^{0}C	1 dk	2.2	
Erime Eğrisi	95 ^{0}C	10 sn	4.4	1 döngü
	55 ^{0}C	10 sn	2.2	
	95 ^{0}C	devamlı	0.11	

***Soğutma	40	^{0}C	2.2

*UDG Aktivasyonu: Yanlış hazırlanmış, spesifik olmayan ürünlerin bozunmasına izin vererek çevreden oluşabilecek çapraz kontaminasyonu engellemeyi amaçlar ve amplifikasyona yönelik doğal nükleik asit şablonlarını bozulmadan bırakır.**Amplifikasyon: Hedef DNA'yı çoğaltır ***Soğutma: Termal bloğu soğutmayı sağlar.

3.7. Sitotoksisite Testi

Sitotoksisite ölçümü, kültürdeki membranı hasarlanmış veya ölü hücrelerden medyuma salınan laktat dehidrogenaz (LDH) enzim miktarının belirlenmesiyle gerçekleştirildi. LDH salınımı analizinde kullanılacak olan kontrol grupları deney grupları ile birlikte hazırlandı. MEM+'dan oluşan negatif kontrol, kültür medyumundaki LDH aktivitesini belirlemek üzere hazırlandı. Hiçbir madde uygulanmayan kontrol grupları, normal koşullar altındaki hücrelerden LDH salınımı belirlemek üzere düşük konsantrasyonlu kontrol grubu olarak kullanıldı.

Hücrelerden salınabilecek en yüksek seviyedeki LDH miktarını belirlemek amacıyla kültür medyumuna %2 Triton X-100 verilip 24 saat oda sıcaklığında inkübe edilen yüksek konsantrasyonlu kontrol grubu oluşturuldu. Her gruptan 24 saatlik uygulama süreleri sonunda kontrol gruplarına ve deney gruplarına ait kültür medyumlarından 500'er µl örnek alınarak ELISA çalışmalarında kullanılmak üzere -80^{o}C'de saklandı.

LDH salınımı Cytotoxicity Detection (LDH) kiti (Roche 11 644 793 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) ile üreticinin talimatlarına uygun olarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

Her bir hücre grubundan toplanan üst sıvı örneğinden 100 µl 96 kuyulu mikroplakalara yüklendi.

Kuyulardaki örneklerin üzerlerine taze hazırlanmış 100 µl reaksiyon karışımı eklendi, 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi.

İnkübasyonun ardından örneklerin absorbansları 492 nm'lik filtre ile ThermoFisher MultiSkan EX (ThermoFisher Fisher Scientific^{TM} Delaware, USA**)** ELISA okuyucuda okundu.

Her bir örneğe ait ölçümler 3 kere tekrarlandı.

3.8. İstatistiksel Analizler

Kontrol ve deney gruplarına ait elde edilen verilerin dağılımı ve SD değerleri arasındaki fark anlamlı değilse önce One-Way ANNOVA, sonrasında ise Tukey-çoklu karşılaştırma testi gerçekleştirildi. Kontrol ve deney grupları arasındaki SD değerleri anlamlı derecede değişim varsa ve/veya gruplar normalite testinden geçemiyorsa, önce Kruskal Wallis, ardından çoklu karşılaştırma için Dunn's çoklu karşılaştırma testine sokuldu. $p<0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı fark kabul edildi. İstatistiksel analizler GraphPad InStat 3.06 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.8.1. ChIP-qPCR Sonuçlarının Hesaplanması/Analizi

ChIP sonuçları kat artışı/zenginleştirmesi (fold enrichment) metoduna göre hesaplanmıştır. ChIP-qPCR sonuçlarından alınan sinyalin negatif kontrole göre başka bir deyişle arka plan sinyaline göre karşılaştırılması/ arka plan sinyalinden çıkarılması yoluyla hesaplanmasıdır. Dolayısıyla ChIP örneklerinden alınan sinyaller negatif kontrollerden alınan sinyallere göre kat artışı olarak ifade edilir. Kullanılan negatif kontrol, kullanılan antikorların izotip kontrolü (IgG) ya da antikor içermeyen yalnızca agaroz boncukar ile presipite edilen gruptur.

Bu yönteme göre arka plan sinyal seviyeleri (negatif kontrolden alınan sinyal) primer setleri, numuneler ve deneyler arasında değişiklik gösterir.

İki farklı yolla hesaplanabilir:

1. $\Delta Ct = Ct_{\text{örnek}} - Ct_{\text{negatif}}$

   Negatif kontrol ΔCt değeri her zaman 0 olacaktır.

   Kat Artışı (Fold Enrichment): $2^{-\Delta Ct}$

2. $\Delta Ct = Ct_{\text{input}} - Ct_{\text{örnek}}$

   $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{IgG}}$

   Kat Artışı (Fold Enrichment) = $2^{\Delta\Delta Ct}$

Ct: döngü eşiği (cycle threshold)

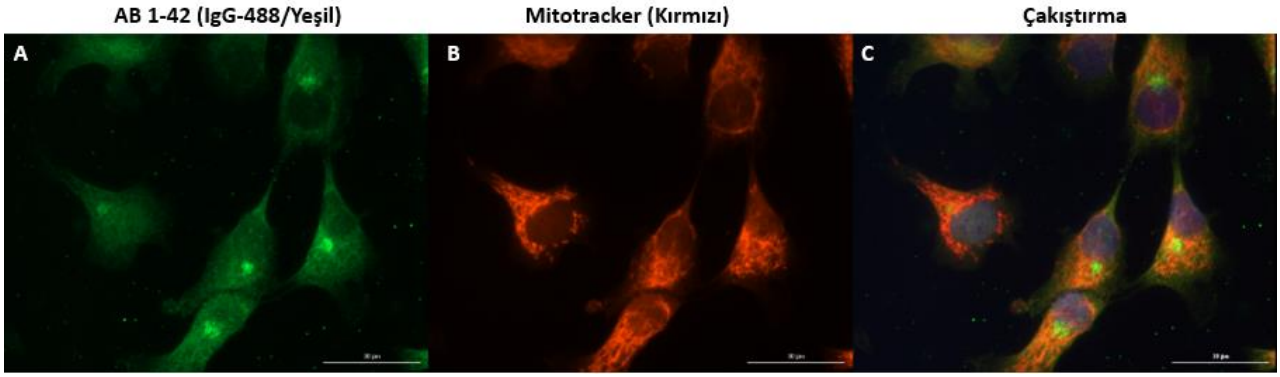
4. BULGULAR

Çalışmamızda SH-SY5Y hücrelerinde, Aβ1-42'nin mtDNA ile etkileşimi olup olmadığı ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü (TF) olan TFAM'ın mtDNA'ya bağlanma kapasitesi üzerine Aβ1-42'nin herhangi bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Hipotezimizi test etmek üzere öncelikle fizyolojik koşullarda SH-SY5Y hücrelerinin mitokondrilerinde Aβ1-42'nin varlığı mitotracker ve immünfloresan boyamalarla araştırılmıştır. Ardından mtDNA- Aβ1-42 kolokalizasyonu, aphidicolin ve BrdU uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinde, DNA-protein ilişkilerini çift immunfloresan yöntemlere dayanarak incelemeyi sağlayan BrdU tekniği ile incelenmiştir. Aβ1-42'nin TF olarak mtDNA bağlanma potansiyeli ve TFAM'ın Aβ1-42 uygulamaları sonucunda mtDNA'ya bağlanma kapasitesinin değişip değişmediği ChIP deneylerini takiben yapılan qPCR ile araştırılmıştır. SH-SY5Y hücrelerine 0,1 μM ve 5 μM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda Aβ1-42 peptid uygulaması yapılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra ChIP deneyleri gerçekleştirilmiş, kontrol ve deney gruplardan elde edilen DNA parçaları D-loop'un farklı bölgelerine özgül primerler kullanılarak qPCR ile analiz edilmiştir. Her grupta ChIP deneylerinden önce mitokondri izolasyonu gerçekleştirmiş ve ChIP sonucu elde edilen DNA parçalarının mtDNA'ya özgül olması sağlanmıştır.

4.1 Floresan Mikroskobik Değerlendirmeler

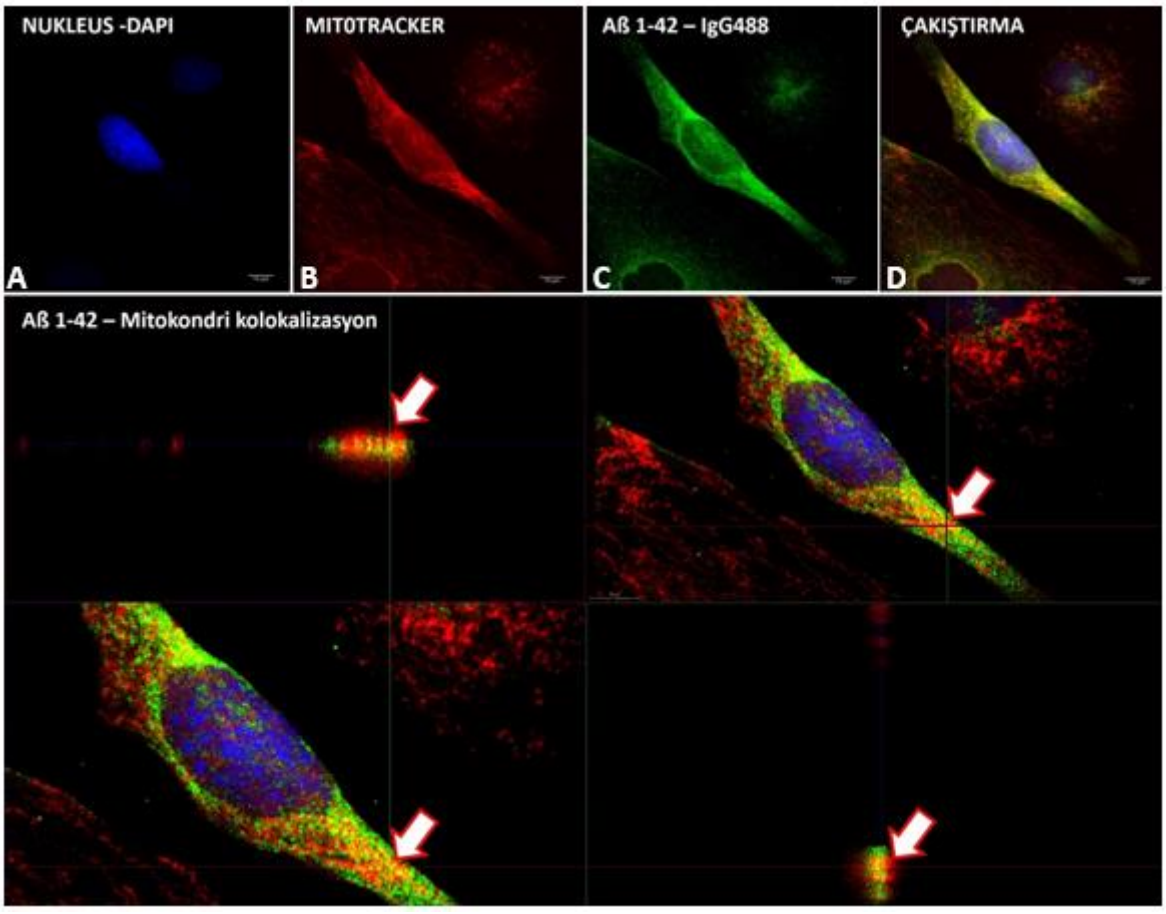
4.1.1. Uygulama Yapılmamış SH-SY5Y Hücrelerinin Mitokondrilerinde Endojen Aβ1-42 Varlığının Gösterilmesi

Herhangi bir uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücrelerinde normal koşullarda bulunan Aβ1-42'nin, mitokondrideki lokalizasyonu gösterilmiştir (Şekil 4-1, Şekil 4-2). SH-SY5Y hücrelerinin mitokondrileri, mitokondri boyası mitotracker ile belirlenmiştir. Hücrelerdeki endojen Aβ1-42 işaretlemesi, Aβ1-42 antikoru ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4-1 Uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücrelerinde endojen Aβ1-42'nin fizyolojik koşullarda mitokondri ile kolokalizasyonu gösterilmiştir.

A. Aβ1-42 (yeşil), B. Mitotracker-Mitokondri (kırmızı) C. Aβ1-42 ile mitokondrinin çakıştırılması (sarı) ve Nükleus boyası-DAPI (mavi) gösterilmiştir. BioTek Lionheart FX, Büyütme 60X



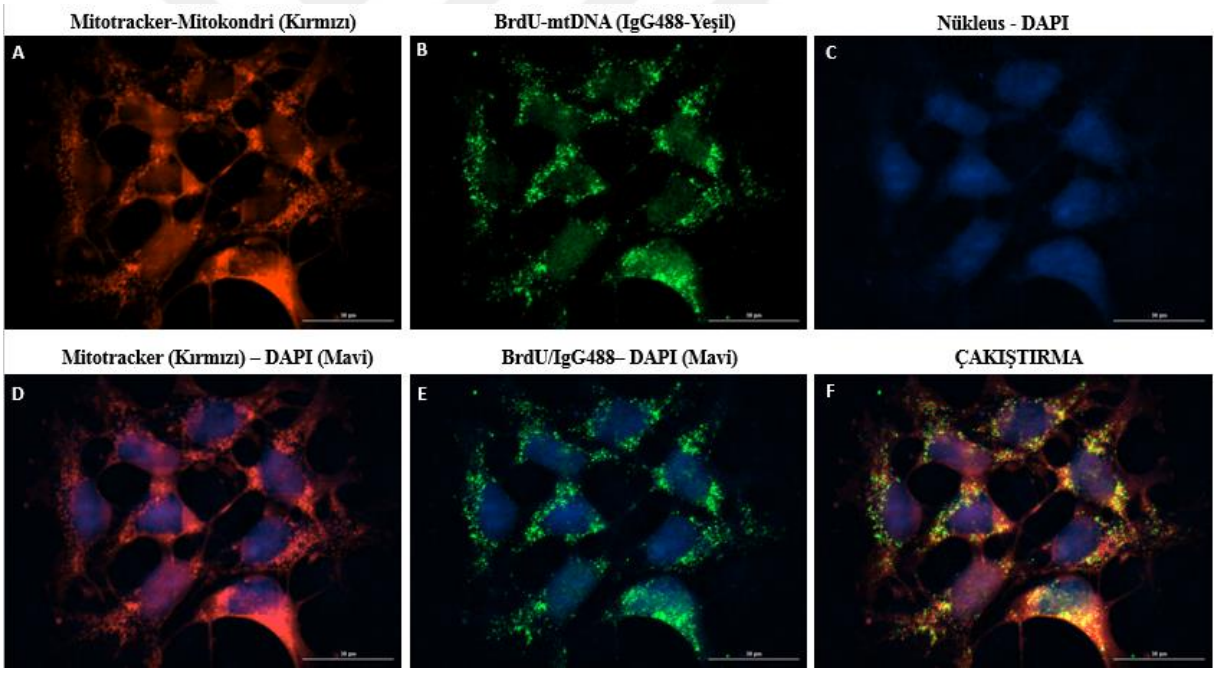
Şekil 4-2 Uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücrelerinde endojen Aβ1-42 ve mitokondri kolokalizasyonları gösterilmiştir.

