

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ALS HASTALARININ REGÜLATÖR T
LENFOSİTLERİNDE OTOFAJİ DÜZENSİZLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Asef AZAD

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

Asef AZAD

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ALS HASTALARININ REGÜLATÖR T
LENFOSİTLERİNDE OTOFAJİ DÜZENSİZLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Asef AZAD

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TDK-2019-4715 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 05/02/2024

İmza

Tez Danışmanı : Doç Dr. Ayşe Esra MANGUOğLU
Akdeniz Üniversitesi

¼ye : Prof. Dr. Hilmi UYSAL
Akdeniz Üniversitesi

¼ye : Prof. Dr. İbrahim KESER
Akdeniz Üniversitesi

¼ye : Doç Dr. Aylin YAMAN
SB¼ Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi

¼ye : Doç Dr. ığdem AYDIN ACAR
Burdu Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK 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 beyan ederim.

Asef AZAD

İmza

Ayşe Esra MANGUOĞLU

İmza

TEŞEKKÜR

Değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU'na, tüm destekleri ve anlayışı için teşekkür ederim. Hiçbir zaman lütfunu esirgemeyen Prof. Dr. Sibel Berker KARAÜZÜM'e ve Prof. Dr. Hilmi UYSAL'a Şükranlarımı sunmaktan büyük mutluluk duyuyorum. Doç Dr. Uğur BİLGE ve Prof. Dr. Sadi KÖKSOY hocalarıma tüm destekleri için teşekkür ederim.

Fedakâr aileme, sabır, anlayış ve fedakârlıkları için minnettarım. Ömürlerini bana adanmış vefat eden anne ve babamı saygı ve sevgi ile anıyorum, ruhları şad olsun.



ÖZET

Amaç: Nöroinflamasyon, amiotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığının ayırt edici özelliğidir. Regülatör T hücreleri (Treg'ler), bağışıklık toleransı ve nöroinflamasyonun önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. ALS hastalarında regülatör Thücre ve FoxP3 proteininin ekspresyonunda önemli bir azalmanın gözlemlendiği gösterilmiştir. ALS'de FoxP3+ regülatör Thücre kaybının ana nedeni bilinmemektedir. Bu çalışmada, ALS'de FoxP3+ regülatör T hücresinde otofaji düzensizliğinin rolü araştırıldı.

Yöntem: Çalışmaya 23 ALS hastası ve 24 sağlıklı kontrol dahil edildi. Periferik kandan mononükleer hücreler (MNC'ler) elde edildi, ardından regülatör T hücreleri izole edildi. İzole edilmiş regülatör T hücreleri, FoxP3 ve LC3 antikoru ile boyandı ve hastalarda ve kontrollerde FoxP3+ regülatör T hücresindeki otofaji seviyelerini belirlemek için LC3 belirteci, akış sitometrisi ile incelendi.

Bulgular: FoxP3+ LC3+ hücrelerinin ortalaması hastalarda ve kontrollerde sırasıyla 0,47 ve 0,45 idi. FoxP3+ LC3- hücrelerinin ortalaması hastalarda 0,15 ve kontrollerde 0,20 idi, $p = 0,030$ ($p < 0,05$). Hastalarda ALSFRS-R düşüş oranı ile otofaji düzeyi arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Ayrıca hızlı ilerleyen ALS hastaları ile yavaş ilerleyen ALS hastaları arasında FoxP3+ regülatör T hücresindeki otofaji düzeyinde anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuç: ALS hastalarında FoxP3+ regülatör T hücresindeki aşırı otofaji seviyeleri, artan hücre ölümünün bir açıklaması olabilir ve nöroinflamasyonun kötüleşmesine ve hastalık başlangıcına neden olabilir. Ancak hastalığın ilerlemesi ile FoxP3+ regülatör T hücresindeki otofaji düzeyi ilişkili bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: ALS, Regülatör T hücreleri, Otofaji, Nöroinflamasyon

ABSTRACT

Objective: Neuroinflammation is a hallmark of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Regulatory T cells (Tregs) are essential in immune tolerance and prevention of neuroinflammation. It has been shown that a significant decrease in regulatory T cell and FoxP3 protein expression is observed in ALS patients. The primary cause of FoxP3+ regulatory T cell loss in ALS is unknown. In this study, the role of autophagy dysregulation in FoxP3+ regulatory T cells in ALS was investigated.

Method: A total of 23 ALS patients and 24 healthy controls were included in the study. Mononuclear cells (MNCs) were obtained from peripheral blood, then regulatory T cells were isolated. Isolated regulatory T cells were stained with FoxP3 and LC3 antibodies and analyzed by flow cytometry to determine autophagy levels in FoxP3+ regulatory T cells in patients and controls.

Results: The mean of FoxP3+ LC3+ cells were 0.47 and 0.45 in patients and controls, respectively. The mean of FoxP3+ LC3- cells was 0.15 in patients and 0.20 in controls, $p = 0.030$ ($p < 0.05$). No significant association between ALSFRS-R decay rate and autophagy level in patients was found. Additionally, there was no significant difference between the autophagy levels in FoxP3+ regulatory T cells in patients with rapidly progressing ALS and in patients with slowly progressing ALS.

Conclusion: Excessive levels of the autophagy in FoxP3+regulatory T cells in ALS patients could potentially be an explanation for increased cell death, worsening of neuroinflammation and could potentially have been a contributing factor to the initiation of the disease. However, disease progression cannot be attributed to the level of autophagy in FoxP3+ regulatory T cells.

Key words: ALS, Regulatory T Cells, Autophagy, Neuroinflammation

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Amyotrofik Lateral Sikleroz (ALS)	4
2.2. ALS’de Hücre Homeostazisi Önemi	6
2.3. Hücre İçi Homeostazisi ve ALS	6
2.4. İmmün Homesotazisi, Nöroinflamasyon ve ALS	7
2.5. İmmün Homeostazisinde Regülatör T hücrelerinin Önemi	9
2.6. Treg Hücrelerinde Otofajinin Önemi	12
2.6.1. Otofaji Moleküler Düzenlenmesi	12
2.6.2. Hücre Homeostazisinde Otofaji	15
2.6.3. Mitofaji	16
2.6.4. Proteostaz ve Agrefaji	17
2.6.5. Otofaji ve Apoptoz	17
2.6.6. Tümör Baskılayıcı p53 Otofaji ve Apoptoz Regülasyonunda Rol almakta	19
2.6.7. Otofaji ve Apoptozun Karşılıklı Bağlantı	19
2.6.8. Otofajiye Bağlı Hücre Ölümü	20
2.6.9. Otofaji ve Nekroz	20
2.6.10 Otofaji, İnflamazom ve Piroptozla Karşılıklı ilişkileri	21
2.7. Regülatör T hücrelerinin İzolasyonu ve Sağlığı	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1. Hasta ve Kontrol Grubu Kriterleri	25
3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Sayısı	26

3.3. Periferik Kan Alımı	26
3.4. Tek Çekirdekli Hücrelerin Elde Edilmesi	26
3.5. Tek Çekirdekli Hücrelerin Kriyojenik Saklanması	27
3.6. Dondurulmuş Tek Çekirdekli Hücrelerin Çözdürülmesi	27
3.7. Hücre Canlılığı Testi	28
3.8. Regülatör T hücrelerinin İzolasyonu	29
3.9. Otofaji belirteci (LC3) 'nin western blot ile incelemesi	29
3.9.1. Protein İzolasyonu	29
3.9.2. Brad Ford Protein Ölçümü	30
3.9.3. SDS Jelde Protein Yürütülmesi	32
3.10. Otofaji belirteci (LC3) 'nin Flow Sitometri ile incelemesi	32
3.10.1. LC3 Markeri ile Boyama	32
3.10.2. FoxP3 Markeri ile Boyama	33
3.10.3. Flow Sitometri Cihazında Okutma	33
3.11. İstatistiksel Analizler	33
4. BULGULAR	
4.1. Western Blot İçin Protein Ölçümü	35
4.2. Flow Sitometri	35
4.3. Hasta ve Kontrol Grubunda FoxP3+ Regülatör T hücresinde Otofaji Seviyesi	35
4.4. Foxp3+ Regülatör T hücresindeki Otofaji Seviyesi ve ALS İlerlemesi	36
5. TARTIŞMA	
5.1. ALS Hastalarında Regülatör T hücrelerinin Otofaji Durumu	45
5.2. ALS'de FoxP3+ Regülatör T hücresinde Otofaji Düzensizliği Nasıl Etki Gösterebilir?	47
5.3. ALS'de Regülatör T Hücresinde Otofaji Düzensizliği Hastalığın Seyrini Etkiler Mi?	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51

KAYNAKLAR

53

ÖZGEÇMİŞ

67



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Standart eğri için elde edilen değerler	31
Tablo 3.2.	Numunelerin protein miktarları	31
Tablo 3.3.	SDS jelinin içeriği	32
Tablo 4.1.	Hasta grubu bilgileri	37
Tablo 4.2.	Kontrol grubu bilgileri	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	ALS’de önemli immün sistem hücreleri	12
Şekil 2.2.	Otofajinin ana aşamaları ve önemli molekülleri	15
Şekil 2.3.	Otofaji ve inflamasyon	24
Şekil 4.1.	Hasta ve kontrollerde otofajik hücrelerin seviyesi	40
Şekil 4.2.	Hasta ve kontrollerde otofajik olmayan hücrelerin seviyesi	40
Şekil 4.3.	ALS hastalarında otofajik olmayan hücrelerin oranı ve ALSFRS-R düşüş oranı arasındaki korelasyon	41
Şekil 4.4.	ALS hastalarında otofajik hücrelerin oranı ve ALSFRS-R düşüş oranı arasındaki korelasyon	41
Şekil 4.5.	ALS hastalarında otofajik olmayan hücrelerin oranı ve ALSFRS-R toplam oranı arasındaki korelasyon	42
Şekil 4.6.	ALS hastalarında otofajik hücrelerin oranı ve ALSFRS-R toplam oranı arasındaki korelasyon	42
Şekil 4.7.	Hızlı ve yavaş ilerleyen hasta grubunda otofajik olmayan hücrelerin seviyesi	43
Şekil 4.8.	Hızlı ve yavaş ilerleyen hasta grubunda otofajik hücrelerin seviyesi	43
Şekil 4.9.	Hasta bireyde sitogram örneği	44
Şekil 4.10.	Kontrol bireyinde sitogram örneği	44
Şekil 6.1.	Foxp3+ regülatör T hücresinde otofaji düzensizliği ve ALS ilişkisi	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
AMPK	: Adenosin Monofosfatla Aktive Olan Protein Kinaz
APC	: Antijen Sunan Hücre
BBB	: Kan Beyin Bariyeri
Bcl-2	: B-Cell Leukemia/Lymphoma-2
C9ORF72	: Kromozom 9 Açık Okuma Çerçevesi
CNS	: Merkezi Sinir Sistemi
CSE	: Sigara Dumanı Ekstresi
DRAM	: Hasar Düzenlenmiş Otofajik Modülatör
FTSD	: Frontotemporal Spektrum Bozukluğu
IFN-β	: İnterferon- β
IFN-γ	: İnterferon- γ
IRF3	: İnterferon Düzenleyici Faktör
MAP1LC3	: Mikrotübül İlişkili Protein 1 Işık Zincir 3
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hedefi
NBR1	: BRCA1 Gen'in Komşusu
Nec-1	: Nekrostatin-1
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NO	: Nitrik Oksit
PARK2	: Parkinson Protein-2
PAS	: Pre Otofagozom Yapı
PB	: Periferik Kan

PE	: Fikoeritrin
PI3K-III	: Fosfoinositid 3-Kinaz-III
PINK1	: PTEN ile İndüklenen Kinaz 1
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homoloğu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
TLR	: “Toll Like” Reseptör
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
Tregs	: Regülatör T hücreleri
UCB	: Göbek Kordon Kan
UVRAG	: UV Işıması Direnci ile İlişkili Gen

1. GİRİŞ

Motor nöron hastalığı olan Amyotrofik Lateral Sklerozisin (ALS) etiyolojisi, tam olarak bilinmemekte ve tam tedavisi bulunmamaktadır (Yoshino ve ark., 2006; Abe ve ark., 2014). Bununla birlikte, mitokondriyal disfonksiyon, glutamat toksisitesi, oksidatif stres, aksonal disfonksiyon, reaktif astrositozis, protein agregasyonu ve genetik faktörler hastalığın başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunduğu bilinen etmenler arasındadır (Bruijn ve ark., 2004; Wang Y. ve ark., 2007; Barber ve ark., 2010; Liu-Yesucevitz ve ark., 2010). Bu faktörlerin sonucunda ortaya çıkan nöroinflamasyon, ALS etiyolojisinde özel bir yer tutmaktadır (Philips ve ark., 2011; Endo ve ark., 2016). Nöroinflamasyon, aşırı derecede immün yanıt sonucunda ortaya çıkmaktadır. Beyinde mikroglia, astrosit, dendrit gibi hücrelerin yanı sıra, periferden sızan B ve T lenfositler de nöronların immün yanıtında önemli görev almaktadır (Matyszak, 1998; Galea ve ark., 2007; Gimsa ve ark., 2013; Beardsley ve ark., 2014; Loftis ve ark., 2014). T lenfositlerden, regülatör T hücreler otoimmünite, aşırı immün yanıt, aşırı proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması durumunda immün baskılayıcı olarak ortaya çıkmaktadır ve inflamasyona sebep olan faktörlerin azalmasında etki göstermektedir (Klenewietfeld ve ark., 2014). CD4+, CD25+, regülatör T hücreleri nöro-koruyucu immün yanıtları indükler. Regülatör T hücreleri, beyin immün yanıtında ve nöroenezde önemli olan mikroglia hücrelerinin modülasyonunda da rol almaktadır (Beers ve ark., 2008; Beers ve ark., 2011). Regülatör T hücre popülasyonlarından FoxP3+ hücreleri çok önemlidir. Özellikle hızlı ilerleme gösteren ALS hastalarında, immün baskılayıcı regülatör T hücrelerinin sayısının azalması ve işlev kaybı görülmektedir. Otofaji ise, regülatör T hücreleri dahil olmak üzere tüm hücrelerin homeostazı ve sağ kalımı için eşsiz bir süreç olarak değerlendirilmektedir. Hücre içi homeostazında ana katabolik süreç olan otofaji protein agregatlarının yıkımında, Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) azaltılmasında, otoimmün yanıtın baskılanmasında, demir gibi ağır metal homeostazında aktif rol oynamaktadır (Scherz-Shouval ve ark., 2007; Di Gioacchino ve ark., 2008; Levine ve ark., 2011; Metcalf ve ark., 2012). Otofaji; efektör T hücrelerinin aktivasyonunda ve sağ kalımının uzatmasında, TLR (“toll like” reseptörlerin) inhibisyonunda, Nükleer Faktör Kappa-B (NF-kB) yolağın baskılanmasında ve regülatör T hücrelerinin işlevinde çok önem taşımaktadır (Xu YI ve ark., 2007; Delgado ve ark., 2008;

Shi ve ark., 2008). Regülatör T hücrelerinin özellikle otofajiye daha fazla bağımlı olduğu ve otofaji kaybının ciddi otoimmünite ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Algassim, 2016).Yapılan bir araştırmada, gerekli otofaji genlerinden Atg7 veya Atg5'in Treg hücresine özel olarak delesyonunu, Treg hücrelerinin kaybına ve inflamatuvar bozuklukların gelişmesine yol açtığı saptanmıştır. Atg7 eksikliği olan Treg hücrelerinde apoptoz artmaktadır. Treg hücreleri aktive olduktan sonra FoxP3 ekspresyonunu kaybetmektedir (Wei ve ark., 2016).