A. Nükleus boyası-DAPI (mavi) B. Mitotracker - Mitokondri (k1ırmızı) C. Aβ1-42 (yeşil), D. Aβ1-42 ve mitokondri görüntülerinin çakıştırılması gösterilmiştir. Leica Konfokal Mikroskop, Büyütme: 63X

4.1.2. SH-SY5Y Hücrelerinde BrdU ile mtDNA İşaretlemesi

SH-SY5Y hücrelerinde, BrdU işaretlemesinin mtDNA üzerinde yapıldığının doğrulanması amacıyla, Aβ1-42 ile BrdU-mtDNA işaretlemelerinden önce, mtDNA-BrdU-mitokondri kolokalizasyonu gösterilmiştir (Şekil 4-3). 1 saat boyunca yalnızca 20 µM aphidicolin ve takiben 72 saat 15 µM BrdU uygulamasının ardından mitotracker boyaması ve immünfloresan işaretlemeler yapılmıştır. Mitokondri boyaması mitotracker ile gerçekleştirilmiştir. mtDNA'nın işaretlemesi 72 saat BrdU uygulamasının ardından BrdU antikoru ile belirlenmiştir.

Çakıştırılan görüntüde nükleus içinde BrdU aracılı DNA işaretlemelerinin çok az olduğu görülmektedir. Bu durum aphidicolin uygulamasının çalıştığını ve BrdU ile işaretlenenlerin mtDNA olduğunu kanıtlamaktadır.

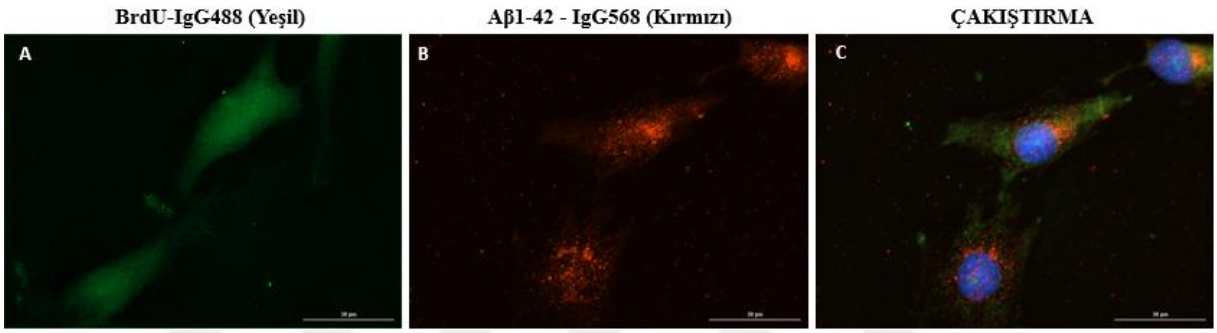


Şekil 4-3 SH-SY5Y hücrelerinde mitokondri ile mtDNA'nın kolokalizasyonu gösterilmiştir.

A. Mitotracker-Mitokondri (kırmızı) B. BrdU - mtDNA (yeşil) C. Nükleus boyası-DAPI (mavi) D. Mitotracker-Mitokondri (kırmızı) ile DAPI (mavi) çakıştırılması E. BrdU-mtDNA ile nükleus çakıştırılması F. mtDNA-BrdU ile mitotracker-mitokondri çakıştırılması/kolokalizasyonu (sarı) görülmektedir. LionHeart FX, Büyütme: 60X

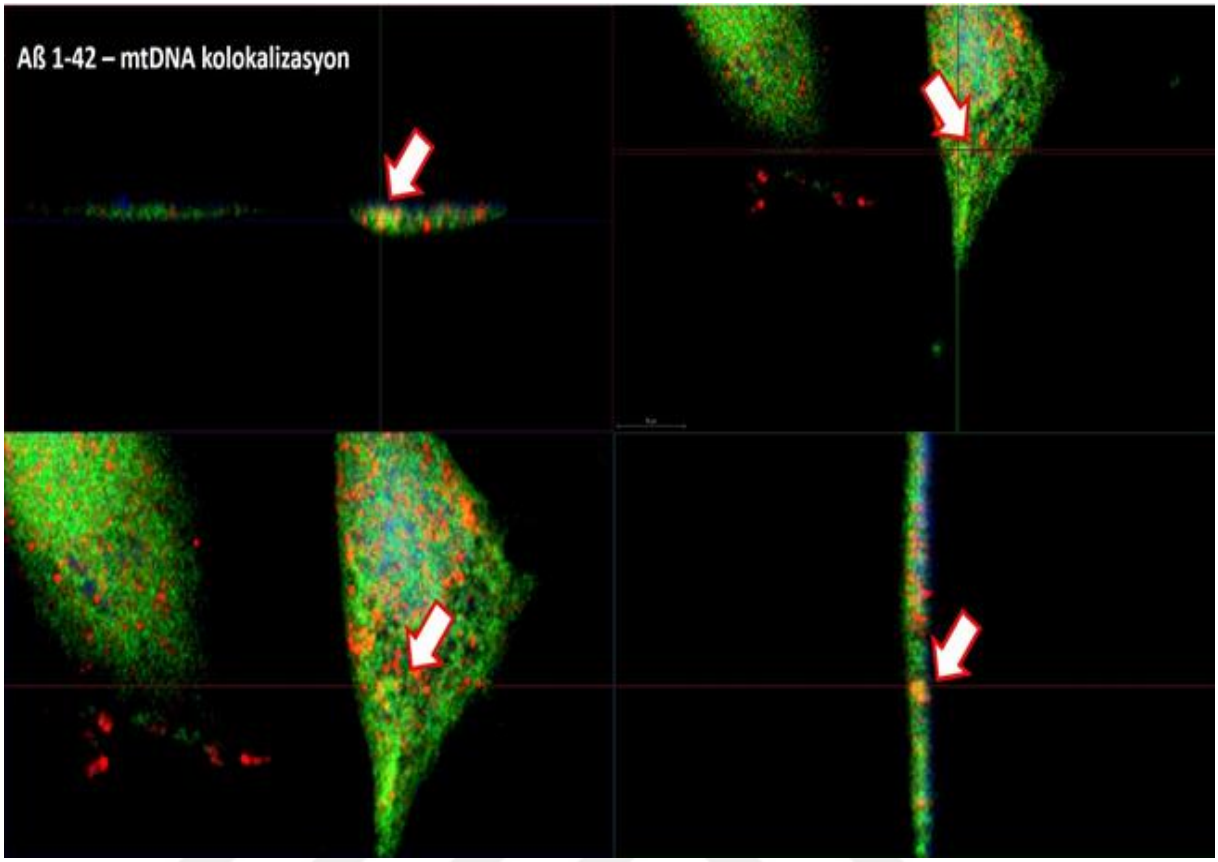
4.1.3. SH-SY5Y Hücrelerinde mtDNA-BrdU ile Aβ1-42 kolokalizasyonunun gösterilmesi

Farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücrelerinin fizyolojik koşullarda hücre içinde bulunan Aβ1-42 ile mtDNA'nın kolokalizasyonu gösterilmiştir (Şekil 4-4, Şekil 4-5). SH-SY5Y hücrelerinde 1 saat 20 µM aphidicolin ve takiben 72 saat 15 µM BrdU uygulamasının ardından mtDNA-BrdU ile Aβ1-42 ve mtDNA-BrdU çift immunfloresan işaretlemeleri yapılmıştır. mtDNA işaretlemesi BrdU antikoru ile; Aβ1-42'nin işaretlenmesi Aβ1-42 antikoru ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4-4 SH-SY5Y hücrelerinde Aβ1-42'nin mtDNA-BrdU ile kolokalizasyonu gösterilmiştir.

A. mtDNA-BrdU (yeşil), B. Aβ1-42 (kırmızı) C. mtDNA-BrdU ile Aβ1-42 çakıştırılması ve Nükleus boyası-DAPI (mavi) görülmektedir. LionHeart FX, Büyütme: 60X

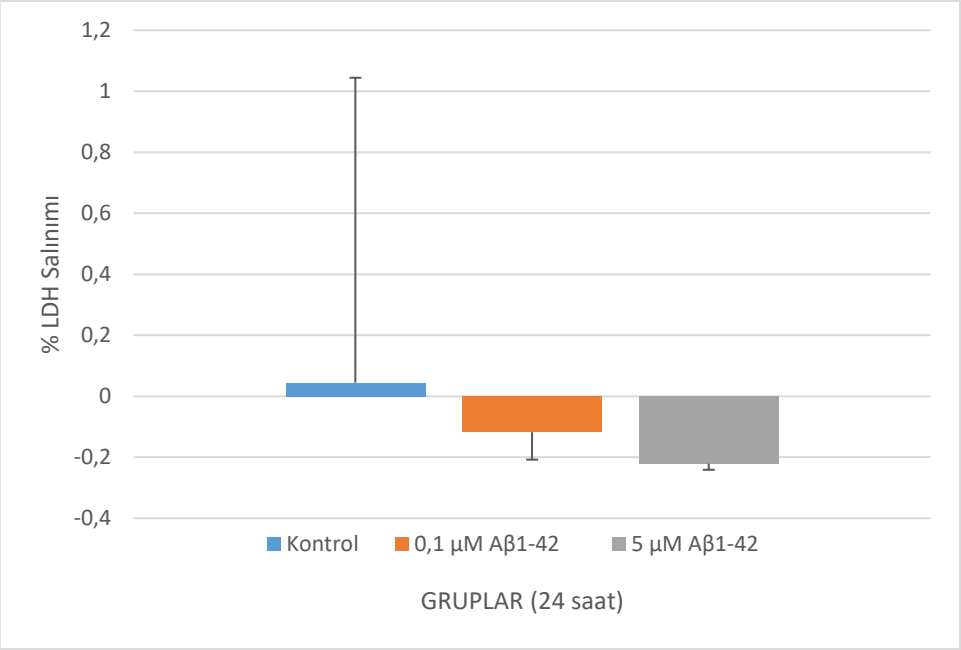


Şekil 4-5 SH-SY5Y hücrelerinde Aβ1-42'nin mtDNA-BrdU ile kolokalizasyonu gösterilmiştir.

mtDNA-BrdU (yeşil), Aβ1-42 (kırmızı), Aβ1-42 ile mtDNA-BrdU çakıştırılması (sarı) görülmektedir. Leica Konfokal Mikroskop, Büyütme: 63X

4.2. Sitotoksisite Ölçüm Sonuçları

Farklılaştırılmamış SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat 0,1 µM Aβ1-42 ve 5 µM Aβ1-42 uygulaması sonucu oluşan sitotoksik etki kültür ortamına salınan LDH seviyesinin ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Hücrelerde Aβ1-42 uygulaması sonucu salınan LDH düzeyleri Şekil 4-6'da gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4-6 24 saat süreyle Aβ1-42 uygulanmış SH-SY5Y hücre kültürüne ait tüm grupların 24. Saatteki salınan LDH miktarları gösterilmiştir.

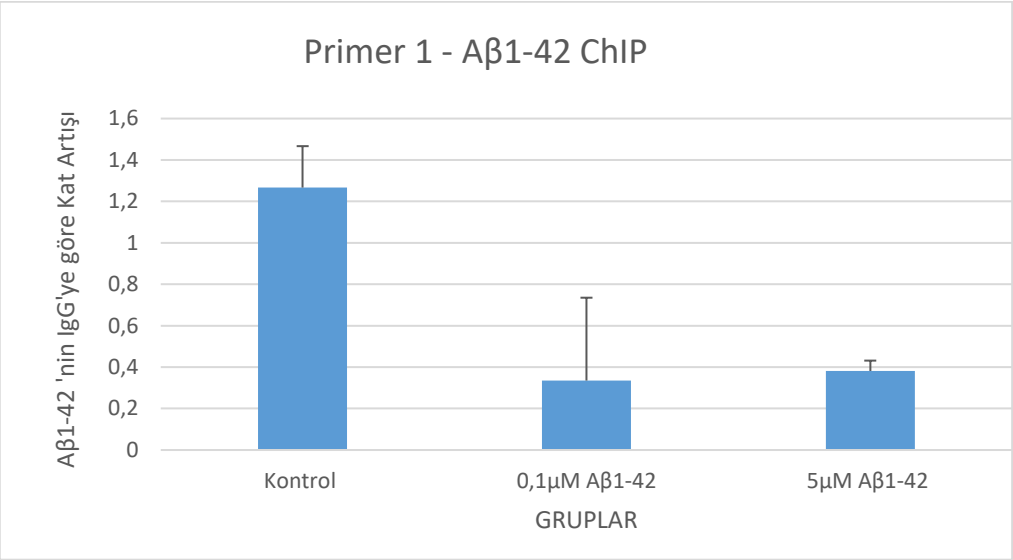
Kontrol grubunun LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

4.3. SH-SY5Y Hücrelerinde Kontrol, 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 Uygulamaları Sonucu Aβ1-42'nin bir TF olarak mtDNA'ya Olası Bağlanma Potansiyelinin ChIP-qPCR ile İncelenmesi

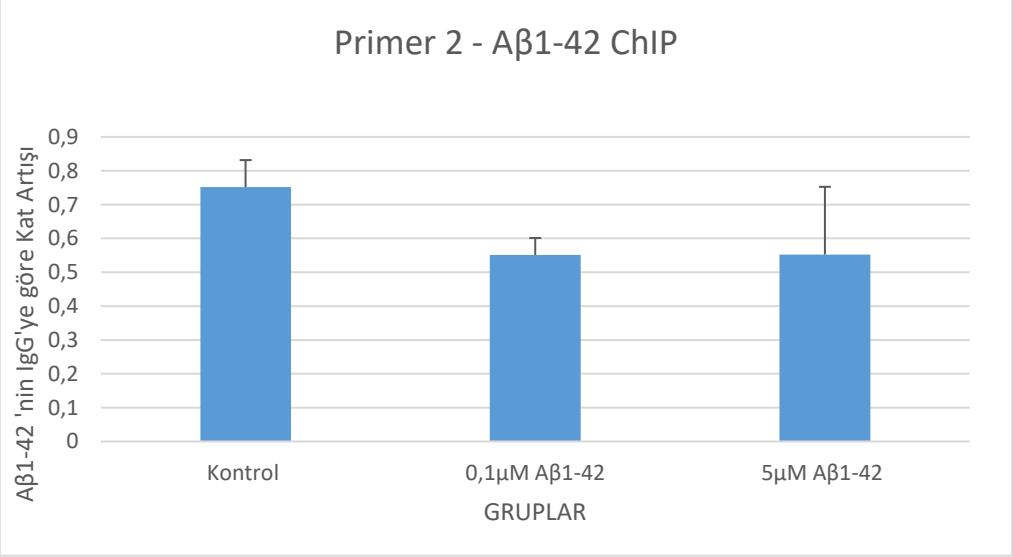
Nükleer DNA'da bazı genlerin promotor bölgelerine bağlanıp TF olarak çalışabildiği gösterilen Aβ1-42'nin, mtDNA'ya da bağlanma olasılığı ChIP yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücreleri ile 0,1 µM ve 5 µM olmak üzere iki farklı dozda Aβ1-42 uygulması yapılmış hücrelerden, 24 saat sonra mitokondri izolasyonu yapılmıştır. Mitokondri izolasyonu ardından Aβ1-42 antikoru ile ChIP deneyi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca deneylerde pozitif kontrol olarak TFAM antikoru, negatif kontrol olarak normal tavşan IgG ile presipitasyon yapılan gruplar kullanılarak ChIP deneylerinin spesifikliği kontrol edilmiştir. ChIP deneylerini takiben elde edilen DNA parçaları mtDNA D-loop'a özgül primerler kullanılarak qPCR ile analiz edilmiştir.

Kontrol grubu ile 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamaları sonucu elde edilen, Aβ1-42 bağlanma sinyalini ifade eden kat artışı değerleri D-loop üzerinde hedeflenen bazı bölgeler için kendi aralarında fark gösterse de, kat artışları tüm gruplar için 3'ün altında

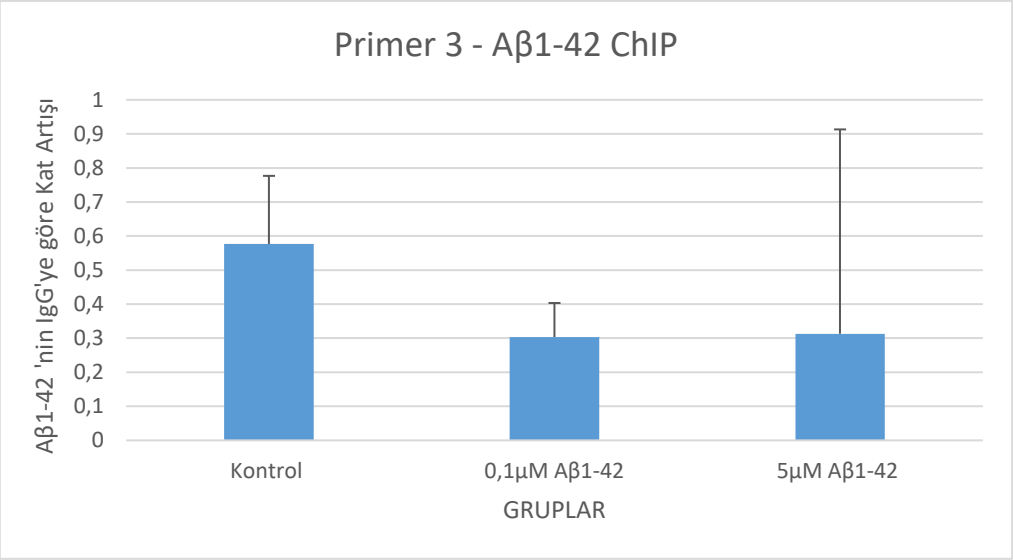
bir değere sahip olduğundan Aβ1-42'nin mtDNA'ya bağlandığını gösterebilmesi açısından yeterli kabul edilmemiş ve istatistiksel değerlendirmeye alınmamıştır [56] (Şekil 4-7 – 4-14).



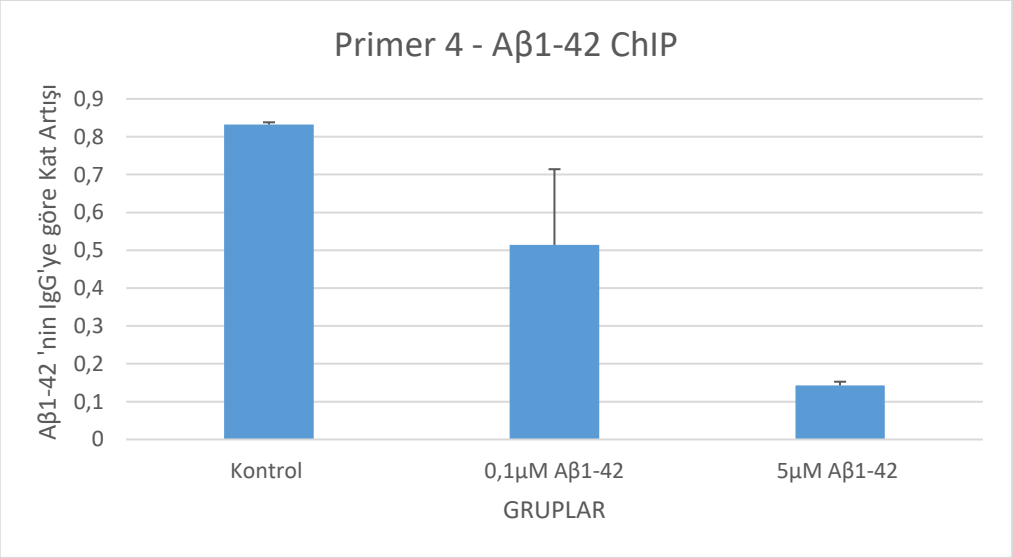
Şekil 4-7 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.



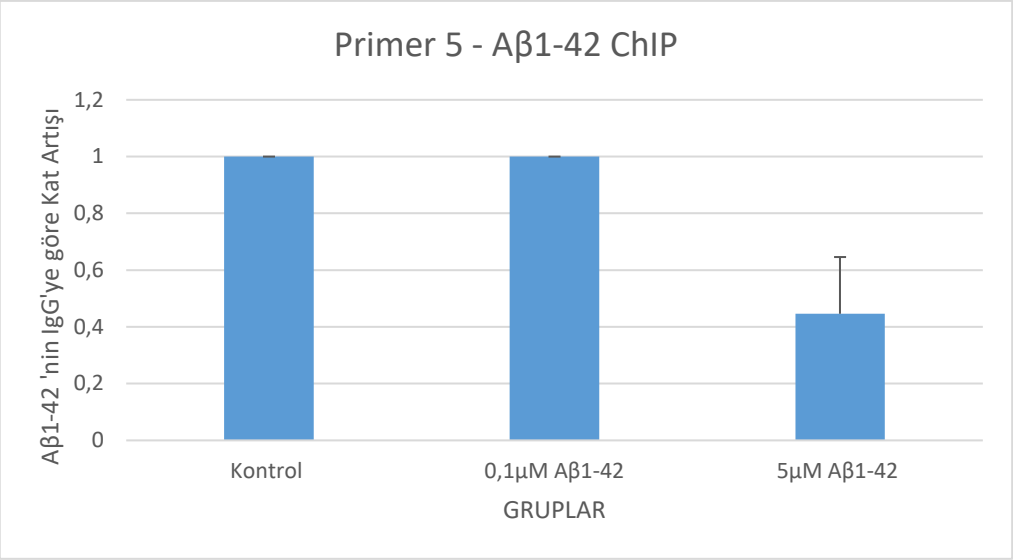
Şekil 4-8 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.



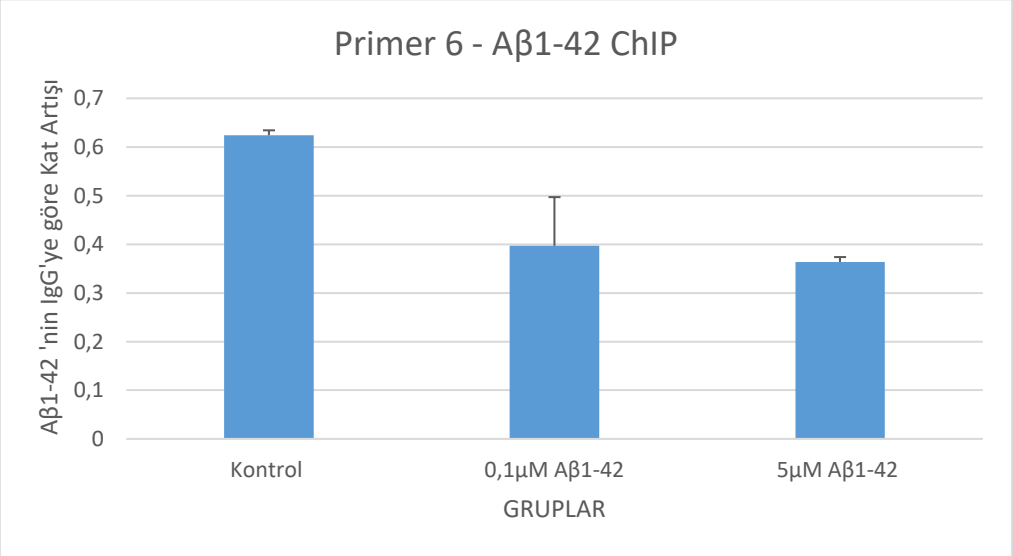
Şekil 4-9 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.



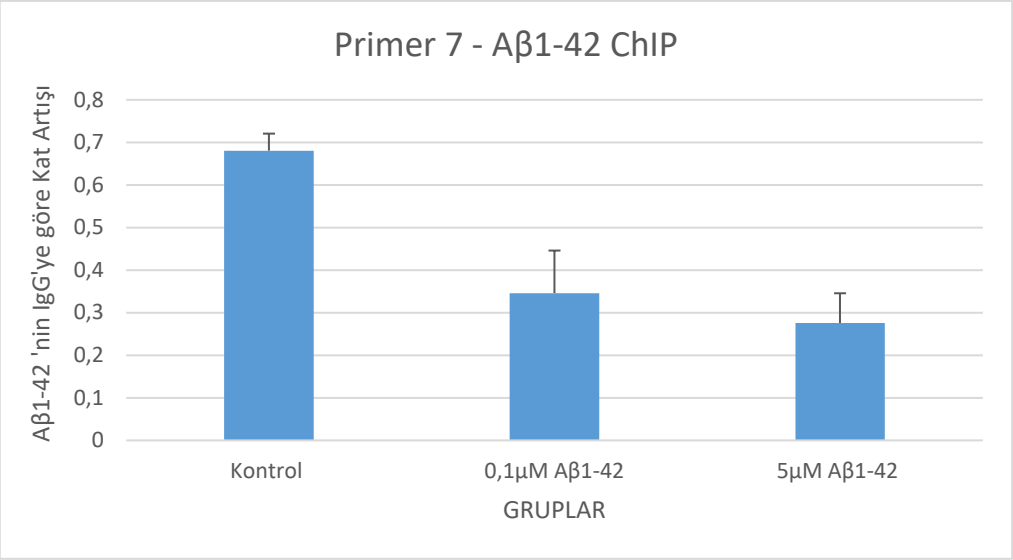
Şekil 4-10 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.



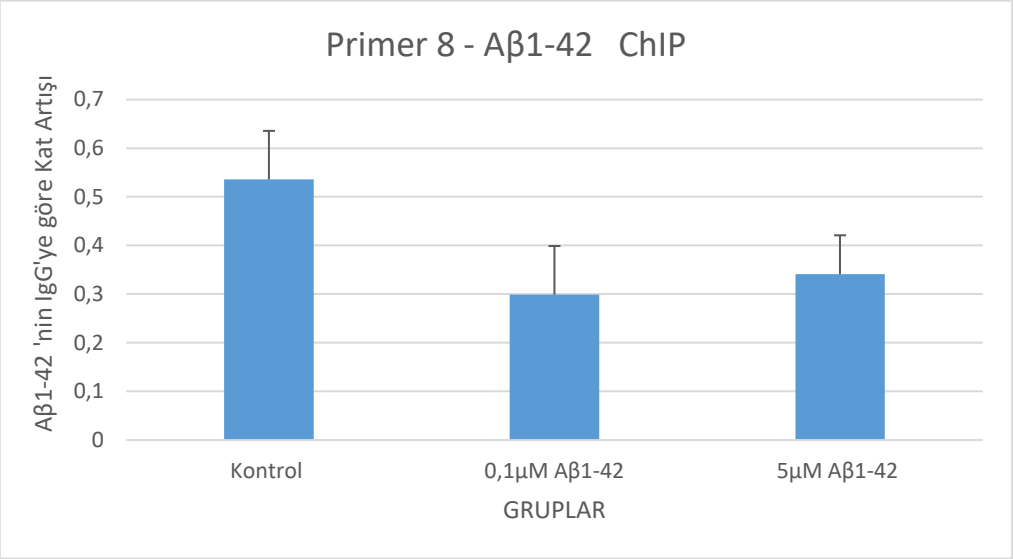
Şekil 4-11 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.



Şekil 4-12 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.



Şekil 4-13 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.