Bu bilgilerin ışığında:

- ALS hastalarında, regülatör T hücrelerinin sayısının azalması, bu durumun ALS etiyolojisinde rol alması ve hastalığın progresyonuyla korelasyon göstermesi beklenmektedir.
- ALS hastalığında, regülatör T hücrelerinin fonksiyon kaybı ile FoxP3 ekspresyon azalışı beklenmektedir.
- Hastalığın progresyonunun regülatör T hücrelerinin işlev kaybıyla da korelasyon göstermesi beklenmektedir.
- Regülatör T hücrelerinin sayısındaki azalışta ve işlev kaybında rol alan ana mekanizmalar arasında otofajinin bulunduğunu düşünmekteyiz.

Bu doğrultuda:

- ALS hastaları ve sağlıklı bireylerden (kontrol grubunu oluşturmak üzere hasta grubu ile yaş ve cinsiyet bakımından uyumlu olmasına dikkat edilerek) kan alındı.
- Alınan kandan tek çekirdekli hücreler (PBMCs) izole edildi.
- PBMC hücrelerinden regülatör T hücreler manyetik kit kullanılarak izole edildi.
- FoxP3+ regülatör T hücreleri saptanmak için kit ile izole edilmiş regülatör T hücreler FoxP3 markeri ile muamele edildi.
- İzole edilmiş hücrelerin otofaji durumu LC3 belirteçlerle saptandı.

- Regulator T hücresindeki otofaji durumu hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırıldı.

Regulator T hücresindeki otofaji durumu hasta grubundaki bireyler arasında klinik bulgularla birlikte değerlendirildi.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Amyotrofik Lateral Sikleroz (ALS)

ALS, ilk kez 1869'da Jean-Martin Charcot tarafından tanımlanan motor nöron hastalığının en yaygın şeklidir (Charcot, 1869). ALS, üst motor nöronların ve alt omurga motor nöronlarının seçici dejenerasyonunun olduğu nörodejeneratif ve ölümcül bir hastalıktır. Bu motor nöronların kaybı, tüm istemli kasların ilerleyici felci ile sonuçlanır ve ilk aşamada el ve ayak gibi organları etkileyerek hastanın hareketini kısıtlarken, sonraki aşamalarda yutma ve solunum organlarını da etkileyerek hastanın ölümüne neden olmaktadır (Kiernan ve ark., 2011). ALS'nin dünya çapındaki insidansı yaklaşık 100.000 kişi başına 2, prevalansı 100.000 kişi başına 6-9 kişidir (Longinetti ve ark., 2019; Brown C. A. ve ark., 2021) ve yaşam boyu risk yaklaşık 350'de 1'dir (Brown C. A. ve ark., 2021). Hastalığın insidansının arttığına dair kanıtlar vardır (Dorsey ve ark., 2018; Longinetti ve ark., 2019). Bu durum, kısmen değişen nüfus demografisi ve doğru tanıyı destekleyen gelişmiş klinik hizmetlerle açıklanabilir. Türkiye'de 2016, 2017 ve 2018 yılı insidans oranları sırasıyla yüz binde 3,7, 4,7 ve 5,4 rapor edilmiştir (Uysal ve ark., 2021).

ALS'nin altında yatan sebepler hala tam olarak bilinmemektedir, ancak üst ve alt motor nöronların seçici ölümünü açıklayan birçok hipotez öne sürülmektedir. Nedensel teoriler arasında anormal protein işlevi ve RNA işlenmesi (Kabashi ve ark., 2008; Blair ve ark., 2010; DeJesus-Hernandez ve ark., 2011), mitokondriyal fonksiyon bozukluğu (Crugnola ve ark., 2010), nöron hücresinden başka hücreler tarafından tetiklenen ölüm (Haidet-Phillips ve ark., 2011), aşırı uyarılma (Vucic ve ark., 2008; Wainger ve ark., 2014), eksitotoksosite, (Shaw ve ark., 1997) ve metabolik fonksiyon bozukluğu (Dupuis Luc ve ark., 2004) yer alır.

ALS'nin yaklaşık %10'u ailesel olarak tanımlanır ve vakaların geri kalan %90'ı sporadik olarak kabul edilir (Rowland ve ark., 2001; Renton ve ark., 2014). Kromozom 9 açık okuma çerçevesi 72 (C9orf72) (DeJesus-Hernandez ve ark., 2011; Renton ve ark., 2011), Süperoksit Dismutaz Tip 1(SOD1) (Rosen ve ark., 1993), TAR DNA Bağlayıcı Protein 43 (TARDBP) (Kabashi ve ark., 2008; Sreedharan ve ark., 2008) ve Sarkomda Füzyon

(Geisler ve ark.) (Kwiatkowski Jr ve ark., 2009; Vance ve ark., 2009) dahil olmak üzere birçok gendeki mutasyonlar ailesel ALS'ye neden olur ve sporadik ALS'ye katkıda bulunur. ALS'de, genetik duyarlılık, çevresel faktörlerle birlikte ortaya çıkar ve hastalığın başlangıcını tetikler (Al-Chalabi ve ark., 2014). ALS'ye katkıda bulunduğu öne sürülen potansiyel çevresel risk faktörleri arasında profesyonel atletizm (Scarmeas ve ark., 2002; Chio ve ark., 2005) β -metilamino-L-alanin (BMAA) (Masseret ve ark., 2013), pestisitler (Kamel ve ark., 2012) ve yaşam tarzı faktörleri (sigara içmek dahil) yer almaktadır (Armon, 2003, 2009).

Çoğu ALS hastasında (~%97), TDP-43 proteinopatisi mevcuttur. Motor nöronlar hasar gördükçe çekirdekten TDP-43 proteini kaybı olur ve sitoplazmik agregasyon kompakt veya çile benzeyen morfolojiye sahip yapılara dönüşür (Neumann ve ark., 2006; Ling ve ark., 2013). Bununla birlikte patolojik heterojenlik de mevcuttur: SOD1 ve FUS genlerindeki mutasyonların neden olduğu ALS, farklı bileşimde sitoplazmik protein agregatlarının mevcut olmasına rağmen bir TDP-43 proteinopatisi değildir (Kato ve ark., 2001; Hardiman ve ark., 2017).

ALS tanı kriterleri arasında revize edilmiş El Escorial kriterleri (Brooks ve ark., 2000), Awaji Shima kriterleri (de Carvalho ve ark., 2008) ve en son olarak basitleştirilmiş Gold Coast kriterleri (Shefner ve ark., 2020) yer almaktadır.

Günümüze kadar yalnızca üç ilaç klinik kullanım için onaylanmıştır: Riluzol (Rilutek, Exservan, Tiglutik), Edaravone (Radicava) ve AMX0035 (Relyvrio). Riluzol, ALS (Bensimon ve ark., 1994; Lacomblez ve ark., 1996) için FDA onaylı ilk tedavi olmuştur. Presinaptik nöronlar üzerindeki voltaj kapılı sodyum kanallarını bloke ederek sinaptik yarığa glutamat salınımını azalttığı ve böylece eksitotoksiteyi iyileştirdiği düşünülmektedir (Kretschmer ve ark., 1998; Wang S.-J. ve ark., 2004)²⁴. İlk deneme sonuçları, hayatta kalma süresinin ortalama yaklaşık 3 ay uzatıldığını göstermektedir. Bununla birlikte, riluzol tedavisi alan ve almayan hastaları karşılaştıran popülasyon çalışmaları, 6 ila 19 ay arasında değişen, hayatta kalma süresinde önemli ölçüde daha büyük artışlar olduğunu belgelemiştir (Andrews ve ark., 2020).

Ayda 14 gün intravenöz olarak uygulanan bir antioksidan ajan olan Edaravone, Japonya'daki çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir. Edaravone'un hastalığın ilerlemesini yavaşlattığına dair kanıtlar vardır ama hayatta kalmayı etkilediğine dair herhangi bir bulgu bulunmamaktadır (Abe ve ark., 2017; Sawada, 2017).

2.2. Hücre Homeostazisinin Önemi

Homeostazi bir hücrenin hayatta kalması için şarttır. Hücrenin hayatta kalmasını etkileyebilen iki tür homeostazi vardır; hücre içi homeostazisi ve hücrenin bulunduğu ortamın homeostazisi. Hücre içi homeostazi için otofaji, oksidatif fosforilasyon, protein ubiquitinasyonu, hücrelerin hayatta kalması ve optimal işleyişi için temel olan hücresel homeostazın korunmasında önemli rol oynayan hücresel süreçlerdir. Hücresel homeostaz, stabil bir iç ortam sağlayarak biyokimyasal süreçlerin verimli ve tutarlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. Hücresel homeostazdaki bozulmalar hücresel strese, işlev bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir ve çeşitli hastalık ve bozukluklara katkıda bulunabilir. Dolayısıyla bu hassas dengenin korunması, organizmanın genel sağlığı ve refahı için çok önemlidir. Çok önem taşıyan hücre çevresi homeostazisinde ise, immün homeostazisi oldukça kritiktir.

2.3. Hücre İçi Homeostazisi ve ALS

ALS'de metabolik fonksiyon bozukluğuna ilişkin kanıtlar 1970'ler ve 1980'ler boyunca rapor edilmiştir (Van den Bergh ve ark., 1978; Reyes ve ark., 1984). ALS hastalarında büyüme hormonu eksikliği (Morselli ve ark., 2006), glukoz intoleransı (Pradat ve ark., 2010), insülin direnci (Reyes ve ark., 1984), hiperlipidemi (Dupuis L ve ark., 2008), hipometabolizma (Cistaro ve ark., 2014) hipermetabolizma (Desport J.-C. ve ark., 2006) ve vücut kitle indeksi (BMI) (Desport J. C. ve ark., 1999; Shimizu T. ve ark., 2012) düzensiz metabolik homeostazın varlığının ve giderek kötüleştiğinin işaretlerini vermektedir. ALS'deki kusurlu metabolik homeostazın altında yatan neden tam olarak belirlenmemiştir. Farelerde, hücre dizilerinde ve insanlarda ALS ile ilişkili genlerin ekspresyonundaki mutasyonlar veya değişmiş gen ifadeleri sıklıkla metabolik anormalliklerle ilişkilidir (Dupuis Luc ve ark., 2004; Palamiuc ve ark., 2015).

Nöronlar, özellikle aktif hücrelerdir ve bu nedenle yüksek metabolik gereksinime sahiptirler. Nörondaki metabolik süreçler

(Kawamata ve ark.) iyonların hücre zarı boyunca pompalanmasıyla bağlantılı olan zar altı glikolizi, (2) aerobik metabolizmayı beslemek için piruvatın üretilmesine izin veren aerobik glikolizi

(Kawamata ve ark.) Trikarboksilik Asit (TCA) döngüsü aracılığıyla mitokondride NADH/ATP üretimini içerir (Aubert ve ark., 2007).

Aktif nöronlar için, aksiyon potansiyellerinin üretilmesi için gerekli olan metabolik talepte bir artış (Sokoloff, 1999) ve bunların geniş yüzey alanı önemli bir metabolik yüke karşılık gelir. Bu ihtiyacın, ATP üretimi yoluyla karşılanması gerekir. Nöronlar aerobik metabolizmaya ve oksijen kullanımına son derece bağımlıdır, ancak büyük bir ATP deposuna rağmen, azalmış glikolitik ve/veya mitokondriyal fonksiyon ATP kullanılabilirliğini değiştirir ve nöronlardaki glikoz ve oksijen yoksunluğu hücre ölümüyle sonuçlanır (Goldberg ve ark., 1993; Lee Y. ve ark., 2012).

2.4. İmmün Homeostazisi, Nöroinflamasyon ve ALS

Son yıllarda, “ALS patofizyolojisinde nöroinflamasyonun önemli bir rol oynadığı” hipotezini destekleyen önemli kanıtlar ortaya çıkmaya başlamıştır.

ALS hastalardan elde edilen veriler, ALS hastalığında bağışıklık sisteminin dengesiz olduğunu göstermektedir. Bu verilere göre; 1) ALS hastalarında immün yanıt sağlıklı kontrollerden farklıdır, 2) immün yanıt açısından spesifik genotip/fenotip özelliklerine sahip hasta alt grupları tanımlanmıştır, 3) immün yanıtı kriterleri ile daha iyi prognoz elde edilmesi mümkündür 4) immün yanıtı göre hastalık ilerlemesinin takibi mümkündür (Beers ve ark., 2019).

ALS'de bağışıklık yanıtın rolü farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Fare ALS modellerinde *in vivo* görüntüleme çalışmaları, presemptomatik fazlarda olan astrositlerin ve mikrogliaların aktivasyonundaki değişiklikleri ortaya çıkaran *ex vivo* analizler ve doğrudan bağışıklık yanıtına bağlı çeşitli genlerin dahil olduğunu gösteren çalışmalar

bulunmaktadır (Maruyama ve ark., 2010; Cirulli ve ark., 2015; Freischmidt ve ark., 2015; Lai ve ark., 2019; Béland ve ark., 2020). ALS hastalarının beyindeki nöroinflamatuvar tepkilerin erken kanıtları hem sporadik olgularda hem de C9orf72 mutasyonu bulunan hastalar için yapılan otopsi çalışmalarında rapor edilmiştir (Kawamata ve ark., 1992; Sasaki, 2011; Brettschneider ve ark., 2013).

ALS-FTSD'li hastalarda, hastalık seyri, şiddeti, başlangıç yaşı ve bulguları açısından çok heterojenlik görülmektedir. ALS-FTSD'li kişilerde heterojenliğe katkıda bulunan potansiyel faktörlerden biri bağışıklık fonksiyonu ve bununla ilgili inflamatuvar süreçlerdir. Regülatör T hücreleri ve interlökinler gibi inflamatuvar araçların, hastalığın ilerleme hızıyla ilişkili olduğu daha önce gösterilmiştir (Brettschneider ve ark., 2012; Lu ve ark., 2016; Beers ve ark., 2017).

ALS'deki immün düzensizliğin temelini oluşturan biyolojik mekanizmalar aydınlatılmayı beklemektedir. Nörodejenerasyon ve nöroinflamasyon arasındaki bağlantıya ilişkin çözülmemiş tavuk-yumurta ikilemi özellikle ilgi çekicidir. Baskın görüş, nöroinflamasyonun nörodejenerasyona göre ikincil olduğudur. Nöroinflamasyon, özellikle proinflamatuvar faktörlerin galibiyetinde ileri hastalık aşamalarında, hasarın artmasına neden olmaktadır (Chiot ve ark., 2019). Proteostaz, aksonal taşıma, RNA metabolizması, mitokondri, hücre iskeleti ve nükleositoloplazmik taşımadaki işlev bozuklukları ile ilişkili olarak 25'ten fazla ALS bağlantılı genden elde edilen kanıtlar, yukarıda bahsedilen patolojik mekanizmaların nöronlardan kaynaklandığı fikrini desteklemektedir (Brown R. H. ve ark., 2017; Hardiman ve ark., 2017). Ek olarak, nöronal patoloji, hastalığın çok erken evrelerinde dahi bağışıklık sistemini harekete geçirmektedir. Örneğin, genetik arka plana bakılmaksızın ALS vakalarının %95'inden fazlasında patolojik bir işaret olan TDP-43 ve mutasyona uğramış SOD1 taşıyan ALS hastalarında bulunan birikmiş SOD1 gibi proteinler, nöronlarda mikrogial aktivasyonu indüklemektedir ve bu da nörotoksisiteyi indükleyebilmektedir (Boillée ve ark., 2006; Swarup ve ark., 2011).