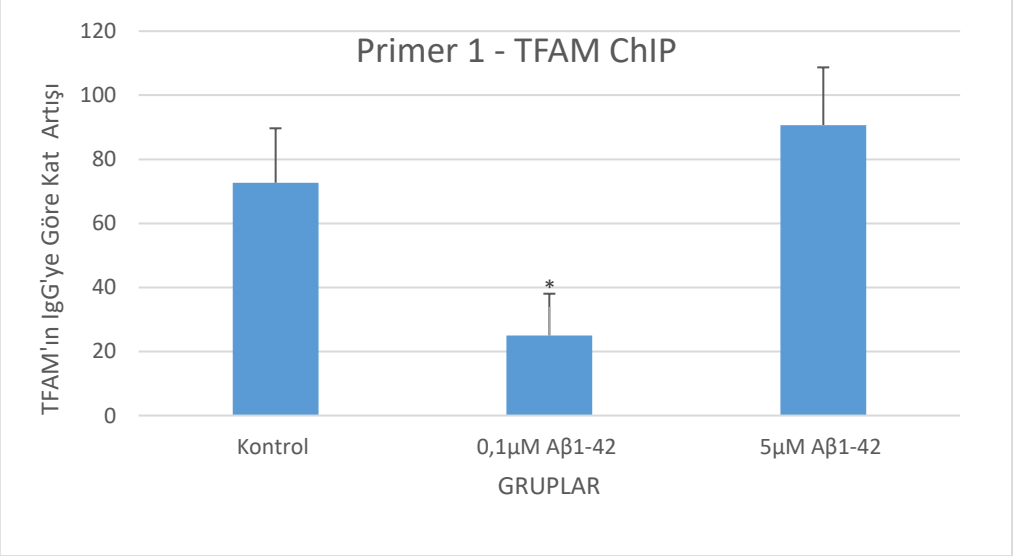
Şekil 4-14 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan Aβ1-42 ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu (IgG'ye) üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

4.4. SH-SY5Y Hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 Uygulamaları Sonucu TFAM'ın mtDNA D-Loop Bölgesine Bağlanma Kapasitesi Üzerine Etkisinin ChIP-qPCR Deneyleriyle İncelenmesi

Çalışmamızda Aβ1-42'nin TFAM mtDNA bağlanma kapasitesine etki edip etmediği, etki ediyorsa nasıl etkilediği Aβ1-42 uygulaması yapılan hücrelerde TFAM antikoruyla gerçekleştirilen ChIP deneyleriyle araştırılmıştır.

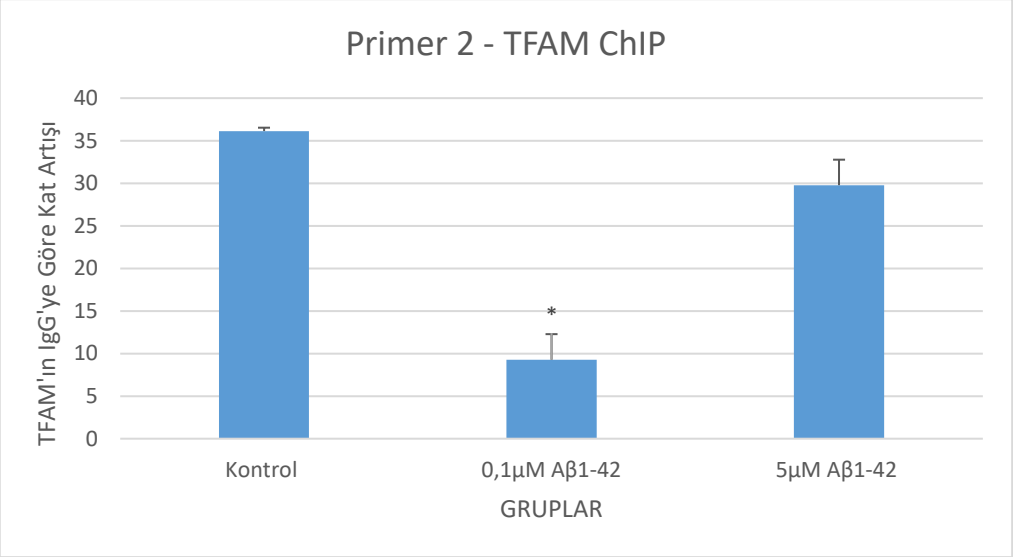
Bu amaçla uygulama yapılmamış SH-SY5Y hücreleri TFAM'ın mtDNA'ya normal/fizyolojik koşullarda bağlanma kapasitesini belirlemek için kullanılmıştır. 0,1 µM ve 5 µM olmak üzere iki farklı dozda Aβ1-42 uygulaması yapılmış hücrelerden ve kontrol grubundan (uygulama yapılmamış hücreler) 24 saat sonra mitokondri izolasyonu yapılmıştır. Mitokondri izolasyonu ardından TFAM antikoru ile ChIP deneyi gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak normal tavşan IgG ile ChIP yapılan gruplar kullanılmıştır. ChIP deneylerinden elde edilen DNA parçaları mtDNA D-loop'a özgül primerler kullanılarak qPCR ile analiz edilmiştir.

ChIP-qPCR deneyleri sonucu; 0,1 µM Aβ1-42 uygulaması yapılan hücrelerden elde edilen TFAM bağlanma sinyallerinin D-loop üzerinde hedeflenen bütün bölgelerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede düştüğü saptandı. 5 µM Aβ1-42 uygulamasından elde edilen TFAM bağlanma sinyallerinin ise D-loop üzerinde yalnızca iki bölgede (Primer 5 ve 8 ile çoğaltılan) anlamlı derecede yükseldiği tespit edildi.



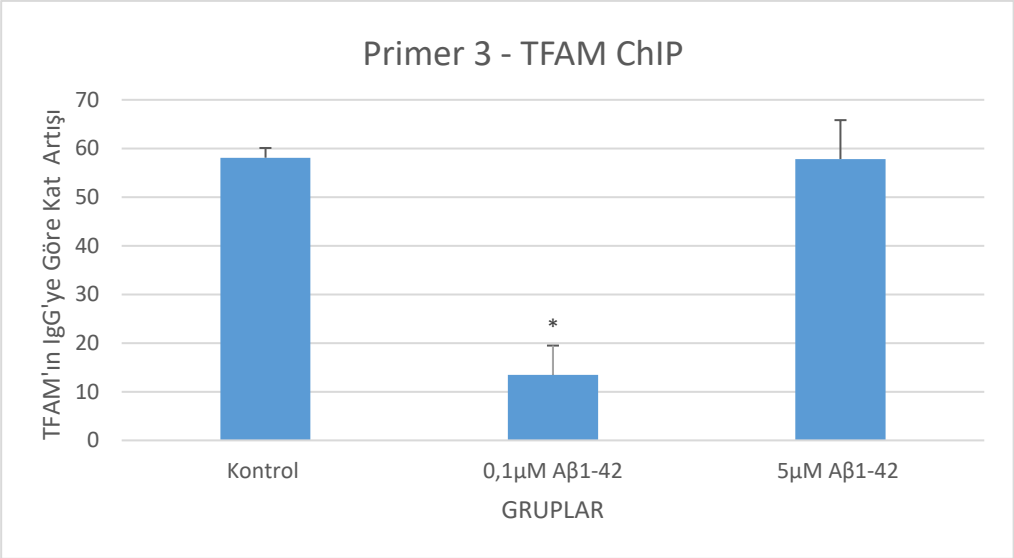
Şekil 4-15 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

Uygulama yapılmamış kontrol grubundan elde edilen bağlanma sinyalleri ile 5 µM Aβ1-42 uygulaması sonucu elde edilen sinyaller arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Öte yandan 0,1 µM Aβ1-42 uygulaması yapılan gruptan elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin, kontrol ($p<0,01$) ve 5 µM Aβ1-42 gruplarına ($p<0,001$) göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4-15).



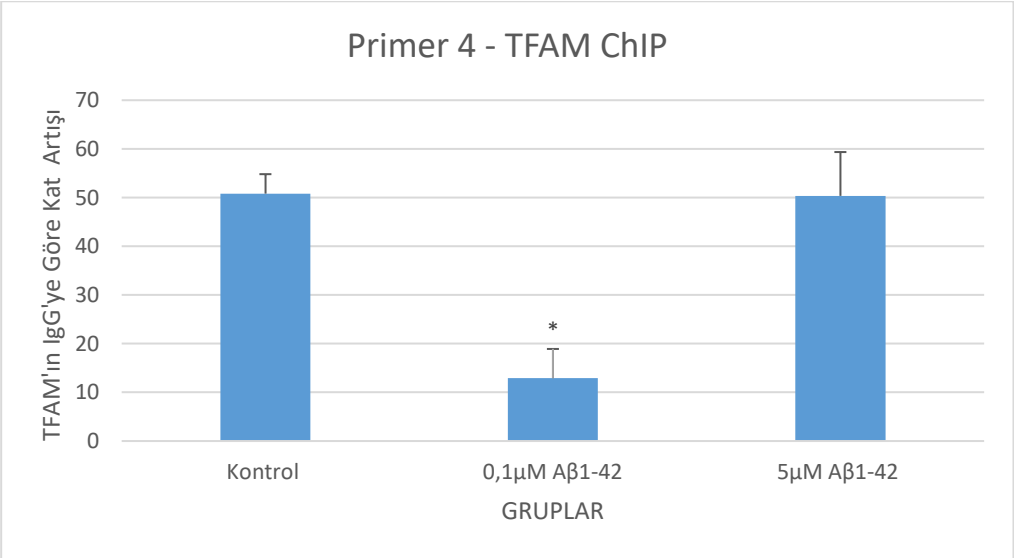
Şekil 4-16 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

0,1 µM Aβ1-42 uygulamasından elde edilen TFAM bağlanma sinyali kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşmüştür ($p<0,01$). 5 µM Aβ1-42 uygulaması, 0,1 µM Aβ1-42 grubuna göre artmış olsa da bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir. 5 µM Aβ1-42 uygulaması ile kontrol grubu arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunanamıştır (Şekil 4-16).



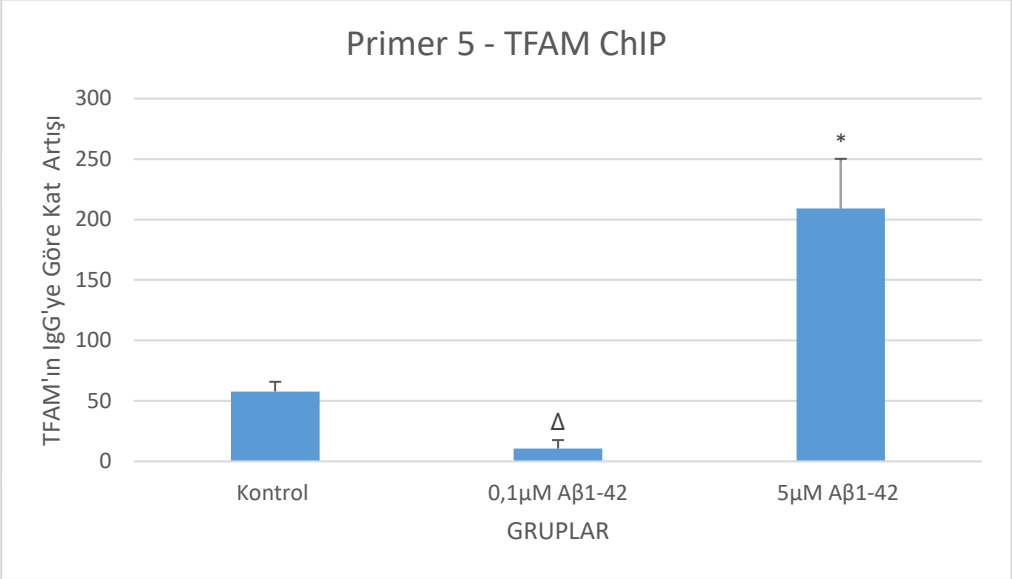
Şekil 4-17 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

0,1 µM Aβ1-42 uygulamasından elde edilen TFAM bağlanma sinyali kontrol ve 5 µM Aβ1-42 uygulaması grubuna göre anlamlı derecede düşmüştür ($p<0,05$). Ancak 5 µM Aβ1-42 uygulamasından elde edilen kat artışı ile kontrol grubundan elde edilen sinyaller arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4-17).



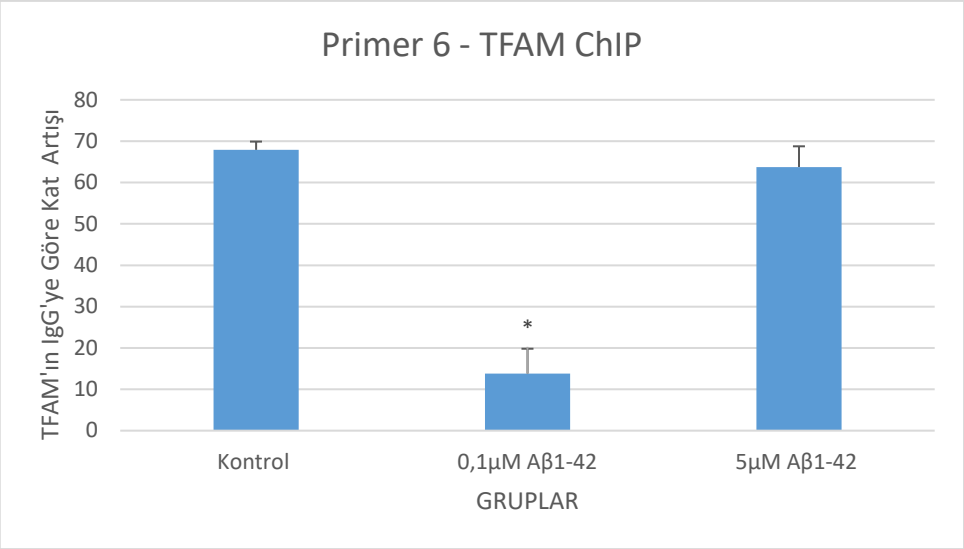
Şekil 4-18 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

0,1 µM Aβ1-42 uygulaması yapılan gruptan elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin, kontrol ($p<0,001$) ve 5 µM Aβ1-42 gruplarına ($p<0,001$) göre istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. 5 µM Aβ1-42 uygulaması sonucu elde edilen sinyaller ile uygulama yapılmamış kontrol grubundan elde edilen bağlanma sinyalleri ile arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4-18).



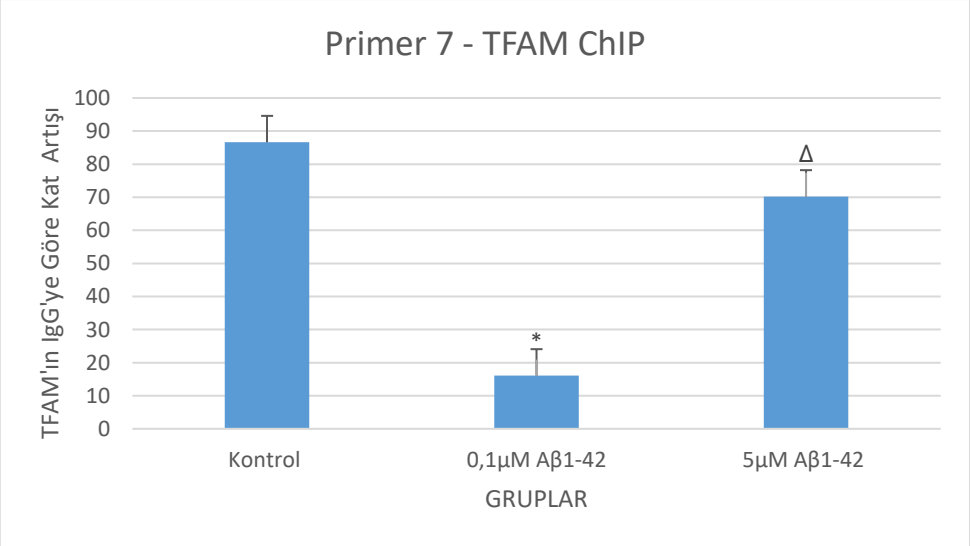
Şekil 4-19 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

5 µM Aβ1-42 uygulaması yapılmış hücrelerden elde edilen TFAM bağlanma sinyali/ kat artışı, kontrol ($p<0,001$) ve 0,1 µM Aβ1-42 ($p<0,001$) uygulaması yapılmış gruplara göre anlamlı derecede artmıştır. 0,1 µM Aβ1-42 uygulamasından elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4-19).