Buna karşın, düzensiz bağışıklık ve/veya inflamatuvar yanıtların bazı durumlarda ilk tetikleyici olabileceği ve nörodejenerasyondan önce gelebileceği yönünde ciddi kanıtlar vardır. Bu teoriyi güçlendiren kanıtlar arasında, ALS ile ilişkili bazı genlerin doğrudan

immünomodulatorler olduğunun gösterilmesidir. Bunlar arasında C9orf72, Silindriromatoz (CYLD), TANK bağlayıcı kinaz 1 (TBK-1) ve Organ Tedarik ve Nakil Ağı (OPTN) proteinlerini kodlayan genler bulunur (Maruyama ve ark., 2010; Renton ve ark., 2011; Cirulli ve ark., 2015; Freischmidt ve ark., 2015). Benzer şekilde, daha yüksek IL-6 ve IL-6R seviyeleriyle ilişkilendirilmiş bir interlökin (IL)-6 reseptörü (IL-6R) polimorfizminin (Asp358Ala), potansiyel olarak ALS hastalığının seyir değiştiricisi olması da bu teoriyi güçlendirmektedir (Wosiski-Kuhn ve ark., 2019). Benzer şekilde, C9orf72, merkezi sinir sisteminin (CNS) yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikroglia da yüksek düzeyde eksprese edildiğinden, mikroglianın özellikle normal C9orf72 protein fonksiyonundaki herhangi bir değişiklikten etkilenebileceği ve dolayısıyla bağışıklık sistemin fonksiyon karışıklığını tetikleyebileceği ileri sürülmüştür (Trageser ve ark., 2019). Bu hipotez nakavt C9orf72 fare modelleriyle kanıtlanmıştır (O’rourke ve ark., 2016; McCauley ve ark., 2020). Hem aşırı hem de etkisiz bağışıklık yanıtının bu genlerle ilişkili olması ve çoğunun aynı zamanda otofaji gibi diğer bazı hücresel yollara da katılması dikkat çekicidir; bu nedenle, ALS patogenezinde hangi fonksiyonlarının en önemli olduğunu ayırt etmek zordur.

ALS’de, bağışıklık sisteminin işlev bozukluğunun birincil veya ikincil role sahip olması, nöroinflamasyonun bu hastalığın merkezinde yer aldığı gerçeğini değiştirmez. Nöroinflamasyon ALS etiyolojisinde özel yer tutmaktadır. Nöroinflamasyon, klinik öncesi modellerde ve ALS hastalarının merkezi sinir sisteminde hem histolojik hem de görüntüleme çalışmalarında belirgin olan patolojik bir işarettir (Appel ve ark., 2021). Ancak, nöroinflamasyona neden olan sebepler ve mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (Upadhyay ve ark., 2016). Nöroinflamasyon, aşırı derecede immün yanıt sonucunda ortaya çıkmaktadır. Mikroglia, dendritik, makrofaj, B lenfositler gibi antijen sunan hücreler, periferik kandan sızan T-lenfositler nöroinflamasyonda önem taşımaktadır (Gimsa ve ark., 2013; Beardsley ve ark., 2014).

2.5. İmmün Homeostazisinde Regülatör T hücrelerinin Önemi

ALS hastalarında ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalardan elde edilen çok sayıda kanıt, doğuştan gelen ve edinsel bağışıklığın, hastalığın seyrini düzenlemede belirgin bir rol oynadığını göstermektedir (Beers ve ark., 2019; Lyon ve ark., 2019; Béland ve ark.,

2020). Merkezi sinir sistemindeki başlıca bağışıklık hücreleri mikroglialardır (Kettenmann ve ark., 2011). Mikroglialar genellikle dinlenme ve aktif olmak üzere iki durumda tanımlanır. Dinlenme halindeki mikroglialar, sinaptik işlemlerinde, nörogenezde ve inflammatuar yanıtları tetiklemeyen nöronal ağların modülasyonuna katılmada oldukça aktiftir (Nimmerjahn ve ark., 2005). Mikroglial aktivasyon ve ardından gelen inflammatuar yanıtlar, CNS hasarına (nöronal döküntü, hücre dışı ATP ve/veya toplanmış proteinler) yanıt olarak tetiklenmektedir.

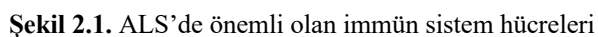
Mikroglia aktivasyonu sürecinde hücre çıkıntılarının kısalması, hücre gövdesi boyutunda artış ve çoğalma artışı ile beraber görülmektedir, bu süreç “mikrogliaz” olarak bilinmektedir. Aktive edilmiş mikroglia hücreleri yüksek fagositik yeteneğe sahiptir.

Mikrogliaz’a nükleer faktör κB (NF- κB), interferon düzenleyici faktör (IRF3), rapamisin’inin memeli hedefi (mTOR) ve diğer sinyal yolları aracılık eder. Hasarın boyutuna ve süresine bağlı olarak mikroglia, ağırlıklı olarak proinflammatuar veya anti-inflammatuar fenotipe polarize olur. Geleneksel olarak M1 olarak bilinen proinflammatuar mikroglia, tümör nekroz faktörü (TNF), IL-1 β ve IL-6, interferon- β (IFN- β) ve kemokinler CCL2 ve IL-8 (monositler için kemoattractanlar ve nötrofiller), gibi sitokinler salgılar, hasar sensörlerini artıracak şekilde düzenler ve reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretir (Béland ve ark., 2020). Buna karşılık, M2 olarak da bilinen anti-inflammatuar mikroglia, inflamasyonu baskılar, bazı hasar sensörlerini azaltarak düzenler, sitokin IL-4, IL-13 ve IL-10 yardımı ile doku rejenerasyonunu destekler ve kısmen hücre döküntülerini ve toplanmış proteinleri fagositozla sağlar (Gravel ve ark., 2016). Mikroglia dışında diğer birkaç makrofaj popülasyonu meninksleri, perivasküler boşlukları ve koroid pleksusları doldurur (Goldmann ve ark., 2016). Mast hücreleri, CNS’de, inflammatuar bir yanıtı düzenlemek için mikroglia ile karşılıklı iletişime geçer (Jones ve ark., 2019). Makrofajlar ve mast hücreleri, aksonlara ve sinir terminallerine yakın bir yerde konumlandıkları için periferik sinirlerde açıkça daha belirgin roller üstlenirler (Gupta ve ark., 2018). Astrositler ve kan beyin bariyeri (BBB) endotel hücreleri de immünolojik açıdan önemli faktörlerin önemli bir kaynağını temsil eder. Mikroglia’nın reaktif astrositlerin fonksiyonlarını etkilediği, astrosit fenotipini nöroprotektiften nörotoksik hale getirdiği gösterilmiştir (Ferraiuolo ve ark., 2011; Pehar ve ark., 2017; Filipi ve ark., 2020).

Nörodejeneratif süreç sırasında mikroglia ve astrositler, çok sayıda periferik bağışıklık hücrelerini yönetmektedir. B hücreleri, T hücreleri, dendritik hücreler periferaldan merkezi sinir sistemine sızmaktadır (Beers ve ark., 2019; Béland ve ark., 2020). Regülatör T hücreleri de periferaldan merkezi sinir sistemine sızmaktadır. Doğal olarak oluşan regülatör T hücreleri (Treg), CD4 + CD25 + T hücre popülasyonu içinde bir alt popülasyon olarak ilk kez 1995 yılında tanımlanmıştır. 1995'te, timektomize fareleri otoimmüniteden koruyabilen yüksek seviyelerde IL-2Ra (CD25) eksprese eden timüs türevli CD4 + T hücrelerinin bir alt grubu olarak keşfedilmiştir (Sakaguchi ve ark., 1995).. 2003 yılında FoxP3, Treg hücrelerinin yeni bir spesifik belirteci olarak tanımlanmış olup ekspresyonunun, baskılayıcı aktiviteler için gerekli ve yeterli olduğu vurgulanmıştır (Fontenot ve ark., 2003; Hori ve ark., 2003). Bu transkripsiyon faktörü, 700'den fazla gene bağlanır ve sürekli yüksek ifade seviyesi, regülatör T hücrelerinin sağlığını korur (Zheng ve ark., 2007). FoxP3 ekspresyonu, regülatör T hücrelerinin gelişimi için vazgeçilmezdir (Fontenot ve ark., 2003). CD3, CD4, CD25, CD127 ve FoxP3 belirteçleri, insan Treg hücrelerini tanımlamak için minimal olarak gerekli belirteçlerdir (Santegoets ve ark., 2015b).

Regülatör T hücrelerinin immün sistemdeki en önemli işlevleri arasında; saldırgan efektör T hücrelerini baskılama, mikroglia ve antijen sunan hücrelerini regüle etme, pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını baskılama bulunmaktadır (Li ve ark., 2006; Liu G. ve ark., 2011). CD4+ CD25+ FoxP3+ regülatör T (Treg'ler) lenfositleri immün baskılayıcı ve vücut antijenlerine karşı tolerans sağlayıcı hücrelerdir. Treg hücrelerinin disfonksiyonu ise otoimmün hastalıkların gelişiminde çok önemli bir rol oynamaktadır (Viglietta ve ark., 2004; Sakaguchi, 2005; Bluestone ve ark., 2015). Regülatör T hücrelerinin azalması ve işlev kaybının doğal sonucu nöroinflasyonun artması ve motor nöronların kaybıdır. FoxP3+ regülatör T hücreleri ALS hastalarında azalmakta ve işlev kaybı göstermektedir (Sheean ve ark., 2018). FoxP3+ regülatör T hücrelerinin infüzyonları hastalığın ilerlemesini yavaşlatır ve hayatta kalma süresini uzatır, saldırgan T lenfositlerinin proliferasyonunu ve mikroglia aktivasyonunu baskılar (Henkel ve ark., 2013). İnsanda ALS'de faz 1 denemesi olarak gerçekleştirilen “regülatör T hücreleri ile tedavi” başarı ile tamamlanmıştır. Faz 1 ALS çalışmasında, subkutan interlökin (IL)-2 ile birleştirilmiş çoğalmış düzenleyici T-lenfositlerin (Tregs) otolog infüzyonları güvenli ve iyi tolere

Sonuç olarak, FoxP3+ regülatör T hücrelerinin ölümü, nöroinflamatuvar yanıtın artışı ve ALS hastalığının ilerlemesinde çok önemlidir. ALS hastalığında regülatör T hücrelerinin ölüm nedenleri bilinmemektedir. Önceki araştırmalara dayanarak otofajinin, regülatör T hücrelerinin sağkalımında ve aktivasyonunda çok etkin olduğu dikkat çekmektedir. Regülatör T hücresindeki otofaji bozulması bu hücrelerin ölümüne neden olabilmektedir (Algassim, 2016; Wei ve ark., 2016). Aşağıda ALS’de önemli olan immün hücreleri gösterilmiştir (şekil 2.1).



Otofaji hücre içi homeostazında en önemli katabolik süreçtir. Otofaji; hücresel homeostazı ve hücre korunumuna ek olarak, mikro çevredeki spesifik proteinlerin homeostazında da etkilidir. Diğer taraftan otofaji, nöronal sinyalleşme ve nöron aktivitesinde de rol almaktadır. Örneğin, hipotalamik nöronlarda besin alımının düzenlenmesi için otofaji

gereksinimi bilinmektedir. Bunlara ek olarak, otofajinin sinaps oluşum süreci için önemli olduğu ortaya konulmuştur. Otofaji, nörotransmitterlerin salgılanması ve dendritik spinlerin gelişimi için de gerekmektedir. Dendritik spinler postsinaptik yapıyı içermektedir. Post sinaptik yapı, nörotransmitterler aracılığıyla aktive edilen reseptörleri içermektedir (Nikoletopoulou ve ark., 2018).

2.6.1. Otofajinin Moleküler Düzenlenmesi

Otofaji Treg hücrelerinde aktiftir ve soy stabilitesini ve sağ kalımını destekler. Otofajide iki temel gen olan Atg7 veya Atg5'in Treg hücresinde spesifik olarak delesyonu, Treg hücrelerinin kaybına, daha fazla tümör direnci ve inflamatuartuar bozuklukların gelişmesine yol açar. Atg7 eksikliği olan Treg hücrelerinde apoptozun arttığı ve FoxP3 transkripsiyon faktörü ekspresyonunun kaybedildiği gösterilmiştir (Wei ve ark., 2016).

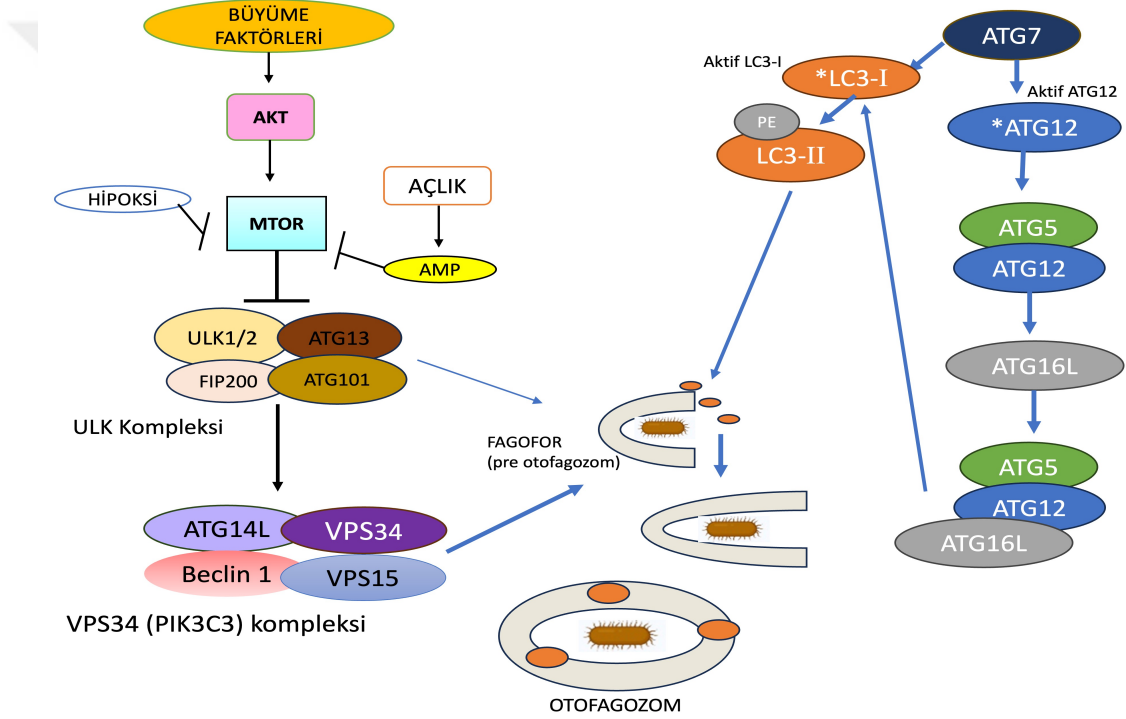
Otofaji süreci, fagoforun oluşumuyla başlar ve otofagozomun yıkımı ile biter. Bu süreçte ATG (autophagy related genes) ve reseptör/adaptör proteinleri ortaya çıkmaktadır. Bugüne kadar, memelilerde otofajide yer alan çok sayıda gen tanımlanmıştır (He ve ark., 2009).