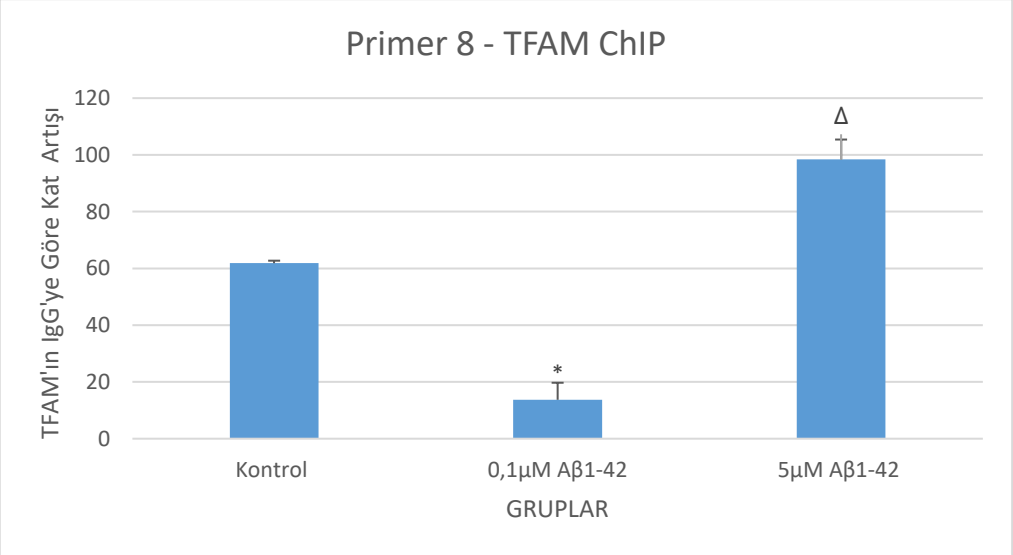
Şekil 4-20 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

0,1 µM Aβ1-42 uygulamasından elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin kontrol ve 5 µM Aβ1-42 uygulanan gruplara göre anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir ($p<0,001$) . Ancak 5 µM Aβ1-42 uygulaması sonucu elde edilen sinyaller ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4-20).



Şekil 4-21 SH-SY5Y hücrelerinde 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

0,1 µM Aβ1-42 uygulamasından elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin kontrol ve 5 µM Aβ1-42 uygulanmış gruba göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ($p<0,001$). 5 µM Aβ1-42 uygulaması yapılmış hücrelerden elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). (Şekil 4-21).



Şekil 4-22 SH-SY5Y hücrelerine 0,1 µM ve 5 µM Aβ1-42 uygulamasından 24 saat sonra yapılan TFAM ChIP-qPCR sonuçlarının, sadece IgG ile yapılan ChIP grubu üzerinden hesaplanan kat artışları verilmiştir.

5 µM Aβ1-42 uygulaması yapılmış hücrelerden elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin, kontrol ($p<0,001$) ve 0,1 µM Aβ1-42 ($p<0,001$) uygulaması yapılmış gruplara göre anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. 0,1 µM Aβ1-42 uygulamasından elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4-22).

5. TARTIŞMA

Çalışmamız SH-SY5Y hücrelerinde, Aβ1-42'nin mtDNA ile etkileşimi olup olmadığını ve Aβ1-42'nin mitokondrial TF, TFAM'ın mtDNA'ya bağlanma potansiyeline etki edip etmediğini araştırmak üzerine tasarlanmıştır. Bu amaçla herhangi bir uygulama yapılmamış ve 0,1 μM ve 5 μM olmak üzere iki farklı dozda Aβ1-42 uygulaması yapılan SH-SY5Y hücrelerinde, Aβ1-42'nin mtDNA'ya bağlanıp bağlanmadığı ve Aβ1-42 uygulamasının TFAM'ın mtDNA'ya bağlanma kapasitesini etkileyip etkilemediği D-Loop bölgesindeki dağılımları açısından incelenmiştir.

Alzheimer hastalığı (AH), demansın en yaygın şekli olup, nöronal hücre kaybıyla ilişkili yavaş ilerleyen bilinç kaybı, davranışsal ve kişilik problemlerinin gelişimi ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. AH patolojik olarak hiperfosforile mikrotübül ile ilişkili tau proteininin hücre içi birikimi ile oluşan nörofibriler yumaklar ve Aβ1-42 peptidlerinin neden olduğu hücre dışı senil plaklar ile tanımlanır[86]. AH'nin moleküler patolojisinin aydınlatılmasında ilerleme kaydedilmesine rağmen hala bazı mekanizmalar aydınlatılamamış ve mevcut olan tedaviler bazı semptomları sadece geçici olarak hafifleterek altta yatan nedenleri değiştirmemektedir [72].

AH patolojisinin major bileşeni olan amiloid plaklarını oluşturan Aβ1-42, bir hücre membranı proteini olan APP'nin kırpılmasının sonucunda üretilmektedir. APP, hücre membranında gömülü olan β-sekretaz enzimi tarafından kırpılmasının ardından oluşan parçasının bir multiprotein kompleksi olan γ-sekretaz enzimi tarafından kesilmesi sonucu Aβ1-42 meydana gelir [5]. Aβ1-42 peptidleri, C-terminal ucu ile bu bölgede fazladan bulundurduğu iki aminoasitten dolayı diğer Aβ türlerinden farklıdırlar ve uygun çevresel koşullarda hidrofobik etkileşimler aracılığıyla kendiliğinden monomer haldeki alfa heliks protein konformasyonunu değiştirerek beta tabakalar halinde bir araya gelme eğilimdedir [5].

AH'de, hücrede kalsiyum homeostazının bozulması, sinaps yıkımı ve sinapslar arası bağlantı kaybı, ROS artması, oksidatif hasar ve enerji metabolizmasında bozukluklar, hücre membran yapısının bozulması gibi etmenler, Aβ1-42 tarafından doğrudan ya da dolaylı olarak tetiklendiği düşünülen nörodejenerasyon sürecinde meydana gelen bozukluklardan bazılarıdır. AH'de görülen nöron kaybı, hücrede gerçekleşen aşamalı fonsksiyon bozukluklarının bir sonucudur [4, 11].

Aβ1- 42'nin; AH'nin patolojisine katkıda bulunan birçok toksik özelliğine ek olarak sinaptik aktivite, nöron sağ kalımı, iyon kanallarının oluşumu, metal kaynaklı oksidasyona karşı koruma, kolesterol taşınımının düzenlemesi, kinaz aktivasyonu gibi patolojik olmayan koşullardaki bazı fonksiyonları bilinse de bu görevler henüz yeterince anlaşılamamıştır [13]. Bununla birlikte, sıklıkla ekstraselüler alana salınan ve burada biriken Aβ1-42 hücre içine alınabildiği gibi hücrede endoplazmik retikulum-Golgi aracılığıyla da üretilebildiği ileri sürülmektedir [25, 33]. Dolayısıyla bu bilgi, fizyolojik koşullarda hücre içinde doğal olarak bulunan Aβ1-42'nin hücre içi aktivitelerinin anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır.

Sıklıkla nörodejenerasyon ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen mitokondri; hücrede ATP üretimi, hücre içi Ca^{+2} homeostazı, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ve apoptoz dahil birçok hücre fonksiyonunda merkezi bir rol oynayan temel organeldir [43]. Antik simbiyotik öbakterilerin kökenini yansıtan mitokondriler, kendilerine ait işlevsel olarak yetkin, dairesel çift sarmallı DNA'larının çoklu kopyalarını içerirler. İnsan mtDNA'sı 16,5kb uzunluğunda, mitokondriyal protein sentezi için gerekli 12S rRNA ve 16S rRNA'yı; 22 tRNA'yı ve enerji üretiminin gerçekleştiği OXPHOS'un 13 polipeptit bileşenini kodlayan genleri içerir. Tüm mitokondriyal fonksiyonlar, doğrudan veya dolaylı olarak OXPHOS ile bağlantılıdır [43]. Bu nedenle, mitokondriyal transkripsiyon ve replikasyon mtDNA kodlu OXPHOS alt birimlerinin ekspresyonu mitokondrial fonksiyon için önemlidir.

Mitokondrial transkripsiyon nükleer DNA'dan kodlanan mitokondriye spesfik transkripsiyon faktörleri TFAM, TFB2M, polimeraz enzimi POLRMT, uzama faktörü TEFM tarafından yürütülmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar geleneksel görüşün aksine nükleer DNA'yı kontrol eden tranksirpsiyon faktörlerinin de mitokondriyal transkripsiyon düzenlenmesine katıldığını göstermiştir [42]. Nükleer TF'ler, mtDNA'ya direkt olarak bağlanarak gen ekspresyonunu etkileyebilmektedirler. mtDNA'ya özellikle D-Loop bölgesine bağlanan ve gen ekspresyon düzenlenmesine katkıda bulunan önemli TF'lere tiroid hormon reseptörü, östrojen reseptörü, c-Jun, JunD ve CEBP, GR örnek gösterilebilir [42, 51]. Ayrıca bazı nükleer transkripsiyon faktörlerinin mitokondriyal genomda D-Loop dışında da bağlanma bölgelerinin olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte Stat3'ün aralarında olduğu bazı TF'lerin TFAM aracılığıyla da gen ekpresyon düzenlenmesine katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür.

Memeli hücrelerinde mitokondriyal transkripsiyonu anlamada kayda değer ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, mtDNA transkripsiyonu üzerine öncü çalışmalardan bu yana 40 yıldan fazla bir süredir, bugün bile birçok aydınlatılamamış nokta mevcuttur[42].

AH'de görülen mitokondriyal bozukluklara; anormal mitokondrial dinamikleri, çoğunlukla fisyon-fizyon dengesindeki bozulmaya bağlı olarak gerçekleşen uzamış-sosis şeklindeki mitokondriler, şişmiş-genişlemiş mitokondriler, parçalanmış mitokondriler, parçalanmış krista yapısı, mitokondrial enzim aktivitelerindeki düşüş, artan ROS seviyesi ile gerçekleşen oksidatif stres, mtDNA kopya sayısındaki değişimler örnek verilebilir[60].

Hücrede artan Aβ1-42 oligomerlerinin; AH için bilinen önemli risk faktörü olan mitokondride, yaşlanma sürecinde birikmiş hasara neden olup AH'nin klinik başlangıcından, amiloid plaklarının görülmesinden önce nöronal fonksiyon bozukluğunu indüklediği düşünülmektedir. Bu görüşü destekleyen çalışmaların birinde AH modeli oluşturulmuş transgenik farelerin sinaptik mitokondrilerinde, plak oluşumu gözlenmeden önce erken ortaya çıkan mitokondriyal hasar ile birlikte sinaptik iletimde aksamalar kaydedilmiştir [87]. Öte yandan Aβ -mitokondri ilişkisinin ileri kademeye taşınmasındaki önemli gelişmeler, AH hastalarının postortem beyin dokularında ve transgenik fare modellerinin beyin doku mitokondrilerinde Aβ1-42 lokalizasyonu ve agregeasyonu gösterilmesi ile başlamıştır [68]. Bununla birlikte Aβ1-42, APP ve APOE'nin de nöronal mitokondriyal membranlarda biriktikleri, OXPHOS proteinlerine doğrudan bağlanarak veya dolaylı mekanizmalarla mitokondrilerde enerji üretimini bozdukları da ileri sürülmektedir [12]. Aβ1-42'nin mitokondride Drp1, siklofilin D (CypD), sitokrom c oksidaz, VDAC,gibi proteinlerle etkileştiği bildirilmiştir [77]. Ayrıca AH hastalarının ve transgenik farelerin mitokdondrilerinde Aβ1-42'nin mitokondriyal bir martiks proteini olan ABAD enzimiyle doğrudan etkileşime girdiğini ve bu etkileşimin ROS sızıntısına yol açtığı gösterilmiştir [68]. Aβ1-42'nin mitokondride lokalize olduğu gösterilse de mitokondrideki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Aβ1-42'nin mitokondrideki bilinen etkileri, mitokondri membranı üzerindeki geçiş gözeneklerinin genişlemesi, mitokondrial enerji homeostazının bozulması, Ca^{+2} giriş çıkışında düzensizliklere neden olması, mitokondriyal enzimlerin aktivitelerinin azalması olarak özetlenebilir.

Yukarıda da anlatıldığı gibi Aβ1-42'nin mitokondrideki etkileri enerji metabolizmasında görev alan enzimlerin aktivite kaybı veya mitokondride ROS

aktivitesinin artışıyla gerçekleşen hasarlara bağlı olarak açıklanmaya çalışılmıştır. Ancak sağlıklı bir nöron hücresinde küçük fonsiyon bozukluklarıyla başlayan ve hücre ölümüyle sonuçlanan aşamalı nörodejenerasyon süreci göz önüne alındığında, gen ekspresyonundaki değişimlerin öneminin göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz. Gen ekspresyondaki ufak çaplı değişiklikler bir süre sonra hücrede proein seviyesinde makro değişimlere yol açmaktadır. Bize göre mitokondride meydena gelen ve hücre genelini etkileyen enerji metabolizmasındaki bu değişimler mtDNA'dan kodlanan genlerin ekspresyon değişimlerini de içerebilir. Bundan dolayı mitokondriyal fonksiyonların değişiminde AH'de meydana gelen mitokondriyal gen ekspresyon değişiklikleri önemli yer tutmaktadır. Öte yandan bu ekspresyon değişimine neyin neden olduğu da aydınlatılması gereken önemli bir noktadır. Bununla birlikte bizi AH'de mtDNA gen ekspersyon değişimlerini ve bunun nedenini sorgulamaya yönlendiren bir başka önemli sebep Aβ1-42 ile birçok ortak noktası bulunan a-syn proteininin neden olduğu PH hastalarının lökositlerinden elde ettiğimiz son verilerdir. Çalışmamızda PH hastalarının lökositlerinde mtDNA tarafından kodlanan genlerden MT-ND4, MT-ND5 ve MT-ND6, MT-CYB, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-ATP6 ve MT-ATP8'in ekspresyonlarının yaş uyumlu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir [44]. Ayrıca elde ettiğimiz veriler, hastaları kendi aralarında aile hikayelerinden ve kontrol grubundan ayıran net bir transkripsiyon profili ortaya koymuştur.