Otofagozom çekirdeklenmesi otofajinin ilk aşamasıdır. Memelilerde ULK1/2 (mayada Atg1 ve C. Elegans'ta UNC-51) kinazlar, ATG13 (mayada Atg13), FIP200 ve ATG101 ile kompleks olarak sitozolde bulunmaktadır. Bu kompleks mTOR yolağı tarafından inhibe edilmektedir (Ganley ve ark., 2009; Karanasios ve ark., 2013). Açlıktan sonra, özellikle endoplazmik retikulum (ER) membranlarında biriktirilen ULK1/2 kompleksi, adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK)'a bağı olarak aktive edilmekte ve pre otofagozom yapının (PAS) oluşumunda rol oynamaktadır (Kim ve ark., 2011). Aktif ULK1/2 kompleksi, VPS34'ün çağırılması ve aktivasyonu için çok önemlidir. VPS34 veya PIK3C3 kompleksi olarak da bilinen sınıf III PI3-kinaz (PI3K-III), bir lipit kinaz kompleksidir ve Fosfatidilinositol3P (PI3P) üretmek için fosforinositlerin fosforilasyonunu sağlar (Simonsen ve ark., 2009). PI3K-III'ün inhibisyonu (örneğin 3-metiladenin veya wortmannin ile) ve daha sonra PI3P'nin azalması otofajiyi inhibe etmektedir (Plowey ve ark., 2011). PI3P üretimi sayesinde, "Beclin1-VPS34" kompleksi, ATG18 (memelilerde WIPI2) (Polson ve ark., 2010) ve omegasome proteini DFCEP1

(Axe ve ark., 2008) gibi otofagozom biyogenezinde rol oynayan önemli otofaji proteinleri için bir platform sağlamaktadır. Beclin1 memelilerde, Atg6 / Vps30 (vakuolar protein sıralama 30) ortoloğu sayılmakta ve sınıf III PI3-kinaz kompleksinin bir alt birimidir. Beclin 1 başlangıçta bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin bir etkileşim ortağı olarak tanımlanmıştır (Liang X. H. ve ark., 1998). Açlık zamanında “Beclin1-Bcl2” etkileşimi azalmakta ve böylece Beclin 1 otofajiyi aktifleştirmektedir (Chang ve ark., 2010). Bu nedenle, Bcl-2 sadece bir anti-apoptotik değil, aynı zamanda bir anti-otofajik proteindir. Alternatif olarak, Bcl-2 otofajiyi tetikleyebilen sitozolik kalsiyum yükselmesini inhibe ederek otofajiyi bastırır (Høyer-Hansen ve ark., 2007). Başka bir Beclin 1 partneri, UV ışması direnci ile ilişkili gen (UVRAG)'dir (Liang C. ve ark., 2006). UVRAG sınıf III PI3-kinaz kompleksinin bir üyesi ve pozitif bir otofaji regülatörü olarak gösterilmiştir (Mizushima, 2007). Ayrıca, Ambra1 adlı bir WD-40 bölgesi içeren proteinin, bir Beclin 1 etkileşimli protein olduğu ve pozitif olarak Beclin 1 bağımlı otofajiyi düzenlediği gösterilmiştir (Maria Fimia ve ark., 2007).

Otofagozom gelişmesi ve kapanması ise sonraki aşamada gerçekleşir. Otofagozom iki ubikütinasyon benzeri sistemin aracılığı ile gerçekleşmektedir: birinci sistem Atg12-Atg5 konjugasyonu sistemi ve ikinci sistem “mikrotübül ilişkili protein 1 ışık zincir 3” (MAP1LC3) veya kısaca LC3, (mayada Atg8) lipidasyon sistemidir (Şekil 1) (Kirisako ve ark., 2000; Mizushima ve ark., 2001). İlk sistemde Atg12, Atg7 (E1 benzeri bir enzim) tarafından aktive edilir, daha sonra Atg10 (E2-benzeri enzim)'a transfer edilir. Sonunda, Atg12 kovalent olarak Atg5 proteinine konjuge edilir (Mizushima ve ark., 2001). Daha sonra, Atg12-Atg5 konjugat ile, Atg16 (memelilerde ATG16L1) bir kompleks oluşturmak için etkileşime girer (Fujita ve ark., 2008). Maya sisteminde, Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi (Memelilerde ATG12- ATG5-ATG16L1 kompleksi) otofagozomların yüzeyinde yer almaktadır (45, 46). İkinci sistemde, Atg8'in bir memeli homoloğu olan LC3 proteini çok önem taşımaktadır. LC3 otofagozom iç zarının üzerinde tanımlanmıştır (Kawamata ve ark.). LC3'ün substratı olan p62/SQSTM1'in bir reseptör olarak işlev gördüğü önerilmiştir (48). Otofaji yetersizliği olan hücrelerde p62/SQSTM1 belirgin bir şekilde birikir (49). LC3 sentez edildikten sonra ATG4B tarafından bölünmektedir. İşlenmiş protein sitozol içerisinde serbest kalmaktadır. Daha sonra, LC3-I ATG7 (E1 benzeri enzim) tarafından aktive edilir, ATG3'e (E2 benzeri enzim) transfer edilir ve

fosfatidiletanolamin (PE) lipit molekülüne kovalent olarak bağlanır. Lipid konjuge LC3 formuna LC3-II adı verilir. (50). LC3-II olarak adlandırılan, LC3'ün lipid modifiye formunun, otofagozom membran genişlemesi ve füzyon olaylarına dahil olduğu düşünülmektedir (51). Bu nedenle, LC3 lipidasyonu ve LC3-I'den LC3-II'ye dönüşümün yanı sıra sitozolik LC3'ün otofagosomlara alınması, yaygın olarak güvenilir bir otofajik aktivite markeri olarak kullanılır. ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleksinin, LC3 lipidasyonu için E3 benzeri bir enzim olarak hareket ettiği, 2 sistemin arasında doğrudan bir bağlantı ve birbirine bağımlılık yarattığı düşünülmektedir (52) (şekil 2.2).



Şekil 2.2. Otofajinin ana aşamaları ve önemli molekülleri

2.6.2. Hücre Homeostazisinde Otofaji

Otofajinin artık hücrel homeostazın korunmasında çok çok etkin olduğu bilinmektedir. Otofajinin, kargoyu otofagozomlara tanımlamak ve hedeflemek için farklı hücrel mekanizmaların kullanıldığı oldukça seçici bir süreç olduğu değerlendirilmektedir.

Otofaji stres altında hücrelerin hücrel bütünlüğün korunmasına katkıda bulunabilir. Organele özgü veya substrata özgü otofajinin diğer formları da tanımlanmıştır. Mitokondri yıkımı (mitofaji) ve denatüre proteinin yıkımı (agrefaji) için bu tür seçici

otofaji yolları bulunmaktadır. Bunlara ek, olarak peroksizomların (Deosaran ve ark., 2013), ribozomların (MacIntosh ve ark., 2011) ve endoplazmik retikulum fragmanlarının (Cebollero ve ark., 2012) seçici otofajik yıkımı da gerçekleşmektedir. Proteinlere ek olarak, lipidler (Liu K. ve ark., 2013) ve RNA (Fujiwara ve ark., 2013) dahil olmak üzere çeşitli hücrel biyomoleküllerin parçalanmasında otofajik süreçlerin de rol oynadığı gösterilmiştir.

Açlık sırasında (örneğin, glikoz veya büyüme faktörlerinin yoksunluğu veya hücrel enerji yükünün tükenmesi) otofaji, hücrel makromoleküllerin bozulması ve geri dönüşümü yoluyla hücrenin hayatta kalmasını uzatır. Bu süreç, besin eksikliği durumları sırasında öncü molekül havuzlarını yeniler (Mizushima ve ark., 2011). Otofaji proteini Atg5'ten yoksun olan fareler, açlığın öldürücü etkilerine karşı duyarlıdır (Kuma ve ark., 2004). Otofajinin Beclin 1 veya Atg5 yıkımı veya 3-metiladenin gibi kimyasal inhibitörler tarafından inhibisyonu, aç HeLa hücrelerinde apoptozu ve kaspaz-3 aktivasyonunu destekleyebilir (Boya ve ark., 2005). Bu çalışmalar, açlık sırasında hücrenin hayatta kalmasını uzatmak için otofajinin bir rol oynadığını öne sürmüştür.

2.6.3. Mitofaji

Otofaji, mitofaji olarak adlandırılan seçici bir süreçte hasarlı veya işlevsiz mitokondrinin uzaklaştırılmasında önemli bir homeostatik fonksiyon gerçekleştirir (Youle ve ark., 2011). Mitofaji, eritrosit olgunlaşmasında ve hücrel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar. Mitofaji yoluyla mitokondri döngüsünün artması, kimyasal veya fiziksel stresin (örneğin hipoksi) bir sonucu olarak ortaya çıkabilir (Zhang ve ark., 2008). Mitofaji, mitokondri sayısını metabolik gereksinimleri karşılayacak şekilde düzenleyebilir. Mitokondri, eritrosit olgunlaşması sırasında yalnızca BH3 proteini Nix/Bnip3L1 tarafından uzaklaştırılır. Nix, dış mitokondriyal membranda lokalize olur ve LIR motifi aracılığıyla memeli Atg8 homologlarıyla doğrudan etkileşime girer [68]. Hasarlı veya işlevsiz mitokondri, fosfataz ve tensin 16 homologu (PTEN) ve PTEN ile indüklenen kinaz proteini 1 (PINK1) ve Parkinson protein-2 (PARK2) vasıtası ile yıkılmak üzere otofagozoma alınır, bu süreçte PTEN, PINK1, PARK 2 gibi proteinler rol oynamaktadır (Narendra ve ark., 2008; Geisler ve ark., 2010). İlgili PINK1 ve PARK2 genlerindeki mutasyonlar, Parkinson hastalığının resesif ailesel formları ile ilişkilidir (Morris, 2005).

Farelerde PINK1 ve PARK2 delesyonları mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir (Trancikova ve ark., 2012). Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı ve mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (ROS) artan üretimi, mitofaji için başlangıç sinyalleri sağlayabilir.

2.6.4. Proteostaz ve Agrefaji

Otofaji, agrefaji olarak adlandırılan seçici bir süreçte, her yerde bulunan protein agregatlarının ortadan kaldırılması için bir mekanizma sağlayarak hücrel protein homeostazisini (proteostaz) koruyabilir (Lamark ve ark., 2012). Son çalışmalara göre, otofaji, protein yıkımı için ubikuitin-proteozom sistemine ek bir mekanizma olarak çalışmaktadır (Kirkin ve ark., 2009; Komatsu ve ark., 2010). Agrefaji, ubikuitinle ilişkili (UBA) bir bölge aracılığıyla ubikuitinlenmiş proteinlerle etkileşime girebilen seçici otofaji kargo adaptörü p62/SQSTM1'i (p62) gerektirir (Shaïd ve ark., 2013). Ayrıca p62, LIR (LC3-etkileşimli bölge) motifi aracılığıyla LC3 ile etkileşime girebilir ve böylece ubikuitinlenmiş proteinlerin otofagozomlara hedeflenmesini kolaylaştırabilir. Seçici otofaji adaptörü BRCA1 geninin komşusu (NBR1) ubikuitin pozitif protein agregatlarının oluşumunu teşvik eder, bunların agrefaji yoluyla sekestrasyonunu ve uzaklaştırılmasını kolaylaştırır (Kirkin ve ark., 2009).

2.6.5. Otofaji ve Apoptoz

Otofajinin hücrel hayatta kalmada yaygın olarak kabul edilen rolüne rağmen, otofaji aynı zamanda çeşitli hücre ölüm yollarının, özellikle de apoptozun düzenlenmesiyle de ilişkilendirilmiştir. Otofaji, hayatta kalma veya strese adaptasyonla ilişkili düzenlenmiş bir programdır. Bununla birlikte, otofagozom oluşumunun artmasına, ölmekte olan hücrelerde sıklıkla rastlanır. Dolayısıyla otofajinin aşırı aktivasyonu, kontrolsüz parçalayıcı süreçler yoluyla apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunabilir (Galluzzi ve ark., 2008).

Otofaji ve apoptozun morfolojik ve biyokimyasal özellikleri farklıdır. Otofajiye giren hücreler, otofajik keseciklerde (yani otofagozomlar ve otofagolizozomlar) bir artış gösterir. Otofajik hücrelerde kısmi kromatin yoğunlaşması görülürken, DNA

fragmentasyonu meydana gelmez. Ancak, iki süreç her zaman birbirini dışlamadığından ve aynı hücre tipinde eşzamanlı olarak meydana gelebildiğinden, otofaji ve apoptoz arasındaki ayrımlar tam olarak belirlenmemiştir (Galluzzi ve ark., 2008).

Son çalışmalar, apoptoz yollarını düzenlediği iyi bilinen faktörlerin, aynı zamanda otofajiyi düzenleyen faktörler üzerinde düzenleyici potansiyeline sahip olduğunu ve bunun tersinin de geçerli olduğunu göstermektedir.

Proapoptotik proteinlerin aktivitesini antagonize ederek apoptozun alt yollarını düzenleyen antiapoptotik B-cell leukemia/lymphoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinleri, otofaji alt yollarını da düzenleyebilir. Beclin 1, Bcl-2 ve Bcl-XL dahil olmak üzere antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleriyle etkileşime girer. Bcl-2 ailesi proteinlerinin Beclin 1'e bağlanması, Beclin 1'in sınıf III PI3K kompleksi ile ilişkisini önleyerek otofajiyi inhibe eder (Pattingre ve ark., 2005; He ve ark., 2010). BNIP3, antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerini harekete geçirerek ve proapoptotik araçların Bax/Bad bağımlı mitokondriyal salınımını teşvik ederek apoptozu tetikleyebilen, yalnızca BH3'ten oluşan bir proteindir. BNIP3 aynı zamanda Bcl-2 ve Beclin 1 arasındaki etkileşimi bozarak mitofajiyi de uyarır (Zhu ve ark., 2013). Bu etkileşimler, otofaji ve apoptozun Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından koordineli olarak düzenlenebileceğini göstermektedir. Deneysel kanıtlar ayrıca apoptoz efektör moleküllerinin aktive edildikten sonra otofajiyi baskılayabildiğini göstermektedir. Örneğin, Beclin 1, apoptozun aktivasyonu sırasında kaspazlar tarafından bölünebilir ve inaktive edilebilir (Luo ve ark., 2010).

Belirli Atg proteinlerinin otofaji/apoptoz düzenlemesinde ikili rol oynayabileceğini öne süren çalışmalar vardır; örneğin otofajik protein Atg5, mTOR1 proteini ile etkileşime girerek ekstrinsik apoptoz yollarını etkileyebilir. Ayrıca, otofajiyi düzenleyen Atg5, proapoptotik bir kesme ürünü (tAtg5) oluşturmak için kalpaine bağlı bölünmeye maruz kalabilir. Bu bölünme ürünü, Bcl-XL gibi antiapoptotik proteinlere bağlanarak ve bunları inhibe ederek apoptozu teşvik eder (Yousefi ve ark., 2006). Ek olarak, Atg12 intrinsik apoptoz yolağının bir efektörü olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Rubinstein ve ark., 2011). Atg12, antiapoptotik Bcl2 ailesi proteinlerine (örn., Bcl-2 ve Mcl-1) bağlanabilir ve onları etkisiz hale getirebilir ve böylece bir proapoptotik düzenleyici olarak görev yapabilir (Rubinstein ve ark., 2011).