Literatürde AH - mtDNA gen ekspresyonu ilişkisini ele alan çalışmalara baktığımızda önemli bir çalışma, erken AH semptomu gösteren hastalardan ve AH hastalarından alınan postmortem beyin dokularında OXPHOS'tan sorumlu mitokondriyal genlerin mRNA ekspresyon değişimlerini araştırmıştır[88]. Çalışma sonucu, her iki hasta grubu örneklerinde de OXPHOS kompleksI 'deki mitokondriyal genlerin ekpsresyonunun azaldığını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, mRNA seviyesindeki bu azalmanın incelenen tüm diğer alt birimlere kıyasla kompleks I için daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Kompleks I'deki genlerin aksine, kompleks III ve IV, hem erken AH hem de AH hastalarının beyin örneklerinde artan mRNA ekspresyonları göstermiş ve bu durum AH'li beyinlerde enerji üretimine büyük bir talep olduğunu düşündürmüştür [88]. Aynı grubun Aβ1-42 üretiminin artamasına neden olan APP transgenik fare modelinde yaptıkları çalışma sonucu ise Aβ1-42 plak oluşumu gözlenmeden önce genç farelerin mitokondrilerinde sitokorom oksidaz aktivitesinde azalma ile bazı mitokondrial genlerin ekspresyonunda

artış görülmüştür [68]. Bu bulgu mitokondrial değişikliklerin AH'de erken bir özellik olarak ortaya çıktığını da desteklemektedir.

AH'de enereji metabolizması dışında mtDNA gen ekspresyonuna dikkat çeken bir diğer önemli çalışmada, grubumuzun PH'deki çalışmasına benzer bir incelemeyi Lunnon ve ark. 2017'de MCI ve AH hastalarının lökosit örneklerinden gerçekleştirmiştir [72]. Çalışmada nükleer genomdan kodlanan OXPHOS genlerinin ekspresyonunda düşüş gözlenirken ilginç bir şekilde mtDNA'dan kodlanan OXPHOS genlerinden özellikle mitokondrial transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın olan genlerin ekspresyonunda artış kaydedilmiştir [72]. Mitokondriyal kodlu OXPHOS genlerinden, mtDNA ağır zincirinden kodlanan MT-ND1, MT-ND2, MT-ATP6, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3 ve hafif zincirden kodlanan MT-ND6 ekspresyonlarında bir artış gösterilmiştir [72]. Çalışmada bu artışın mitokondrideki mtDNA seviyesinde artış ile ilgili olabileceği ihtimaline karşı mtDNA kopya sayısına bakılmış ancak grubumuzun da PH hastalarından elde ettiği verilere benzer şekilde mtDNA kopya sayısında kontrollere göre anlamlı bir artış görülmemiştir. Dolayısıyla mtDNA kodlu genlerdeki bu ekspresyon değişimine spesfik olarak neyin sebep olduğu hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Sınırlı sayıdaki literatür bilgisi ile çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bu bilgiler; mitokondride lokalizasyonu gösterilmiş Aβ1-42'nin mitokondriyal transkripsiyonel düzenlenmede bir rolünün olup olamayacağı sorusunu sormamıza neden olmuştur.

Öte yandan son yıllarda yapılan araştırmalar ile çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular, Aβ1-42'nin yeni bir özelliğine dikkat çekmekle birlikte peptidin tahmin edilenden çok daha önemli görevleri olabileceğini bir kez daha vurgulamıştır. Grubumuz, primer kortikal nöron kültüründe, kültür medyumunda antibiyotik bulunmadığı koşulda hücredeki Aβ1-42'nin büyük bir kısmının sitoplazmada lokalize olduğunu bununla birlikte antibiyotik varlığında nukleusa göç ettiğini literatürde ilk defa göstermiştir [29]. Ayrıca kültür ortamındaki antibiyotik dozunun artması Aβ1-42'nin sitoplazmadan nukleusa göçünü de artmıştır [29]. Bu durum bize Aβ1-42'nin antibiyotik gibi çevresel bir etmene cevap olarak transkripsiyonel düzenlenmede görev alabileceğini düşündürmüştür. Literatürdeki konuyla ilgili çalışmalara bakıldığında Aβ1-42'nin nükleer lokalizasyonu gösterilmiş ve peptidin özellikle ısı veya oksitadif stres altındaki nükleer transportunun Aβ ile ilişkili AβDIP proteini aracılıyla gerçekleşebileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte Aβ1-42 peptidinin nükleer membran porlarından rahatlıkla geçebilecek büyüklükte olduğu da ileri sürülmüştür [25, 28]. Aβ1-42'nin

nükleer lokalizasyonun gösterilmesi burada gen ekspresyon düzenlenmesine etki edebileceğini düşündürmüştür. Konuyla ilgili literatürdeki ilk çalışmalardan biri hücre içindeki Aβ1-42'nin apoptoz ilişkili TF olarak bilinen p53'ün ekspresyonunda bir artış sağladığını ve Aβ1-42'nin TP53 geninin promotor bölgesinde bulunan bir ''GGATTGGGGT'' ısı şok elemanı dizisine bağlanarak doğrudan bu artışa etki ettiği bildirilmiştir [26]. Önemli bir çalışmada Maloney ve Lahiri 2011'de, Aβ1-42'nin; AH ile ilişkili APP, BACE1 VE APOE4 genlerinin promotor bölgelerindeki TP53'ün promotor dizisine benzer diziler ile etkileşime girdiğini göstermiş ve Aβ1-42'nın bir transkripsiyon faktörü olarak muhtemel bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir [28]. Aynı grubun ChIP ve EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) analizlerinden elde ettikleri bulgular, Aβ1-42'nin geri besleme mekanizması ile kendi üretimini düzenleyerek AH'de amiloidogenezi destekleyebileceğini ya da amiloidogeneze yol açabileceğini göstermektedir [89]. Diğer taraftan grubumuz; primer nöron kültüründe yapılan Aβ1-42 peptid uygulamalarına cevaben Aβ1-42 üretiminde rol oynayan genler: APP, BACE1, ADAM10, PS1, PS2, APOE, TREM2, Nicastrin; tau yolağıyıyla ilişkili genler Tau, Gsk3α, Gsk3β,Cdk5; AH'de nörodejenrasyonda görev alan bazı NMDAR genleri, PKCZeta ile kolekalsiferol yolağında görev alan 1-alfa-hidroksilaz geni dahil toplam 20 genin ekspresyon değişimlerini araştırmıştır. Söz konusu yolaklarda görev alan 20 genden 12'sinde ekspresyon değişimi kaydedilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar Aβ1-42'nin amiloidogeneze katkıda bulanabileceği görüşünü destekler niteliktedir [25]. Öte yandan, başka bir önemli çalışma ChIP yöntemi ile Aβ1-42'nin genomda düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü-ilişkili protein 1 (LRP1) ve indüklenebilir membran proteini R2 (KAI1) genlerinin promotor bölgelerine bağlanarak gen ekspresyonunu azalttığı kaydedilmiştir [33]. Aβ1-42'nin söz konusu DNA'ya bağlanma işlevini ise N-terminal bölgesi aracılığıyla gerçekleştirebildiği yakın zamanda bildirilmiştir[90].

Yukarıda da detaylıca anlatıldığı üzere nukleusta lokalizasyonu gösterilen Aβ1-42'nin nükleer genomda bazı genlerin promotor bölgelerine bağlandığı ve bu genlerde ekspresyon değişimine neden olduğu bilinmektedir. Öte yandan Aβ1-42'nin mitokondrilerde lokalize olup birçok mitokondriyal proteinle etkileşimleri bilinmesine rağmen mitokondrideki görevleri hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Tüm bu bilgiler ışığında transkripsiyon faktörü gibi çalışabildiği gösterilen Aβ1-42'nin mtDNA'ya da bağlanma potansiyeli olduğunu ve mitokondrial gen ekspresyonuna direkt olarak etki edebileceğini düşündük. Mitokondriyal transkripsiyonel düzenlemeye baktığımızda,

yukarıda da özetlendiği gibi nükleer genomda transktripsiyon faktrölerinin mtDNA'da da bu şekilde görev yapabildiğini biliyoruz. Hipotezimize göre Aβ1-42'nin de benzer şekilde etki etme ihtimali bulunmaktadır.

Bu amaçla ilk olarak Aβ1-42'nin fizyolojik koşullarda SHSY-5Y hücrelerinin mitokondrilerinde lokalize olup olmadığını sorguladık. Mitotracker ile mitokondri boyaması ve Aβ1-42'nin immunfloresan işaretlemesini gerçekleştirdik. Sonuçlarımız hücrede fizyolojik koşullarda bulunan endojen Aβ1-42 peptidlerin mitokondride lokalize olabildiğini göstermektedir. Bu bulgu Aβ1-42'nin yalnızca patolojik koşullarda değil normal hücre fonksiyonlarında da mikondiriye etki edebileceğini işaret etmektedir. Sonraki adımımız mitokondri ile kolakolize olan Aβ1-42'nin mtDNA ile etkileşip etkileşmediğini yine immunfloresan temellere dayanan DNA-protein etkileşimlerini incelememize olanak veren BrdU tekniğiyle araştırmak olmuştur. DNA replikasyonu sırasında Timin yerine geçen BrdU primer antikoru ile işaretlenerek mtDNA'yı görünür kıldık, ardından Aβ1-42 için immunfloresan işaretleme gerçekleştirdik. Sonuçlarımızda düşük bir sinyalle de olsa bir Aβ1-42-mtDNA kolokalizasyonu saptanmıştır. Bu bulguları ileri bir teknikle doğrulayabilmek üzere, TF'lerin bağlanma bölgelerinin saptanmasında kullanılan in vivo protein-DNA etkileşimlerini incelememizi sağlayan ChIP-qPCR yöntemini kullandık. Çalışmamızda örneklerimizdeki olası nükleer DNA kontaminasyonunu engellemek için öncelikle mitokondri izolasyonu gerçekleştirdik. Mikrokokal nükleaz enzimiyle kesimi sağlanan mitoondrial DNA parçaları anti Aβ1-42 antikoru, anti TFAM antikoru ve negatif kontrol olarak normal tavşan IgG'si ile inkube edildi. Presipitasyon sonrası saflaştırılan DNA parçaları, mitokondriyal gen ekspresyonun kontrol bölgesi olarak bilinen mtDNA D-Loop bölgesine spesifik 8 primer çifti kullanılarak PCR tekniği ile analiz edildi.

Deney sonucunda pozitif kontrol olarak kullandığımız ve dizi bağımsız olarak da mtDNA'ya bağlanabilen TFAM ile gerçekleştirilen ChIP-qPCR sonucu, çoğalttığımız bütün bölgelerden bağlanmayı temsil eden net bir sinyal alınmıştr. Bu durum deney protokolünün işlediğini de göstermektedir. Ancak Aβ1-42 antikoru ile çöktürdüğümüz DNA örneklerinden elde edilen sinyaller negatif kontrol IgG sinyallerine göre anlamlı bir fark göstermemiştir. Bu durumda çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler Aβ1-42'nin mtDNA D-Loop bölgesine bağlanamadığı yönündedir. Öte yandan nükleer genomda bir genin ekzon bölgesinin bazen başka bir komşu genin kontrol bölgelerinden (enhancer dizi gibi) biri olabileceği bilgisini göz önünde bulundurusak bu mtDNA için de geçerli

olabilir. mtDNA transkripsiyonel düzenleyici elementler, kodlama yapmayan D-Loop bölgesiyle sınırlı değildir ve genler içinde de yer alabilir. Evrimsel süreçte meydana gelen insersiyon, delesyon ve inversiyon gibi kapsamlı mtDNA yeniden düzenlemeleri, bu tür öğelerin yerini değiştirebilir ve transkripsiyonu etkileyebildiği ileri sürülmüştür[42]. Örneğin yapılan bir çalışma ilginç bir şekilde MEFD2 faktörünün mtDNA D-Loop bölgesi dışında hafif zincirde MT-ND6 genine bağlandığını göstermiştir. Aynı durumun Aβ1-42 için de geçerli olma ihtimali vardır. Bu durum mtDNA genomonu kapsayan bir ChIP analizini gerektirmektedir. Tez kapsamında yer almamakla birlikte, çalışmamız diğer bölgeleri de içerecek şekilde devam etmektedir.

Mitokondriyal transkripsiyon faktörü TFAM, mitokondrial genomda mtDNA paketlenmesinin, mtDNA stabilizasyonunun ve replikasyonun düzenlenmesinde işlev görür. TFAM, mtDNA'ya hem diziye özgü hem de diziye özgül olmayan şekilde bağlanabilir. TFAM'ın mtDNA'da promoter bölgelerine sekansa özgü bağlanması, mitokondriyal transkrpisiyon kompleksini oluşturmasının dışında aynı zamanda replikasyonun başlatılması için RNA-primeri olarak görev alabilen transkriptlerin üretilmesi için de gereklidir [47]. Ek olarak, TFAM'ın genomu paketlemek için mtDNA'ya bağlanması ise dizi spesifikliğinden bağımsız bir şekilde gerçekleşir. Her iki mtDNA-TFAM bağlanma şekli de TFAM'ın mtDNA kopya sayısı üzerindeki etkisine katkıda bulunabilir [91]. Ayrıca çok sayıda moleküler ve genetik model, TFAM ve mtDNA seviyeleri arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu göstermiştir. TFAM'nin heterozigot mutasyonu, in vivo mtDNA kopya sayısında ~% 40 azalma ile sonuçlanırken, homozigot mutasyonunun ise embriyonik olarak ölümcül olduğu bildirilmiştir [91].