Ayrıca otofaji genleri ve proteinleri kaspazların regülasyonunda da rol oynayabilir. Atg4D enzimi, Atg4 ailesinden biri proapoptotik kaspaz-3 için bir substrat olarak tanımlanmıştır (Betin ve ark., 2009). Otofajik protein Atg3, TNFa'nın indüklediği apoptoz sırasında parçalanan bir kaspaz-8 substratı olarak tanımlanmıştır (Oral ve ark., 2012). Sonuç olarak, otofaji ve apoptozun birbirini nasıl etkilediği duruma göre değişmektedir. Hem antiapoptotik (örn., Bcl-2) ve hem proapoptotik (örn., kaspaz-3) moleküller, Beclin 1 ile etkileşime girerek otofajiyi baskılayabilir. Ayrıca, diğer kaspaz bağımlı olaylar, anti-otofaji veya prootofaji olarak ortaya çıkabilir. Örneğin Atg4D'nin kaspaz ile işlenmesi prootofajidir, oysa Beclin 1'in kaspaz işlenmesi antiotofajidir. Belirli uyaranlara yanıt olarak bu yolların her birine veya her ikisine birden başlama kararını kontrol eden kesin hücrel mekanizmalar belirsizliğini koruyor.

2.6.7. Tümör Baskılayıcı p53, Otofaji ve Apoptoz arasında ilişkiler

Bir tümör baskılayıcı gen ürünü olan p53, hücre döngüsü ve apoptozun bilinen bir düzenleyicisi olup, Bcl-2 ailesi proteinlerinin (örn., Bax, Bid) ve apoptozla ilişkili diğer gen hedeflerinin (örn., Apaf1) ekspresyonunu modüle eder. P53'ün nükleer formu, hem otofajiyi hem de apoptozu uyarabilen “hasar düzenlenmiş otofajik modülatör” (DRAM)'ün ekspresyonunu hedefler (Crighton ve ark., 2006). Aynı zamanda, p53, mTOR yolağını baskılayan AMPK'nın ifadesini arttırarak otofajiyi indükleyebilir (Feng ve ark., 2005). Son çalışmalar, p53'ün genetik veya farmakolojik inhibisyonunun aynı zamanda otofajiyi de aktive edebildiğini göstermiş olup p53'ün sitoplazmik formu bir otofaji inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Otofajiyi indüklediği bilinen kimyasal uyaranlar, p53'ün proteozomal bozulmasını destekleyebilir (Tasdemir ve ark., 2008). İnterferon- γ (IFN- γ) ile hücrel uyarmı, p53'ün deasetilasyonunu indükleyerek Bmf ekspresyonunun baskılanmasına, Beclin 1 ve Bcl2 arasında kompleks oluşumunun azalmasına ve otofajinin artmasına yol açar (Contreras ve ark., 2013).

2.6.8. Otofaji ve Apoptozun Karşılıklı Bağlantısı

Bazen otofaji, apoptozun artmasına neden olabilmektedir. Örneğin, sigara dumanı ekstrelerine (Neumann ve ark.) maruz kalan epitel hücreleri ekstrinsik apoptoz yolunun aktivasyonu ile ölmektedir (Chen Z.-H. ve ark., 2008; Chen Z.-H. ve ark., 2010b). Hücre

ölümünün, Fas'a bağlı ölüme neden olan sinyal kompleksinin (DISC) aktivasyonunu ve kaspazların (-8,-9,-3) aktivasyonunu ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. CSE'ye maruz bırakılan epitel hücreleri, eş zamanlı olarak artan otofagozom oluşumu ve epitelyal hücrelerde LC3B-I'in LC3B-II'ye işlenmesinin artmasıyla yanıt vermiştir. Otofaji proteinleri Beclin 1 veya LC3B'nin yıkılması, *in vitro* CSE'ye maruz kalmaya yanıt olarak apoptozu inhibe etmiştir; bu, artan otofajinin epitelyal hücre ölümü ile ilişkili olarak meydana geldiğini düşündürmektedir. Daha ileri çalışmalar, LC3B'nin bu modelde ekstrinsik apoptozda düzenleyici bir faktör olarak hareket edebileceğini ortaya çıkarmıştır. LC3B'nin, lipid sal proteini kaveolin-1'e bağımlı bir şekilde, DISC'in temel bileşeni olan Fas ile bir kompleks oluşturduğu bulunmuştur. CSE'ye maruz kalma, apoptoz sinyallerinin aktivasyonu ile bağlantılı olarak LC3B'nin Fas'tan hızlı ayrışmasına neden olmuştur. Sonuç olarak, CSE kaynaklı toksisitenin özel bir modelinde LC3B'nin proapoptotik bir rol oynadığını ortaya koymuştur, ancak bu modelde otofaji hangi mekanizma ve yollar üzerinden apoptozu arttırdığı henüz bilinmemektedir (Chen Z.-H. ve ark., 2008; Chen Z.-H. ve ark., 2010b). DRAM upregülasyonu ile p53'e bağlı otofaji apoptozu artırır (Lee J.-S. ve ark., 2009). Trofoblastlarda TNF α , otofajiyi indükleyerek intrinsik apoptozu yol açabilir (Cha ve ark., 2014).

2.6.9. Otofajiye Bağlı Hücre Ölümü

“Otofajik hücre ölümü” veya tip II programlı hücre ölümü terimleri daha önce, otofagozom oluşumundaki artışlarla ilişkili olarak ve kaspazlardan bağımsız ortaya çıkan apoptozdan farklı hücre ölümünü ifade etmek için kullanılmaktadır (Shen ve ark., 2011). Birçok çalışmada apoptozdan farklı olarak otofajinin bir hücre ölümü efektörü olduğu kanıtlanmıştır. Kaspaz inhibitörü olan z-VAD-fmk ile veya kaspaz-8 ve kalpain inhibitörleriyle tedavi edilen hücreler, esasen otofajik vakuollerin çarpıcı birikimleriyle karakterize edilen apoptotik olmayan bir yolla ölürler (Martinet ve ark., 2006; Chen S.-Y. ve ark., 2010a; Wu Y.-H. ve ark., 2022). Otofajinin bu modellerde sitotoksositeye katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (Xu Yue ve ark., 2006); bununla birlikte, otofaji proteinlerinin yıkılmasını da kullanan zıt çalışma, otofajinin kaspaz inhibisyonu zamanında apoptotik olmayan hücre ölümüne neden olduğunu öne sürmüştür (Wu Y.-T. ve ark., 2008).

2.6.10. Otofaji ve Nekroz

Tümör hücrelerinde yapılan deneyler, hücrelerde otofaji ve nekroz arasında çapraz sinyalleşme olasılığını ortaya koymuştur (Mathew ve ark., 2007). Otofaji, metabolik strese yanıt olarak tümör nekrozunu ve iltihaplanmayı sınırlamak için koruyucu bir işlev sağlar. Otofaji, metabolik stresi tamponlamak için görev yaparken, apoptoz ve otofajinin kombine işlevsiz hale gelmesi, *in vitro* ve *in vivo* nekrotik hücre ölümünü teşvik etmektedir (Degenhardt ve ark., 2006). Otofaji, hücre canlılığını sürdürmek için yeterli ATP üretimine izin veren bir metabolik geri bildirim sistemini entegre etmektedir (Loos ve ark., 2013).

Günümüzde, spesifik genlerin nekroptoz olarak adlandırılan nekroz sürecini düzenleyebileceği konusunda fikir birliği vardır. Kinaz reseptörüyle etkileşime giren protein 1 (RIP1) ve RIP3, nekroptozda anahtar sinyal molekülleridir. Bir araştırmada L929 hücrelerinin özgün bir kaspaz inhibitörü olan zVAD ile muamele edilmesi, otofaji ve hücre ölümünü indüklemekte olup, bu ölüm süreci RIP1'i gerektirmektedir, bu da otofajinin nekroptozda rol oynadığını göstermektedir (Yu ve ark., 2004). Çeşitli modellerde otofajinin nekroptozu düzenlediği gösterilmiştir (Bell ve ark., 2008; Bonapace ve ark., 2010). Spesifik bir nekroptoz inhibitörü olan nekrostatin-1'in (Nec-1) sadece nekrozu değil aynı zamanda otofajiyi de baskıladığı gösterilmiştir (Wang Y.-Q. ve ark., 2012). Bu gözlemler, otofajinin nekroptoz tarafından indüklenebileceğini hücre ölümü sırasındaki hücresel stresin otofajinin indüklenmesine yol açabileceği olasılığını arttırdığını göstermektedir.

2.6.10. Otofaji, İnflamazom ve Piroptoz ile Karşılıklı ilişkileri

Son çalışmalara göre, otofajik proteinler ve inflamazom ilişkili proinflamatuvar sitokinlerin olgunlaşması arasında bağlantı vardır (Saitoh ve ark., 2008; Zhou R. ve ark., 2011). İnflamazomlar, yeni bir inflamatuvar sinyal mekanizması oluşturan ve IL-1 β , IL-18 ve IL-33 gibi farklı proinflamatuvar sitokinlerin olgunlaşmasını ve salgılanmasını yöneten sitozolik multiprotein kompleksleridir (Schroder ve ark., 2010).

Lipopolisakkaridler (LPS)'e yanıt olarak, atg1611 veya atg7 genleri silinmiş makrofajlarda proinflamatuvar sitokin salgılanması (IL-1 β ve IL-18) artmıştır. Buna karşın, atg1611 veya atg7 eksikliğinin, LPS ile uyarılan makrofajlarda TNF ve IFN- β üretimini veya NF- κ B yolu aktivasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Beclin 1 ve LC3B genleri eksik olan farelerden izole edilen makrofajlar ve monositlerde IL-1 β ve IL-18'in artan aktivasyonu da gözlemlenmiştir (Saitoh ve ark., 2008; Nakahira ve ark., 2011). Bu deneyler, otofajik proteinlerin, mitokondriyi stabilize ederek ve/veya otofaji yoluyla mitokondriyal kalite kontrolünü sürdürerek inflamatuvar yolağın aktivasyonunu azalttığını göstermektedir. Otofaji hasarının, NLRP3 inflamatuvar yolağın aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Otofaji hasarı mitokondriyal ROS üretiminin artması ve mitokondriyal membran geçirgenliğinin artması dahil olmak üzere mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve inflamatuvar yolağın aktivasyonuna sebep olmaktadır (Saitoh ve ark., 2008; Nakahira ve ark., 2011).

Otofajinin inflamazom aktivasyonda negatif düzenleyici rollerine ek olarak, inflamazom yolaklarının uyarılmasını, GTPaz RalB aktivasyonunu ve otofagozom oluşumunu destekleyebilmektedir (Shi ve ark., 2012).

Piroptoz, kaspaz-1'e bağlı aşırı iltihaplanmaya yanıt olarak inflamatuvar hücrelerde tetiklenir ve ölen hücrelerden proinflamatuvar sitokinlerin (örn., IL-1 β , IL-18 ve IL-33) salınmasına yol açar. Son çalışmalar, makrofajların, piroptozun başlangıcını geciktirmenin bir yolu olarak, inflamatuvar aktivasyona paralel olarak otofajiyi de aktive ettiğini ileri sürmektedir (Byrne ve ark., 2013).

İnflamazom tarafından otofajinin negatif düzenlenmesinin aksine, yapılan bazı çalışmalara göre, bazen virüsler tarafından tetiklenen otofaji kaspaz-1 aktivasyonunu ve IL-1 β ve IL-18 salgılanmasını arttırmaktadır (Cai ve ark., 2023). Otofaji ve inflamasyon arasındaki ilişkiler şekil 2.3.'te gösterilmiştir (Şekil 2.3)

3. Regülatör T hücrelerinin İzolasyonu ve Saflığı

Treg'ler periferik kandan (PB) (Safinia ve ark., 2016), göbek kordon kanından (UCB) (Brunstein ve ark., 2011) veya timustan (Dijke ve ark., 2016) büyük ölçekte izole

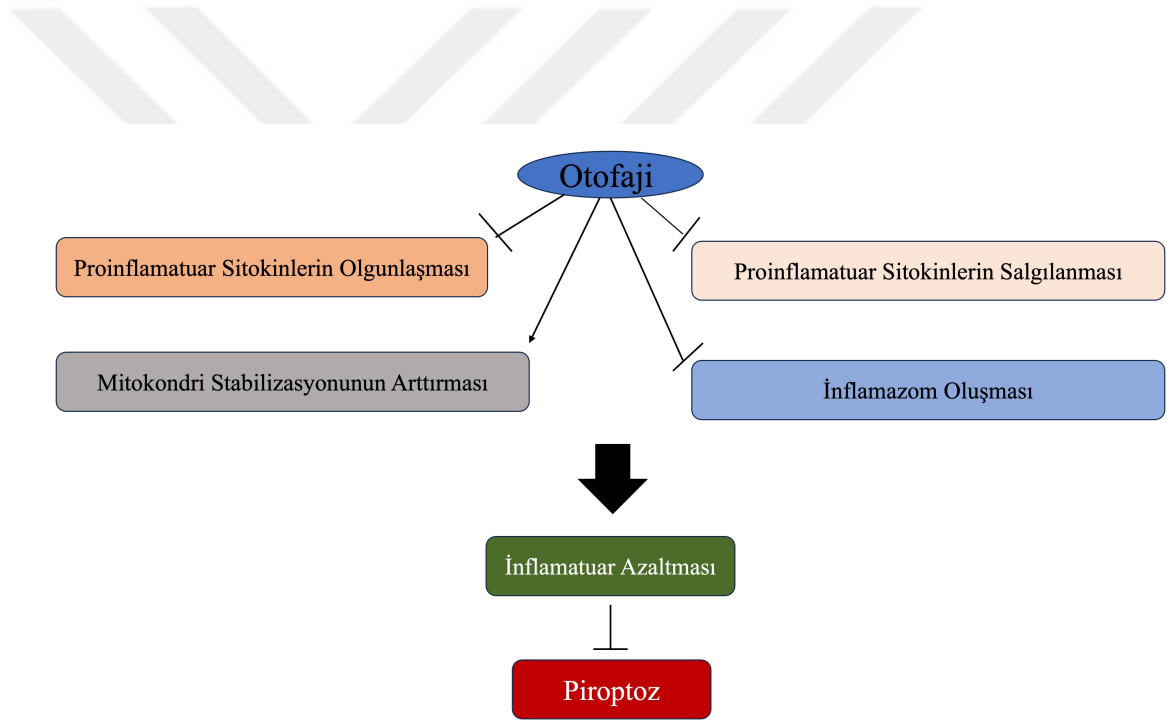
edilebilir. CD3, CD4, CD25, CD127 ve FoxP3, belirteçleri insan Treg hücrelerini tanımlamak için gerekli belirteçlerdir (Santegoets ve ark., 2015a). Özellikle, FoxP3+ hücre saflığı önemli bir faktör olarak dikkate alınmalıdır. PB'de, FoxP3+Treg'ler tüm dolaşımdaki CD4+ T hücrelerinin %5-10'udur. UCB ve timusta Treg'lerin sayısı daha yüksek olsa da büyük sayıda elde edilmesi zordur. Saf ve kabul gören sayıda FoxP3+ regülatör T hücreleri elde etmek için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Kapalı ve steril bir sistemde hücrelerin klinik ölçekli izolasyonu manyetik metodu kullanan "CliniMACS" sistemi (CliniMACS TM Instruments, Miltenyi Biotec) bu yöntemlerden birisidir. CliniMACS sisteminin, Treg'lerin izolasyonunda birkaç grup tarafından kullanılmış olmasına rağmen, Di Ianni ve arkadaşları tarafından bildirildiği üzere, hücrelerin sadece %80'i, FoxP3+ hücreleri içermektedir (Di Ianni ve ark., 2012). FoxP3+ olmayan hücrelerin varlığı, özellikle antijene spesifik hücrelerin elde edilmesi planlanmışsa süreci negatif olarak etkileyebilmektedir. Manyetik yöntemler farklı belirteçleri kullanarak regülatör T hücreleri izole etmeye çalışmaktadır. Önceki araştırmalara göre CD4+ CD25^{yüksek} hücrelerin %51,82 ± 8,03'ü FoxP3 pozitifken, CD4 + CD25^{yüksek} CD127^{düşük} hücrelerinin %82,12 ± 5.5'i FoxP3 pozitifdir. Ayrıca, Liu ve ark. CD4 + CD25 + CD127^{düşük} hücrelerde FoxP3 ekspresyonunu % 86.6 olarak ve CD4+ CD25^{yüksek} hücrelerde %22 olarak rapor etmiştir (Liu W. ve ark., 2006). Bu sebeple bu araştırmada ilk aşamada CD4+ CD25^{yüksek} CD127^{düşük} markerleri kullanan kit kullanıldı.

Treg'lerin araştırmada ve klinikte daha saf izole edilmesi için kullanılan diğer bir yöntem de akış sitometri (flow cytometry) temelli saflaştırma yöntemidir. Bu yöntemde seçilen hücre belirteçlerinin ekspresyonuna göre hücreler izole edilebilir. Akış sitometrisi kullanması FoxP3+ hücrelerin saflığını önemli ölçüde arttırmaktadır (>98-99%). Bugüne kadar, akış sitometrisi ile saflaştırılmış Treg'ler klinik araştırmalarda kullanılmıştır (Zhou X. ve ark., 2010).

Regülatör T hücrelerinin ölümünde ya da işlev kaybında immün yanıt bozulmakta ve inflamasyon artmaktadır. ALS hastalarında sinir sistemine sızan T lenfositlerin sayısı artmaktadır (Engelhardt vd., 1993). Ancak, bu hastalarda regülatör FoxP3+ T hücrelerinin sayısı azalmakta ve aktivasyonu bozulmaktadır (Beers vd., 2011). Bu hastalarda FoxP3+

regülatör T hücresinin azalmasının nedeni ve mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Sonuç olarak, ALS hastalarında regülatör T hücrelerinin azalması ve işlev kaybı otofaji düzensizliği ile korelasyon gösterebilmektedir. Bu araştırmamızda ise otofaji düzensizliğinin, regülatör T hücresinin kaybında olası rolü incelenmiştir ve böylelikle bu araştırmanın sonucunda ALS etiyojisinin aydınlatılmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Böylelikle, ALS tedavisine yönelik yeni hedeflerin belirlenebilmesine olanak sağlayabilecek nitelikte bulgulara erişilmesi hedeflenmiştir.



Şekil 2.3. Otofaji ve inflamasyon

3. GEREÇ ve YÖNTEM

ALS hastalarının regülatör T hücresindeki sayı düşüşü ve işlev kaybında Otofaji düzensizliğinin rolünü incelemek üzere, uygulanan deneysel aşamalar aşağıda anlatılmaktadır.

Bu çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Sayı: 70904504/540, Tarih: 28.11.2018).

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu Kriterleri

Hasta grubu için revize edilmiş El Escorial kriterlerine göre ALS hastalığı tanısı alan 23 hasta seçilirken, kontrol grubuna akraba olmayan 24 sağlıklı birey dahil edildi. Hasta ve kontrol grupları yaş ve cinsiyet açısından benzerdi. Hem hasta hem de kontrol grupları nöroloji uzmanı tarafından özenle seçildi. Tüm hastalar poliklinik hastası idi ve hiçbirinde PEG (Perkütan Endoskopik Gastrostomi) veya NIV (Non-invazif Ventilasyon) gerekmemektedir. Ayrıca hastalar MiTos ve King evreleme yöntemlerine göre değerlendirildi (tablo 1).

Hasta grubu yaşları 42 ile 77 arasında değişen 13 erkek ve 10 kadından oluşturuldu. Kontrol grubu yaşları 32 ila 70 arasında değişen 16 erkek ve 8 kadından oluşturuldu.

ALSFRS-R düşüş hızına göre hasta grubu içerisinde iki alt grup oluşturuldu:

- i. Hızlı ilerleyen hastalar
- ii. Yavaş ilerleyen hastalar.

Hızlı ilerleyen hastalar, ayda 0,5 ALSFRS-R düşüş puanına eşit veya daha yüksek hızla ilerleyen hastalar olarak tanımlandı. Yavaş ilerleyen hastalar ise, ayda 0,5 ALSFRS-R düşüş hızı puanından daha az bir hızla ilerleyen hastalar olarak tanımlandı. Hastalar hastalığın ilerlemesine göre iki gruba ayrılırken düşüş oranı için bir eşik olarak 0,5 puan/ay varsayılmıştır. Çünkü bu değer orta seviyenin üst sınırı olan D50'de yaklaşık 40 aya karşılık gelmektedir. Bu şekilde hızlı/orta derecede ilerleyen hastaları bir grupta,

yavaş ilerleyen hastaları diğer grupta gruplandırdık. Hasta grubumuzda ortalama düşüş oranı 0,4285 olarak belirlendi.

Kontrol gönüllülerinin veya hastaların hiçbirinde başka kronik veya geçici inflamatuvar hastalık geçmişi yoktu, kanser tanısı da yoktu ve kan toplama sırasında tip 1 diyabet, romatoid artrit ve grip gibi inflamatuvar veya otoimmün hastalıklarla ilgili ilaç kullanmıyordu. Tanı anında tüm hastaların klinikte nörolojik muayeneleri yapıldı. Hiçbir hastada belirgin demans belirtisi görülmedi. Çalışmaya katılmayı kabul eden her katılımcının yazılı, imzalı onam formu alındı.

3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Sayısı

ALS hastalığının çok yaygın olmaması nedeni ile anlamlı hasta ve kontrol sayısını belirtmek üzere yapılan istatistik analiz sonucunda 23 ALS hastası ve 24 sağlıklı birey olmak üzere toplam 47 kişinin projede yer alması uygun bulunmuştur. Daha önce regülatör T hücresinde LC3 ölçümü yapılmamıştır. Bundan dolayı örneklem büyüklüğünü teorik yaklaşımla hesapladık. İki grup arasında alfa 0,05 düzeyinde 1 standart sapma farkı %80 güç ile saptamayı amaçladık. Bunun için her grupta 17 hasta gerekmektedir. %15 kayıp (drop-out) olacağını varsayarak her grup için en az 20 hasta hesaplandı. Kontrol bireylerinin yaş ve cinsiyet açısından ALS hastaları ile uyumlu olmasına dikkat edildi.

3.3. Periferik Kan Alımı

Araştırmaya katılan ALS hastaları ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerden 15 ml kan örneği K3-EDTA'lı tüplere (Merck, NJ, US) alındı.

3.4. Tek Çekirdekli Hücrelerin Elde Edilmesi

Kan alındıktan sonra 8 saat içinde periferik kandan mononükleer hücreleri (PBMC) elde edildi. PBMC'lerin izole edilmesi yoğunluk gradienti oluşturan Lymphoprep™ (stem cell Technologies, WA, US) solüsyonu ve sanjtrifüj (Beckman Coulter, IN, US) kullanılarak gerçekleştirildi. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu aşamaları aşağıda verilmiştir.

- I. Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örnekleri 50'lik falkona (BD, UK) alındı.
- II. Falkon'daki kan'ın üzerine 1/1 oranında Easysep Buffer (Stem Cell Technologies, WA, US) eklendi.
- III. Yeni bir falkon'a kanın 1,5 katı olacak şekilde lenfoprep eklendi.
- IV. Lenfoprep bulunan falkon'un üzerine pipet yardımıyla kan, falkonu eğerek iki faz oluşacak şekilde eklendi.
- V. Örneği, 800 x g de 24°C de 20 dakika santrifüj edildi.
- VI. Santrifüjden çıkan ve 3 fazdan oluşan örneğin üst sarı kısmı pipet yardımıyla atıldı. Orta fazda bulunan şeffaf görünümlü lenfositlerimizi yeni bir falkona aktarıldı.
- VII. Ardından 1/1 oranında Easysep buffer eklendi ve 1.300 rpm de 24 C de 10 dakika santrifüj edildi.
- VIII. Santrifüjden çıkan örneğin üst süpernatant'ının büyük bir kısmı yavaşça döküldü ve dipte kalan kısım yavaşça karıştırıldı.
- IX. Elde edilen lenfosit hücrelerin üzerine 1/1 oranında PBS (Thermofisher, NJ, US) besi yeri eklenip Cryo tüpe aktarıldı.
- X. -80°C de saklandı.

3.5. Tek Çekirdekli Hücrelerin Kriyojenik Saklaması

4ml kriyoprezervasyon besi ortamı hazırlandı. Besi ortamında 3.2ml L-Glutamin içermeyen RPMI (Thermofisher, NJ, US) ve 0.8ml DMSO (Merc, GE) bulunmaktadır. Besi ortamı buzda tutuldu ve 4°C'e ulaştığı zaman, damla damla süspanse olan tek çekirdekli hücrelere eklendi. Ardından, süspanse olan hücreler kriyojenik tüplere aktarıldı ve direkt -80°C'ye kaldırıldı. Kullanılacağı zaman hücreler çözündürüldü.

3.6. Dondurulmuş Tek Çekirdekli Hücrelerin Çözdürülmesi

Kriyojenik tüpte tek çekirdekli hücreler ve %20'lik S-RPMI (FBS) (Thermofisher, NJ, US) yıkama solüsyonu 37°C'deki su banyosuna alındı. Tek çekirdekli hücreler çözündükten sonra yıkama solüsyonuna aktarıldı. 10 dk. 500 g'de, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Bu aşama iki kere tekrarlandı. İlk yıkamada Pasteur pipeti kullanılarak, çözülmüş tek çekirdekli hücreler, içerisinde 10 ml'lik yıkama solüsyonu bulunan 15ml'lik polipropilen tüpünde karıştırılıp santrifüj edildi. Süpernatant daha sonra aspire edildi. İkinci yıkamada, 10ml yıkama solüsyonu eklenip tek çekirdekli hücreler Pasteur pipeti kullanılarak yeniden süspanse edildi. Tekrar santrifüj edilip süpernatant aspire edildi. Yeniden süspansiyon haline getirildi ve hücreler daha sonra polipropilen (12x75mm yuvarlak tabanlı) tüplere aktarıldı.

3.7. Hücre Canlılığı Testi

Çözülmüş mononükleer hücrelerin canlılığı Tripan mavisi kullanılarak test edildi; hücrelerde canlılık oranı yaklaşık %90 olarak saptandı. Canlılık açısından test edilen hücre süspansiyonunun bir kısmı 100 g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi ve süpernatantı atıldı.

- I. 1 ml PBS'de hücre peleti yeniden süspanse edildi.
PBS gibi serum içermeyen besi yeri kullanmak önemlidir çünkü serum proteinleri tripan mavisi ile boyanır ve yanıltıcı sonuçlar doğurabilir.
- II. 1 birim %0,4 tripan mavisi (Merc, GE) ve 1 birim hücre süspansiyonunu karıştırıldı.
- III. Karışım oda sıcaklığında ~3 dakika inkübe edildi. Daha uzun inkübasyon süreleri hücre ölümüne ve canlılık sayımlarının azalmasına yol açacağından, hücreler tripan mavisi ile karıştırıldıktan sonraki 3 ile 5 dakika içinde sayılmalıdır.
- IV. Bir hemasitometreye bir damla tripan mavisi/hücre karışımı uygulandı. Hemasitometre binoküler mikroskope yerleştirildi ve hücrelere odaklandı.
- V. Renksiz (canlı) ve renkli (cansız) hücreleri göstermektedir. Çünkü tripan mavisi ölmüş hücrelerin içine girer ve boyar.
- VI. Canlı hücrelerin yüzdesi aşağıdaki denklemden hesaplandı:

$$\text{Canlı hücre (\%)} = \frac{1 \text{ ml karışımında canlı hücrelerin sayısı}}{\text{tüm hücrelerin sayısı}} \times 100$$

3.8. Regülatör T hücrelerinin İzolasyonu

Regülatör T hücresinin izolasyonu için hazır manyetik boncuk kiti “EasySep™ Human CD4⁺CD127^{low}CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit” (Stem Cell Technologies, WA, US) kullanıldı. Tüm aşamalar üretici firmanın önerdiği gibi yapıldı. Regülatör T hücre izolasyonunda dondurulmamış (taze) tek çekirdekli hücreler ve dondurulmuş tek çekirdekli hücreler kullanıldığında herhangi bir fark gözlemlenmedi.

Kit ile Treg İzolasyonu

- I. Besi yeri içerisinde bulunan çözünmüş hücreler flow tüpüne aktarıldı.
- II. Tüp üzerine ilk olarak, 13 ul CD25⁺ eklendi ve nazıkçe pipetaj yapıp 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- III. Ardından Releasable Rapid Spheres vortexlenip 8 ul eklendi ve pipetaj yapıldı.
- IV. Sonrasında 13 ul CD4⁺ eklenip pipetaj yapıldı.
- V. Karışım, magnet (Stem Cell Technologies, WA, US) üzerine alınıp 5 dakika inkübe edildi.
- VI. İnkübasyon sonrası miklatıs üzerinde süpernatant döküldü.
- VII. Ardından 2.5 ml Easyep Buffer eklendi, alt üst edildi ve 5 dakika inkübasyon’a bırakılıp yine miknatis üzerinde süpernatant döküldü. (Bu aşama 3 kez tekrarlandı).
- VIII. Ardından yine 2.5 ml Eaysep Buffer eklendi.
- IX. Sonrasında 25µl Release Buffer eklendi ve alt üst edildi.
- X. CD127’den 13 µl eklenip pipetaj yapıldı ve 5 dakika inkübe edildi.
- XI. İnkübasyon sonrası 3µl Dextran eklenip alt üst edildi ve 5 dakika inkübayona bırakıldı.
- XII. Ardından örnek magnet üzerine alınıp 5 dakika inkübe edildi.
- XIII. Magnet üzerindeki süpernatant, yeni bir tüpe alındı ve buz üzerinde inkübe edildi.

3.9. Otofaji Belirteci (LC3)’nin Western Blot ile İncelemesi

3.9.1. Protein İzolasyonu: Hem taze hem dondurulmuş hücrelerden izole edilmiş regülatör T hücresinden protein izolasyonu gerçekleştirildi.

T hücrelerden protein izolasyonu:

- I. T hücreleri, 1000 x g de 24°C de 5 dakika santrifüj (Beckman Coulter, IN, US) edildi ve ardından süpernatant atıldı.
- II. Örnek üzerine 200 µl PBS eklendi ve 2500 rpm (Beckman Coulter, IN, US) de 24 C de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
- III. Örnek üzerine 300 µl Liziz Buffer (Thermofisher, NJ, US) eklendi ve 5 dakika buzda sürekli karıştırılarak inkübe edildi.
- IV. 13.000 x g de +4°C de 10 dakika santrifüj (Beckman Coulter, IN, US) edildi.
- V. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir tüpe alındı ve üzerine %50'lik Gliserolden (Merc, GE) 200 µl eklendi.
- VI. İzole edilen protein'in yoğunluğu ölçüldükten sonra -20°C de saklandı.

3.9.2. Brad Ford Protein Ölçümü

İlk aşamada standart eğri bilinen bir protein konsantrasyonundan oluşturuldu ve bilinmeyen numune test edilerek standart eğri ile karşılaştırıldı. Bunun için aşağıdaki aşamalar gerçekleştirildi.