Birçok nörodejeneratif hastalıkta olduğu gibi çoğu çalışmada da AH'de mtDNA kopya sayısının azaldığı gösterilmektedir. TFAM'ın mtDNA kopya sayısıyla ilişkili olabileceğini göz önünde bulundurusak, TFAM nörodejenerasyon ilişkili potansiyel mekanizmalarda görev alabilir. AH modeli oluşturulup, TFAM aşırı ekpresyonu sağlandığında, TFAM'ın yaşlanmaya bağlı işitme kaybı ile hafıza kaybına karşı önleyici bir etkisi olduğu gösterilmiştir [91]. Bu yeni sonuçlar, TFAM'ın çeşitli patolojik durumlarda koruyucu bir role sahip olabileceğini göstermiş, ancak altta yatan net mekanizmalar tanımlanamamıştır.

AH'de TFAM eskpresyonuna protein seviyesi açısından bakılmış olup AH hastalarının kontrol grubuna göre ortalama ~% 43'lük bir düşüş gösterdiği bildirilmiştir [91]. Aynı hasta örneklerindeki TFAM ve mtDNA seviyelerini inceleyen sınırlı sayıdaki

çalışmalardan biri mtDNA kopya sayısındaki azalmanın TFAM protein seviyesindeki azalmayla parallel olduğunu göstermiştir. Literatürden elde edilen genel bakış mtDNA ve TFAM içeriğinin ve ilişkisinin nöropatogenez ile bağlantılı olduğu hipotezini güçlendirmektedir.

Literatürde AH ile TFAM arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların çoğu AH hastalarında TFAM'ın protein seviyeisindeki değişimlerine ya da mtDNA kopya sayısındaki farklılıklara odaklanmıştır. Tek bir çalışmada SH-SY5Y hücrelerinde 1 μM Aβ1-42 uygulaması sonrasında mtDNA kopya sayısında artış olduğu kaydedilmiştir [92]. İlginç olarak bu durum postmortem hasta beyinleriyle ya da kan örnekleriyle yapılan çalışmalardan farklı bir sonuçtur. Ancak çalışmada TFAM ekspresyonu ile ilgili bir parametre çalışılmamakla birlikte, TFAM'ın Aβ1-42'nin uygulanması sonrası mtDNA bağlanma potansiyeli hakkında da bir bilgi yoktur. Çalışmada uygulanan Aβ1-42 miktarının subletal seviyede olduğu düşünüldüğünde Aβ1-42'nin plak oluşumundan da önce mtDNA'nın seviyesini belki de bir koruma mekanizması olarak artırdığını düşündürmektedir ve mitokondrial değişikliklerin AH'de erken bir özellik olarak ortaya çıktığını desteklemektedir. TFAM'ın yaşlanma sürecinde ve/veya hücrede herhangi bir etmenden kaynaklanan oksidatif strese karşı mtDNA'ya daha çok bağlandığı bilinmektedir. Bu bağlanma artışı TFAM'ın mtDNA'yı koruma mekanizmasıdır. Dolayısıyla bu durum AH modellerinde ya da AH'nın klinik başlangıcından önce de meydana geliyor olabilir. Bununla birlikte literatürde AH hastalarında ya da hastalık modellerinde TFAM'ın mtDNA bağlanmasının değişip değişmediği ile iligli bir çalışmaya rastalanmamıştır.

Tüm bu bilgiler bize Aβ1-42'nin TFAM'ın mtDNA bağlanma kapasitesi üzerinde bir etkisi olabileceğini düşündürmüştür. mtDNA D-Loop bölgesine TFAM bağlanmasının mtDNA transkripsiyonu için birincil önem taşıdığını düşündüğümüzde, Aβ1-42'nin bu bağlanma üzerinde olası bir etksi varsa, bu durum transkripsiyonel düzenlenmenin yanında dolaylı olarak mtDNA replikasyonunu da etkiliyor olabilir. Bunların dışında hücrede belirli dozlarda Aβ1-42 uygulamalarının TFAM'ın mitokondriyal genomu korumak amacıyla mtDNA'ya olan bağlanmasını arttırıcı yönde bir etkisi de olabilir. Tüm bu olasılıkları araştırmak amacıyla Aβ1-42 uygulması yaptığımız gruplarda mtDNA D-Loop bölgesindeki TFAM konsantrasyonu/bağlanmasının değişip değişmediğini inceledik. Çalışmamızda farklılştırılmamış SHSY5Y hücrelerine 5 μM ve 0,1 μM Aβ1-42 uygulaması yaptığımız

gruplarda anti TFAM antikoru ile ChIP deneyi gerçekleştirdik. Çalışmamız sonucunda 0,1 μM Aβ1-42 uygulaması yapılan gruptan elde edilen TFAM bağlanma sinyalinin D-loop üzerinde hedeflenen (Primer 1-8 ile çoğaltılan) bütün bölgelerde (D-loop boyunca) diğer gruplara göre anlamlı derecede düştüğü saptanmıştır. Bununla birlikte 5 μM uygulama sonucu TFAM ChIP bağlanma sinyallerinin D-loop üzerinde promotor bölgelerinin yukarısında yer alan bir kontrol bölgesi ile fenilalanin ve 12srRNA genlerinin bir kısmını kapsayan kodlayıcı bölgede istatistiksel olarak önemli derecede arttığı görülmüştür. Hedeflediğimiz diğer bölgelerden alınan sinyaller ise bazal seviyede seyretmiştir.

0,1 μM Aβ1-42 uygulaması TFAM'ın mtDNA bağlanması üzerinde azaltıcı etki göstermesi mitokondriyal gen ekspresyonu ve dolaylı olarak replikasyonu etkiliyor olabilir. TFAM'ın D-loop bölgesinde görülen bağlanma derecesindeki bu düşüş, mtDNA transkripsiyonunu da azaltabilir, bu önerme tez kapsamında olmayıp sonraki çalışmalarımızla araştırılacaktır. Ayrıca 0,1 μM Aβ1-42 uygulamasıyla görülen TFAM bağlanma derecesindeki bu düşüşün mtDNA genelini de etkileyebilme ihtimali vardır. Böyle bir durum mtDNA stabilitesini etkileyerek mtDNA'nın daha korumasız hale gelmesine neden olabilir. Diğer taraftan 0,1 μM Aβ1-42 doğrudan TFAM'ın eskpresyonunun azalmasına neden oluyor olabilir ve bu durum transkripsiyonel düzenlenmede değişikliklere dolaylı olarak da mtDNA kopya sayısında azalmaya yol açıyor olabilir. Öte yandan toksik doza yakın bir konsantrasyon olan 5 μM uygulama sonucu TFAM 'ın HSP ve LSP 'nin yukarısında bulunan bir kontrol bölgesinde bağlanma sinyalinin artması, mtDNA'yı transkripsiyonel düzenlenmeyi artırıcı yönde etkileyebilir. Ancak bunun da mtDNA gen ekspresyon seviyesine bakılarak test edilmesi gerekmektedir.

Mitokondri fonksiyon bozukluklarının yaklaşık 30 yıldır AH ile ilişkisi çalışılmaktadır [72]. Ancak mitokondrinin AH patolojinde nasıl görev aldığı, hastalığın başlangıcını tetikleyen bir neden mi ya da hastalığın bir sonucu mu olduğu halen tartışılmaktadır. Mitokondrial fonksiyonlardaki hasarların AH'de plak oluşumu gözlenmeden önce erken ortaya çıkan bir özellik olduğu birçok araştırıcı tarafından kabul görmektedir. Öte yandan AH patolojisinin major bileşeni olan Aβ1-42'nin mitokondride lokalizasyonu gösterilmiştir. Bununla birlikte yapılan çalışmaların çoğu Aβ1-42'nin mitokondrial enzimlerin aktivitesini nasıl etkilediği üzerine odaklanmıştır. Literatürdeki kısıtılı çalışma AH'de mtDNA gen ekspresyon değişimlerine yer vermiştir. Bu

ekspresyon değişimlerinin Aβ1-42'nin direkt etkisinden kaynaklı olup olmadığı şimdiye kadar araştırılmamıştır. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, Aβ1-42'nin mtDNA D-Loop bölgesine olası bağlanma potansiyeli ile TFAM-mtDNA bağlanmasında Aβ1-42'nin etkisini araştıran ilk çalışma olma niteliğindedir.

Yukarıda da özetlendiği gibi mitokondride lokalizasyonu gösterilen Aβ1-42'nin mitokondrideki görevleri hakkında bilgilerimiz sınırlıdır. Çalışmamızda Aβ1-42'nin mitokondirdeki olası fonksiyonlarından biri incelenmiştir. Bununla birllikte normal koşullarda mitokondri ile kololakizasyonunu gösterdiğimiz Aβ1-42'nin burada tesadüfi olarak bulunmadığı aşikardır. Aβ1-42'nin mitokondride ne yaptığını, hangi reaksiyonlarda görev aldığını tam olarak anlamamız için mutlaka geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ancak çalışmamızın Aβ1-42-mitokondri arasındaki ilşkiyi ve mitokondrial değişikliklerin AH'deki yerini daha iyi anlamamız için önemli bir adım olduğu görüşündeyiz. Öte yandan çalışmamızın AH'de Aβ1-42'yi tamamen yok etmeyi hedefleyen terapötik yaklaşımlara ve AH ilerlemesinin geciktirilmesinde mitokondri hedefli terapötik müdahalelere yeni bir bakış açısı kazandıracağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Lane, C.A., J. Hardy, and J.M. Schott, *Alzheimer's disease.* Eur J Neurol, 2018. **25**(1): p. 59-70.
2. Dursun, E. and D. Gezen-Ak, *Vitamin D basis of Alzheimer's disease: from genetics to biomarkers.* Hormones, 2019. **18**(1): p. 7-15.
3. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.* Science, 1992. **256**(5054): p. 184-186.
4. Kumar, A. and A. Singh, *A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update.* Pharmacological reports, 2015. **67**(2): p. 195-203.
5. Masters, C.L., et al., *Alzheimer's disease.* Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15056.
6. Hardy, J., *A hundred years of Alzheimer's disease research.* Neuron, 2006. **52**(1): p. 3-13.
7. Šerý, O., et al., *Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review.* Folia Neuropathol, 2013. **51**(1): p. 1-9.
8. Rajendran, L., et al., *Increased Aβ production leads to intracellular accumulation of Aβ in flotillin-1-positive endosomes.* Neurodegenerative diseases, 2007. **4**(2-3): p. 164-170.
9. Langui, D., et al., *Subcellular topography of neuronal Aβ peptide in APPxPS1 transgenic mice.* The American journal of pathology, 2004. **165**(5): p. 1465-1477.
10. Friedrich, R.P., et al., *Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Aβ pathogenicity.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(5): p. 1942-1947.
11. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* science, 2002. **297**(5580): p. 353-356.
12. Wang, J., et al., *A systemic view of Alzheimer disease—insights from amyloid-β metabolism beyond the brain.* Nature reviews neurology, 2017. **13**(10): p. 612.
13. Cárdenas-Aguayo, M.d.C., et al., *Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity.[Internet]. Rijeka: InTech (Croatia); 2014; 46296, Chapter 9, Neurochemistry; Thomas Heinbockel (ed).[cited 2015 Nov 2]*.
14. Qiu, T., et al., *Abeta42 and Abeta40: similarities and differences.* J Pept Sci, 2015. **21**(7): p. 522-9.
15. Spies, P.E., et al., *Reviewing reasons for the decreased CSF Abeta42 concentration in Alzheimer disease.* Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 2024-34.
16. Jeong, S., *Molecular and cellular basis of neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Molecules and cells, 2017. **40**(9): p. 613.
17. Herreman, A., et al., *Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(7): p. 461-2.
18. Wang, J., et al., *A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-beta metabolism beyond the brain.* Nat Rev Neurol, 2017. **13**(10): p. 612-623.
19. Hutton, M., et al., *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17.* Nature, 1998. **393**(6686): p. 702-705.
20. Lewis, J., et al., *Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein.* Nature genetics, 2000. **25**(4): p. 402-405.

21. Kumar-Singh, S., et al., *Mean age-of-onset of familial alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40.* Hum Mutat, 2006. **27**(7): p. 686-95.
22. Gage, F.H., J. Ray, and L.J. Fisher, *Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS.* Annu Rev Neurosci, 1995. **18**: p. 159-92.
23. Buckig, A., et al., *Cytosolic and nuclear aggregation of the amyloid beta-peptide following its expression in the endoplasmic reticulum.* Histochem Cell Biol, 2002. **118**(5): p. 353-60.
24. Ohyagi, Y., *Intracellular amyloid beta-protein as a therapeutic target for treating Alzheimer's disease.* Curr Alzheimer Res, 2008. **5**(6): p. 555-61.
25. Gezen-Ak, D., et al., *The transcriptional regulatory properties of amyloid beta 1–42 may include regulation of genes related to neurodegeneration.* Neuromolecular medicine, 2018. **20**(3): p. 363-375.
26. Ohyagi, Y., et al., *Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease.* FASEB J, 2005. **19**(2): p. 255-7.
27. Uchida, Y., et al., *Differential regulation of basic helix-loop-helix factors Mash1 and Olig2 by beta-amyloid accelerates both differentiation and death of cultured neural stem/progenitor cells.* J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 19700-9.
28. Maloney, B. and D.K. Lahiri, *The Alzheimer's amyloid beta-peptide (Abeta) binds a specific DNA Abeta-interacting domain (AbetaID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: characterizing a new regulatory motif.* Gene, 2011. **488**(1-2): p. 1-12.
29. Gezen-Ak, D., et al., *Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1-42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3.* ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(10): p. 2335-2346.
30. Dursun, E., D. Gezen-Ak, and S. Yilmazer, *A new mechanism for amyloid-beta induction of iNOS: vitamin D-VDR pathway disruption.* J Alzheimers Dis, 2013. **36**(3): p. 459-74.
31. Dursun, E., D. Gezen-Ak, and S. Yilmazer, *Beta amyloid suppresses the expression of the vitamin d receptor gene and induces the expression of the vitamin d catabolic enzyme gene in hippocampal neurons.* Dement Geriatr Cogn Disord, 2013. **36**(1-2): p. 76-86.
32. Dursun, E., D. Gezen-Ak, and S. Yilmazer, *A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid-beta and preventing the amyloid-beta induced alterations by vitamin D in cortical neurons.* J Alzheimers Dis, 2011. **23**(2): p. 207-19.
33. Barucker, C., et al., *Nuclear translocation uncovers the amyloid peptide Aβ42 as a regulator of gene transcription.* Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(29): p. 20182-20191.
34. Barucker, C., et al., *Alzheimer amyloid peptide Aβ 42 regulates gene expression of transcription and growth factors.* Journal of Alzheimer's disease, 2015. **44**(2): p. 613-624.
35. Arun, S., L. Liu, and G. Donmez, *Mitochondrial biology and neurological diseases.* Current neuropharmacology, 2016. **14**(2): p. 143-154.
36. Gray, M.W., *Mitochondrial evolution.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a011403.
37. Reddy, P.H., *Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease.* CNS spectrums, 2009. **14**(S7): p. 8-13.

38. Reddy, P.H., *Mitochondrial dysfunction in aging and Alzheimer's disease: strategies to protect neurons.* Antioxidants & redox signaling, 2007. **9**(10): p. 1647-1658.
39. Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, *Mitochondrial fission, fusion, and stress.* Science, 2012. **337**(6098): p. 1062-5.
40. L'Abbe, D., et al., *The transcription of DNA in chicken mitochondria initiates from one major bidirectional promoter.* J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 10844-50.
41. Nicholls, T.J. and M. Minczuk, *In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA.* Experimental gerontology, 2014. **56**: p. 175-181.
42. Barshad, G., et al., *Mitochondrial DNA transcription and its regulation: an evolutionary perspective.* Trends in Genetics, 2018. **34**(9): p. 682-692.
43. Pinto, M. and C.T. Moraes, *Mitochondrial genome changes and neurodegenerative diseases.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2014. **1842**(8): p. 1198-1207.
44. Gezen-Ak, D., et al., *Altered Transcriptional Profile of Mitochondrial DNA-Encoded OXPHOS Subunits, Mitochondria Quality Control Genes, and Intracellular ATP Levels in Blood Samples of Patients with Parkinson's Disease.* J Alzheimers Dis, 2020. **74**(1): p. 287-307.
45. Lu, B., et al., *Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance.* Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(24): p. 17363-17374.
46. Sbisà, E., et al., *Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications.* Gene, 1998. **205**(1): p. 125-140.
47. Shokolenko, I.N. and M.F. Alexeyev, *Mitochondrial transcription in mammalian cells.* Front Biosci (Landmark Ed), 2017. **22**: p. 835-853.
48. Alam, T.I., et al., *Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM.* Nucleic acids research, 2003. **31**(6): p. 1640-1645.
49. Chimienti, G., et al., *Increased TFAM binding to mtDNA damage hot spots is associated with mtDNA loss in aged rat heart.* Free Radical Biology and Medicine, 2018. **124**: p. 447-453.
50. Larsson, N.G., et al., *Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice.* Nat Genet, 1998. **18**(3): p. 231-6.
51. Leigh-Brown, S., J.A. Enriquez, and D.T. Odom, *Nuclear transcription factors in mammalian mitochondria.* Genome Biol, 2010. **11**(7): p. 215.
52. Blumberg, A., et al., *Transcription factors bind negatively selected sites within human mtDNA genes.* Genome Biol Evol, 2014. **6**(10): p. 2634-46.
53. Johnson, R.F., Witzel, II, and N.D. Perkins, *p53-dependent regulation of mitochondrial energy production by the RelA subunit of NF-kappaB.* Cancer Res, 2011. **71**(16): p. 5588-97.
54. Szczepanek, K., E.J. Lesnefsky, and A.C. Larner, *Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria.* Trends Cell Biol, 2012. **22**(8): p. 429-37.
55. Klinge, C.M., *Estrogenic control of mitochondrial function.* Redox Biol, 2020. **31**: p. 101435.
56. Psarra, A.M. and C.E. Sekeris, *Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(10): p. 1814-21.

57. Mishra, M. and R.A. Kowluru, *Epigenetic Modification of Mitochondrial DNA in the Development of Diabetic Retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(9): p. 5133-42.
58. Lu, B., et al., *Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance.* J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17363-74.
59. Macias, E., et al., *Stat3 binds to mtDNA and regulates mitochondrial gene expression in keratinocytes.* J Invest Dermatol, 2014. **134**(7): p. 1971-1980.
60. Lezi, E. and R.H. Swerdlow, *Mitochondria in neurodegeneration.* Adv Exp Med Biol, 2012. **942**: p. 269-86.
61. Pinto, M. and C.T. Moraes, *Mitochondrial genome changes and neurodegenerative diseases.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(8): p. 1198-207.
62. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies.* Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
63. Noureddine, M.A., et al., *Genomic convergence to identify candidate genes for Parkinson disease: SAGE analysis of the substantia nigra.* Mov Disord, 2005. **20**(10): p. 1299-309.
64. Rui, Y., et al., *Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons.* J Neurosci, 2006. **26**(41): p. 10480-7.
65. Ferencz, B., S. Karlsson, and G. Kalpouzos, *Promising Genetic Biomarkers of Preclinical Alzheimer's Disease: The Influence of APOE and TOMM40 on Brain Integrity.* Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 421452.
66. Readnower, R.D., A.D. Sauerbeck, and P.G. Sullivan, *Mitochondria, amyloid β, and Alzheimer's disease.* International Journal of Alzheimer's Disease, 2011. **2011**.
67. Reddy, P.H., *Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease.* Experimental neurology, 2009. **218**(2): p. 286-292.
68. Manczak, M., et al., *Mitochondria are a direct site of Aβ accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression.* Human molecular genetics, 2006. **15**(9): p. 1437-1449.
69. Wang, X., et al., *Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients.* Am J Pathol, 2008. **173**(2): p. 470-82.
70. Wang, X., et al., *Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19318-23.
71. Swerdlow, R.H. and S.J. Kish, *Mitochondria in Alzheimer's disease.* Int Rev Neurobiol, 2002. **53**: p. 341-85.
72. Lunnon, K., et al., *Mitochondrial genes are altered in blood early in Alzheimer's disease.* Neurobiology of aging, 2017. **53**: p. 36-47.
73. Yan, M.H., X. Wang, and X. Zhu, *Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease.* Free Radic Biol Med, 2013. **62**: p. 90-101.
74. Swerdlow, R.H., J.M. Burns, and S.M. Khan, *The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(8): p. 1219-31.
75. Area-Gomez, E., et al., *A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease.* Cell Death Dis, 2018. **9**(3): p. 335.

76. Pinho, C.M., P.F. Teixeira, and E. Glaser, *Mitochondrial import and degradation of amyloid-beta peptide.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1837**(7): p. 1069-74.
77. Pagani, L. and A. Eckert, *Amyloid-Beta interaction with mitochondria.* International Journal of Alzheimer's Disease, 2011. **2011**.
78. Ayala, J.C., J.A. Benitez, and A.J. Silva, *Chromatin Immunoprecipitation.* Methods Mol Biol, 2018. **1839**: p. 65-75.
79. Sema Sırma-Ekmekci, N.A., Çağrı Güleç, Duran Üstek, *Kromozom İmmunopresipitasyon Metodu (ChIP Dizileme) ile Transkripsiyon Faktörü Bağlanma Bölgelerinin Saptanması.* Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2013. **6**.
80. ThermoFisher. *A step-by-step guide to successful chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays*. 2016; Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/Step-by-Step-Guide-to-Successful-ChIP-Assays.pdf.
81. Krishna, A., et al., *Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease.* BMC Genomics, 2014. **15**: p. 1154.
82. Ross, R.A., B.A. Spengler, and J.L. Biedler, *Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells.* J Natl Cancer Inst, 1983. **71**(4): p. 741-7.
83. Lopes, F.M., et al., *Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies.* Brain Res, 2010. **1337**: p. 85-94.
84. Kovalevich, J. and D. Langford, *Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology.* Methods Mol Biol, 2013. **1078**: p. 9-21.
85. Yang, R.F., et al., *Suppression of Mic60 compromises mitochondrial transcription and oxidative phosphorylation.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 7990.
86. Hardy, J., *The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal.* Journal of neurochemistry, 2009. **110**(4): p. 1129-1134.
87. Du, H., et al., *Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(43): p. 18670-5.
88. Manczak, M., et al., *Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease.* Neuromolecular medicine, 2004. **5**(2): p. 147-162.
89. Bailey, J.A., et al., *Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid beta-peptide interacting domain (AbetaID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis.* Gene, 2011. **488**(1-2): p. 13-22.
90. Khmeleva, S.A., et al., *Zinc-Mediated Binding of Nucleic Acids to Amyloid-beta Aggregates: Role of Histidine Residues.* J Alzheimers Dis, 2016. **54**(2): p. 809-19.
91. Kang, I., C.T. Chu, and B.A. Kaufman, *The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms.* FEBS Lett, 2018. **592**(5): p. 793-811.
92. Diana, A., et al., *Mitochondria morphology and DNA content upon sublethal exposure to beta-amyloid(1-42) peptide.* Coll Antropol, 2008. **32 Suppl 1**: p. 51-8.

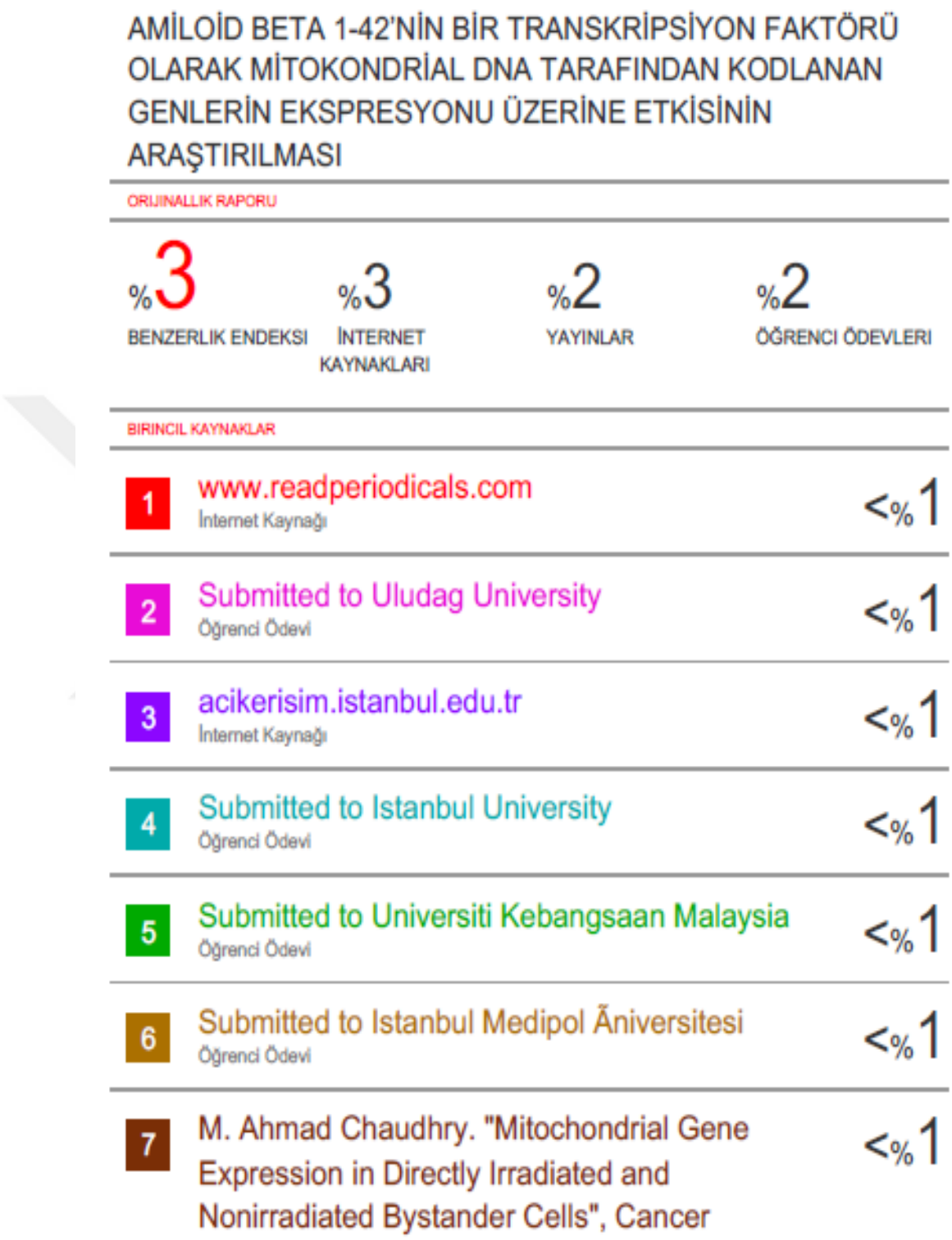
HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



AMİLOİD BETA 1-42'NİN BİR TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ OLARAK MİTOKONDRİAL DNA TARAFINDAN KODLANAN GENLERİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%3	%3	%2	%2
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	www.readperiodicals.com İnternet Kaynağı	<%1
2	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<%1
3	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Universiti Kebangsaan Malaysia Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Istanbul Medipol Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	M. Ahmad Chaudhry. "Mitochondrial Gene Expression in Directly Irradiated and Nonirradiated Bystander Cells", Cancer	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ZUHAL	**Soyadı**	YURTTAŞ
Doğ.Yeri	Küçükçekmece/İSTANBUL	**Doğ.Tar.**	25.11.1994
Uyruğu	T.C	**TC Kim No**	10265543174
Email	zhl.yurttas@gmail.com	**Tel**	5535243991

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi	2017
Lise	Özel Florya Final Anadolu Lisesi	2013

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	İyi	İyi	YÖKDİL	78,75

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

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	76,04157	76,99039	69,19766
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office Programları	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Zuhal Yurttaş, Sümeyra Turgut, İpek Abaoğlu, Şayan Poyraz, Banu Mansuroğlu. Kitosan-dekstran sülfat sodyum bazlı fiziksel hidrojellerin sentezi, karakterizasyonu ve biyouyumluluğunun incelenmesi. 4.Biyomalzeme Günleri. 19 - 20 Ekim 2017,Yalova, TÜRKİYE.

2. Zuhal Yurttaş, Duygu Gezen-Ak, Merve Alaylıoğlu, Ebru Keskin, Erdinç Dursun. SH-SY5Y hücrelerinde endojen Aβ1-42 ve α-syn'nin mitokondrideki varlığının araştırılması. 16. Ulusal Tibbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Ekim 2019, Muğla, TÜRKİYE

3. Tugay Çamoğlu, Erdinç Dursun, Merve Alaylıoğlu, Ebru Keskin, Zuhal Yurttaş, Duygu Gezen-Ak. Amiloid beta 1-42 peptidinin HEK hücrelerinde transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları üzerine etkileri. 16. Ulusal Tibbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Ekim 2019, Muğla, TÜRKİYE

4. Mansuroğlu, B., Kızılbey, K., Şayan Poyraz, F., Yurttaş, Z., Fuerkaiti, S. N., Abaoğlu, İ. Y., & Başat, H. N. (2020). Chitosan/dextran sulphate sodium hydrogels for wound healing material: preparation, characterisation and in vitro evaluation. Materials Technology, 1-8.