Standart solusyonu hazırlaması (1µg/µl BSA hazırlanması):

- I. Stok BSA konsantrasyonu 10µg/µl dir.
- II. 0.1 g BSA (Merc, GE) 10 ml distile suda çözüldü.
- III. Bu solusyondan 100µl alınarak 1ml'ye distile su ile tamalandı.

Brad Ford solusyonu hazırlaması:

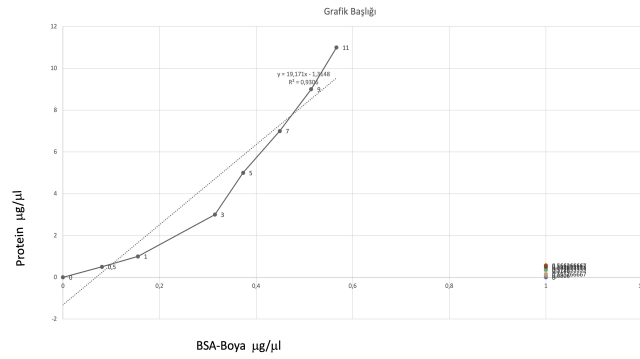
Brad Ford solusyonu son konsantrasyonu 1x olacak şekilde 3ml solusyon distile su ile 15 ml'ye tamamlandı.

Eğrinin oluşturulması:

- I. Gliserolda saklanan proteinler -20 °C' den çıkarıldı.
- II. 96 koyucukluk paletin ilk sıraları boş bırakıldı. İkinci sıranın ikinci koyucuğundan başlanarak, aşağı doğru 3'lü olacak şekilde 1µg/µl BSA'dan 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15µl konuldu.
- III. Proteinden de aşağı doğru 3'lü şeklinde 1µl örnek konuldu.
- IV. Her koyuya mikro pipet ile 100 µl Brad Ford solusyonu konuldu.
- V. Değerler alındıktan sonra, excel programında eğri grafiği çizildi.
- VI. BSA değerleri x verisi ve örnekler verileri y verisi olarak yerleştirildi. Tablo 3.1. Şekil 3.1)
- VII. Brad Ford excel'i yardımı ile konsantrasyonlar belirlendi (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Standart eğri için elde edilen değerler

BSA	0	0,5	1	3	5	7	9	11
Protein	0,171	0,23	0,276	0,467	0,506	0,601	0,686	0,745
Protein	0,186	0,262	0,352	0,487	0,567	0,619	0,695	0,735
Protein	0,165	0,261	0,349	0,501	0,557	0,638	0,672	0,73
Ortalama	0,174	0,251	0,325666667	0,485	0,543333333	0,619333333	0,684333333	0,736666667
BSA-Boya	0	0,0806	0,155266667	0,3146	0,372933333	0,448933333	0,513933333	0,566266667



Şekil 3. 1. Standart eğri

Tablo 3.2. Numunelerin protein miktarları

	Örnek1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek4	Örnek 5	Örnek 6	Örnek 7	Örnek 8	Örnek 9	Örnek10	Örnek11	Örnek12
Ölçüm 1	0,314	0,327	0,199	0,21	0,172	0,231	0,307	0,224	0,3	0,361	0,479	0,326
Ölçüm 2	0,255	0,416	0,243	0,24	0,224	0,198	0,347	0,215	0,31	0,35	0,403	0,32
Ölçüm 3	0,247	0,413	0,25	0,261	0,25	0,247	0,43	0,293	0,338	0,329	0,38	0,354
Ortalma	0,272	0,385333333	0,230666667	0,237	0,215333333	0,225333333	0,361333333	0,244	0,316	0,346666667	0,420667	0,333333
BSA-boya ortalaması	0,1016	0,214933333	0,060266667	0,0666	0,044933333	0,054933333	0,190933333	0,0736	0,1456	0,176266667	0,250267	0,162933
1 ug/uL	0,6329736	2,80568693	-0,159427733	-0,0380114	-0,453383067	0,261673067	2,345582933	0,0961856	1,4764976	2,064408267	3,483062	1,808795
25 ug/uL		8,91047383					10,6583313		16,9319611	12,1100077	7,177592	13,82136
LD hacmi		2,22761846					2,664582826		4,23299028	3,027501924	1,794398	3,455339
TOPLAM YÜKLEME HACMİ		22,2761846					26,64582826		42,32990287	30,27501924	17,94398	34,55339

3.9.3. SDS Jelde Protein Yürütülmesi

SDS Jel

SDS jelin içeriği (Merc, GE) tablo 3.3' te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. SDS jelinin içeriği

İçerik	Miktar
Distile Su	4.0 ml
Tris Bufer (1.5M, PH 8.8)	2.5 ml
Akrilamid : Bis Akrilamid	3.33 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	50 µl
TEMED	15 µl
Toplam	10 ml

- SDS jeli hazırladıktan sonra örnekler Brad Ford tablosuna göre yüklendi

3.10. Otofaji belirteci (LC3) 'nin Flow Sitometri ile incelemesi

Flow sitometrisi, tutulmayan hücrelerinin içeriğinin tanınması ve ölçülmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tutulmayan hücrelerde Western blot'a göre daha Pratik ve uygundur. Çünkü flow sitometresi adherent olmayan hücrelerin incelenmesi için tasarlanmıştır.

3.10.1. LC3 Markeri ile Boyama

Bu aşamada Mouse anti-Human Lambda Light Chain Secondary Antibody, APC (Invitrogen, Thermofisher, NJ, US), kullanıldı ve regülatör T hücreleri LC3 markeri ile boyandı.

Hücreler, 2500 rpm de 30° C de 5 dakika santrifüj (Beckman Coulter, IN, US) edildi ve süpernatant'ı atıldı. Hücrelerin üzerine 100 µl hücre yıkama tamponu (Thermofisher, NJ, US) eklendi ve Flow'da hücre varlığı teyit edildi. Ardından 2500 rpm de 30° C de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant'ı atıldı. 100 µl hücre yıkama tamponu (Thermofisher, NJ,

US) eklenip pipetaj yapıldı. Daha sonra, 5 µl LC3 Antikoru eklendi ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

3.10.2. FoxP3 Markeri ile Boyama

Phycoerythrin (PE) anti-human FOXP3 Antibody, Clone 206D (Biolegend, SD, US) antikörü kullanıldı. LC3 ile boyanmış hücreler üzerine 500 µl hücre yıkama tamponu (Thermofisher, NJ, US) ekleyip 2500 rpm de 30 C de 5 dakika santrifüj edildi. 100 µl Fiksasyon solüsyonu eklenip 60 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, 500 µl 1 x Permeabilizasyon solusyonu eklenip 2500 rpm de 30°C de 5 dakika santrifüj edildi (Bu aşama 2 kez tekrarlandı). Santrifüjden çıkan örneğin süpernatant'ı dökülüp üzerine 100 µl 1 x Perm ve ardından 5 µl FoxP3 boyası eklendi (Her aşamada pipetaj yapıldı). Oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 500 µl 1x Permeabilizasyon eklenip 2500 rpm de 30° C de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant'ı döküldü ve örneğin üzerine 500 µl hücre yıkama tamponu (Thermofisher, NJ, US) eklenip pipetaj yapıldı. Boyanmış T hücreleri Flow sitometri cihazında okutuldu.

3.10.3. Flow Sitometri Cihazında Okutma

LC3 ve FoxP3 ile boyanmış regülatör T hücreleri flow sitometri cihazına okutmak üzere her örnek flow sitometreye uygun 5ml'lik tüpe transfer edildi. Cyto Flex (Beckman Coulter, IN, US) cihazı kullanıldı. Flow sitometri analizi için BD FACSDiva 8.0 yazılımı kullanıldı.

3.11. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı'ndan bir uzman tarafından yapıldı. Hasta ve kontrol grupları arasındaki otofaji düzeylerini karşılaştırmak için Student t-testi kullanıldı. İki grubun istatistiksel analizi ve görselleştirilmesi için R paketinin 3.4.1 sürümü kullanılarak yapıldı. Hastalarda ALSFRS-R yıpranma hızı ve otofaji arasındaki ilişki Spearman Korelasyon testi kullanılarak incelendi. Ayrıca Pearson korelasyon testi, hastalarda ALSFRS-R toplam (ALSFRS-R total) ile otofaji arasındaki korelasyonu incelenmesi için kullanıldı. Hızlı ilerleyen ALS ve yavaş ilerleyen ALS hastaları arasında otofaji düzeyindeki herhangi bir

farkı değerlendirmek için FoxP3+LC+ hücrelerde Student t-testi uygulandı (değerler normal dağılım gösterdiği için), FoxP3+LC- hücrelerinde Mann-Whitney U testi uygulandı (değerler normal dağılım göstermediği için) kullanılmıştır.



4. BULGULAR

ALS hastaları ile ALS olmayan sağlıklı kontroller arasında FoxP3+ regülatör T hücrelerinin otofaji seviyelerini karşılaştırdık. Bu amaçla hastaların ve kontrol grubunun FoxP3+ regülatör T hücresinde otofaji belirteci olarak LC3 proteini araştırıldı. FoxP3, aktif ve fonksiyonel regülatör T hücresinde çok önemli bir belirteçtir.

4.1. Western Blot İçin Protein Ölçümü

Projemizde, otofaji belirteci olarak LC3 proteinin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi ve hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırılması sonucunda otofaji seviyesinin hasta ve kontrol arasında belirlenmesi planlanmıştı. Dolayısıyla periferik kandan mononükleer hücre elde ettikten sonra regülatör T hücre izolasyonu gerçekleştirildi ve ardından protein izolasyonu gerçekleştirildi. Yapılan Brad Ford ölçüm sonucunda örneklerin yaklaşık %40'ında anlamlı ölçüde protein elde edilemediği saptandı (Tablo 3.2).

Yapılan jellerde proteinlerin yürütülmesi çalışmalarında protein tesbit edilemedi. Bu sonucun protein miktarının çok düşük olmasından kaynaklandığı değerlendirildi ve daha hassas bir yöntem olarak flow sitometri çalışması ile devam edildi.

4.2. Flow Sitometri

FoxP3+ regülatör T hücresinde otofaji seviyesini flow sitometri ile incelemek amacıyla elde edilen Tregler flow sitometriye uygun FoxP3 ve LC3 antikorları ile boyandı, daha sonra cihazda incelendi.

Flow sitometrisinde iki hücre grubu araştırıldı: FoxP3+ LC3+ regülatör T hücre grubu ve FoxP3+ LC3- regülatör T hücreleri. FoxP3+ LC3+ hücreleri aktif otofajiye sahip (otofajik) regülatör T hücresini gösterirken FoxP3+ LC3- hücreleri, inaktif otofajiye sahip (otofajik olmayan) regülatör T hücresini göstermektedir.

4.3. Hasta ve Kontrol Grubunda FoxP3+ Regülatör T hücresinde Otofaji Seviyesi

Hasta ve kontrol grupları arasındaki otofaji düzeyleri bu iki hücre grubu inceleyerek karşılaştırıldı (Tablo 4.1 ve 4.2). FoxP3+ LC3+ regülatör T hücrelerinin sayısı hasta grubunda ortalama 0,47 iken, kontrol grubunda ise 0,45 olarak tespit edildi (Şekil 4.1). Hasta grubunda otofaji düzeyinin biraz daha yüksek olduğu gözlenirken aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). FoxP3+ LC3-regülatör T hücrelerinin ortalama değeri hasta grubunda 0,15, kontrol grubunda 0,20 idi. Kontrollerde otofajik

olmayan hücre sayısı hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ve hasta grubunda otofajik olmayan hücre sayısı kontrole kontrol grubuna göre daha düşüktü, bu da hasta grubunda otofajinin daha aktif olduğunu gösteriyor. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup $p=0,030$ ($p<0,05$) olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).

4.4. Foxp3+ Regülatör T hücresindeki Otofaji Seviyesi ve ALS İlerlemesi

FoxP3+ regülatör T hücresindeki otofaji seviyesinin ALS ilerlemesi ve şiddetindeki rolünü anlamak için hastalardaki otofaji seviyesi ile ALSFRES-R düşüş oranını karşılaştırdık ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (Şekil 4.3. ve 4.4). Diğer taraftan, hastalardaki otofaji düzeylerini ve ALSFRS-R toplamını incelediğimizde ALSFRS-R toplamı ile otofaji arasında ters korelasyon saptandı ($p=0,29$ ve $r=0,027$) (şekil 4.5 ve 4.6). Ayrıca FoxP3+ regülatör T hücresinde otofaji seviyesinin rolünü ve hastalığın ilerleme hızını anlamak için hızlı ilerleyen ve yavaş ilerleyen hastalarda otofaji seviyelerini karşılaştırdık ancak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.7 ve 4.8).

Bir hasta ve kontrol için temsili sitogramlar sunulmuştur (şekil 4.9 ve 4.10).

Tablo 4.1. Hasta grubunun klinik bilgileri flow sitometri sonuçları

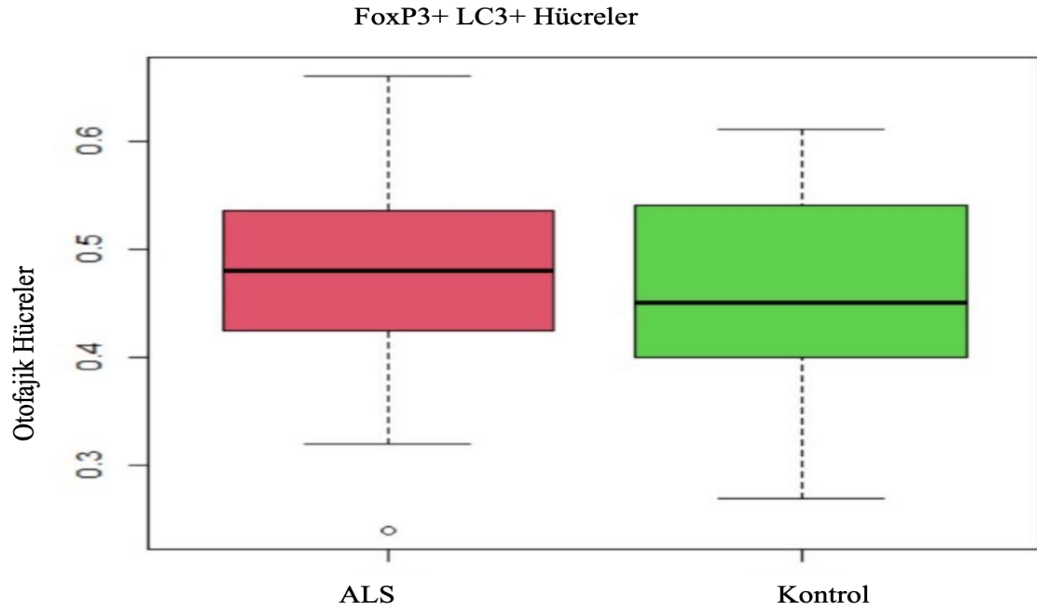
Sayı	Erkek/ Kadın	Yaş	Süre (ay) *	Spinal/ Bulbar	Genetik Testi	Tanı	ALSFRS-R Toplam	ALSFRS-R Düşüş oranı	Foxp3+ LC3+	Foxp3+ LC3-	Hızlı/ Yavaş	MiTos puanı	King puanı
1	E	47	63	Spinal	Yapılmadı	Olası	28	0,4	0,53	0,1	Y	0	3
2	E	57	14	Bulbar	C9orf72: negatif	Muhtemel	40	0,9	0,62	0,16	H	0	2
	E	64	13	Spinal	C9orf72: negatif	Olası- laboratuvar destekli	43	0,6	0,46	0,23	H	0	2
4	E	53	9	Spinal	C9orf72: negatif WES analizi: negatif	Olası- laboratuvar destekli	42	1,2	0,58	0,15	H	0	1
5	K	51	8	Bulbar	C9orf72: negatif OPTN: pozitif	Olası	18	4,0	0,57	0,1	H	1	2
6	K	49	4	Spinal	C9orf72: negatif HEXB: pozitif	Olası	44	1,0	0,66	0,07	Y	0	1
7	K	61	147	Spinal	C9orf72: negatif SOD1: pozitif	Kesin	26	0,2	0,48	0,14	Y	1	3
8	E	49	35	Spinal	Yapılmadı	Olası- laboratuvar destekli	43	1,4	0,35	0,14	H	0	2
9	E	69	12	Spinal	C9orf72: negatif	Olası	28	3,1	0,45	0,14	H	2	3
10	E	52	49	Spinal	Yapılmadı	Olası	43	0,1	0,35	0,15	Y	0	2
11	E	77	9	Bulbar	C9orf72: negatif	Kesin	38	0,3	0,5	0,21	Y	1	1
12	E	45	30	Bulbar	C9orf72: negatif WES analizi: negatif	Olası	44	0,4	0,44	0,18	Y	0	2
13	K	52	65	Spinal	Yapılmadı	Olası	37	0,2	0,54	0,13	Y	0	2
14	E	67	40	Spinal	C9orf72: negatif FIG4: pozitif	Kesin	38	0,2	0,5	0,13	Y	0	2
15	K	42	9	Spinal	C9orf72: negatif	Kesin	36	1,4	0,47	0,18	Y	0	2

16	K	64	40	Spinal	C9orf72: negatif WES analizi: negatif	Olası	41	0,0	0,63	0,12	Y	0	2
17	K	54	54	Spinal	C9orf72: negatif	Kesin	41	0,1	0,41	0,2	Y	0	2
18	K	52	12	Spinal	C9orf72: negatif OPTN: pozitif	Olası	37	0,9	0,24	0,25	H	0	2
19	K	52	34	Bulbar	C9orf72: negatif	Kesin	33	0,5	0,32	0,19	H	2	2
20	E	74	84	Spinal	C9orf72: negatif	Kesin	43	0,2	0,46	0,13	Y	0	2
21	K	66	40	Spinal	C9orf72: negatif	Olası- laboratuvar destekli	43	0,3	0,51	0,13	Y	0	3
22	E	56	33	Spinal	C9orf72: negatif SOD1: pozitif	Kesin	26	0,8	0,52	0,15	H	2	3
23	E	59	22	Spinal	Yapılmadı	Kesin	38	0,4	0,32	0,29	Y	1	1

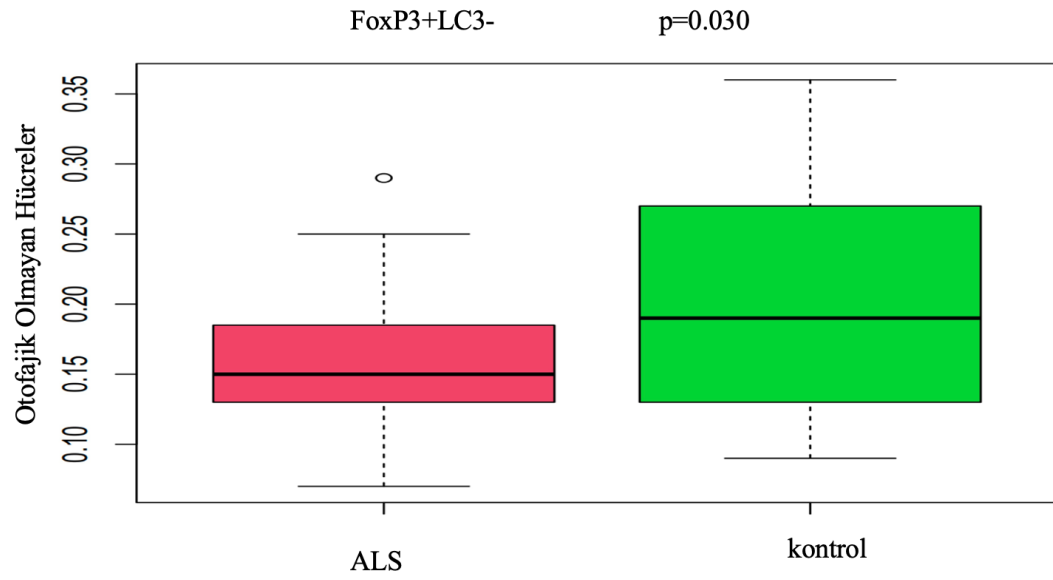
*- Süre ilk belirtilerden örnekleme zamanına kadar kapsamaktadır

Tablo 4.2. Kontrol grubunun yaş ve cinsiyet bilgileri ve flow sitometri sonuçları

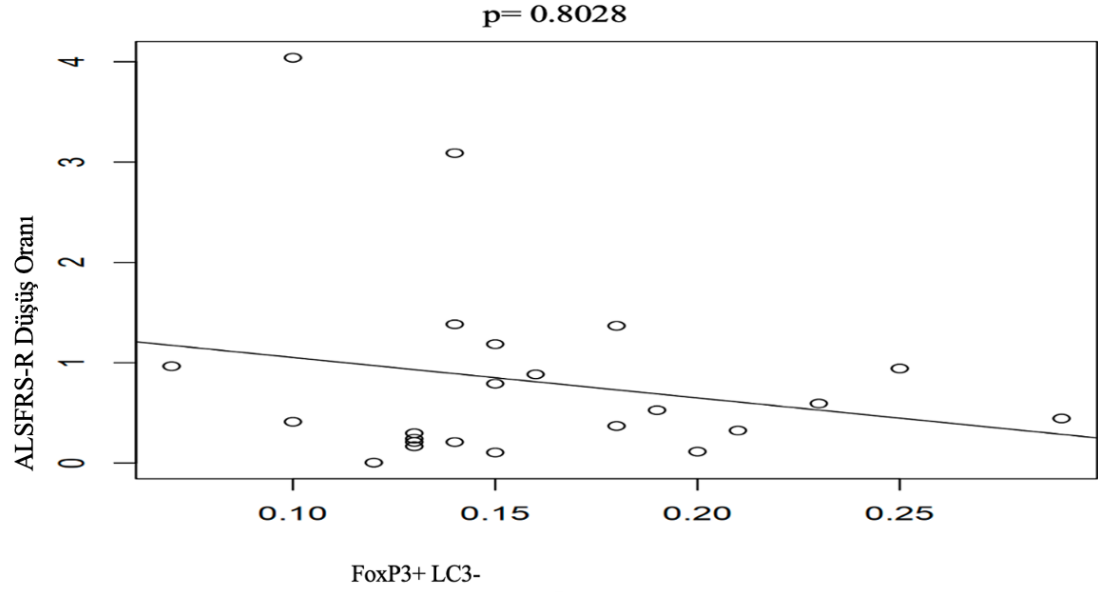
Sayı	Yaş	Cinsiyet (Erkek/Kadın)	Otofajik Hücreler (FoxP3+ LC3+)	Otofajik Olmayan Hücreler (FoxP3+ LC3-)
1	43	E	0.54	0.09
2	44	E	0.37	0.18
3	40	E	0.51	0.15
4	40	E	0.53	0.25
5	42	K	0.59	0.09
6	58	K	0.54	0.1
7	54	E	0.41	0.28
8	54	E	0.35	0.2
9	52	E	0.4	0.16
10	54	E	0.47	0.24
11	59	K	0.54	0.22
12	50	K	0.45	0.15
13	63	E	0.56	0.24
14	70	E	0.47	0.13
15	63	E	0.36	0.36
16	65	E	0.61	0.11
17	67	E	0.45	0.13
18	64	K	0.41	0.16
19	49	K	0.55	0.13
20	62	K	0.58	0.19
21	46	E	0.41	0.27
22	33	K	0.34	0.32
23	54	E	0.36	0.28
24	32	E	0.27	0.35



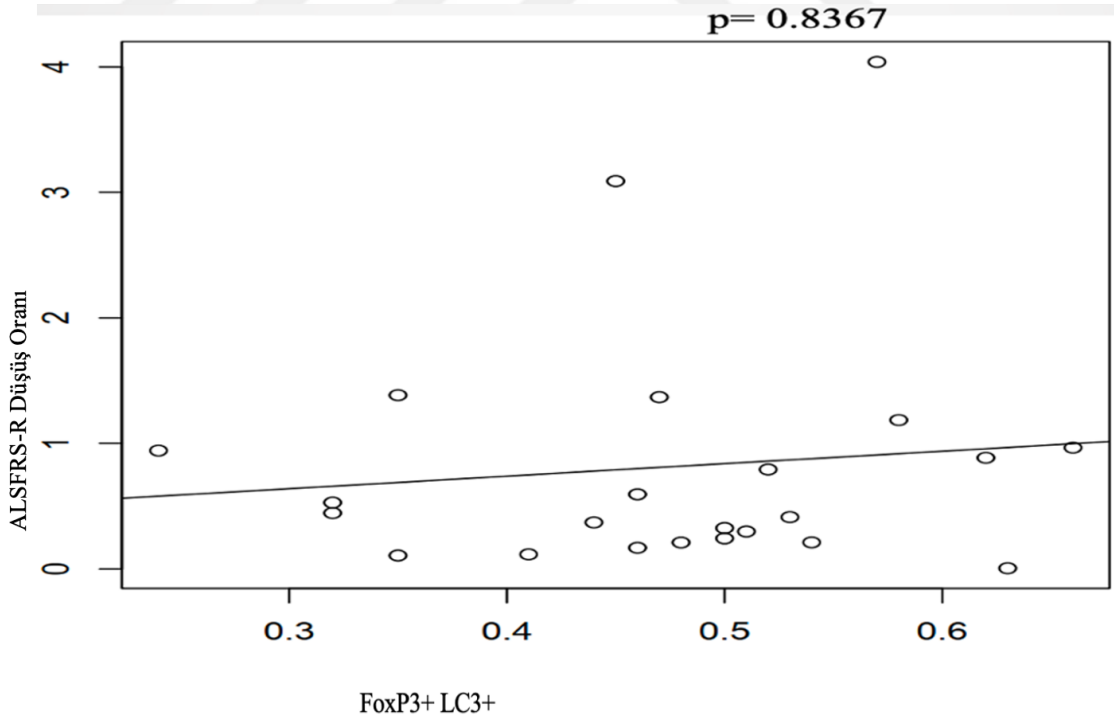
Şekil 4.1. Hasta ve kontrollerde otofajik hücre seviyesi



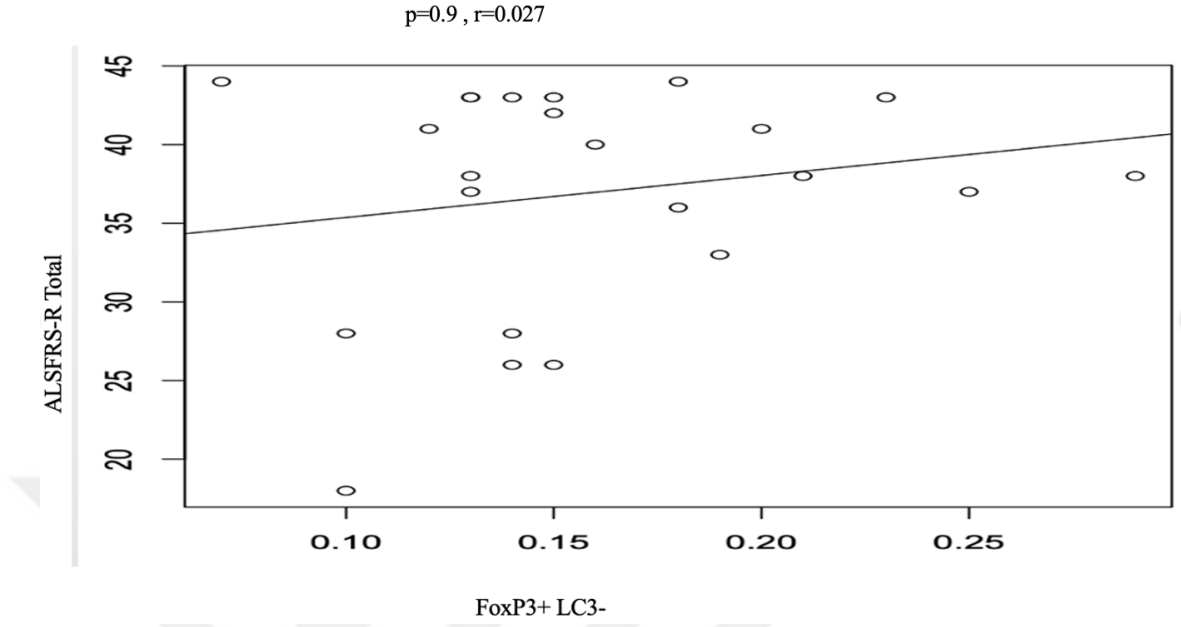
Şekil 4.2. Hasta ve kontrollerde otofajik olmayan hücre seviyesi



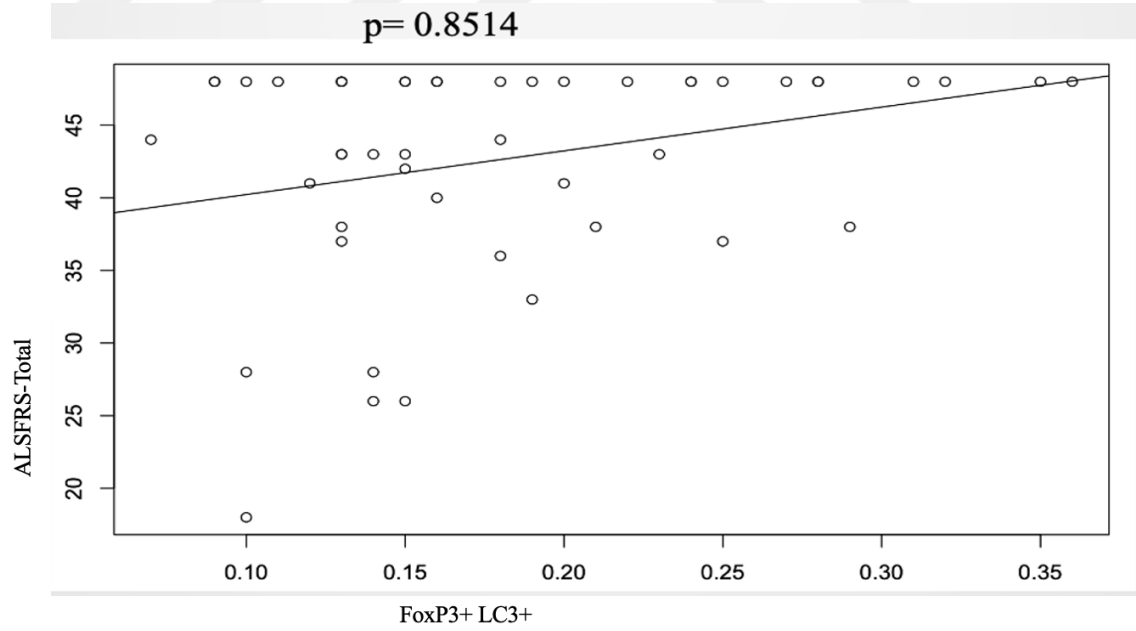
Şekil 4.3. ALS hastalarında otofajik olmayan hücrelerin oranı ve ALSFRS-R düşüş oranı arasındaki korelasyon



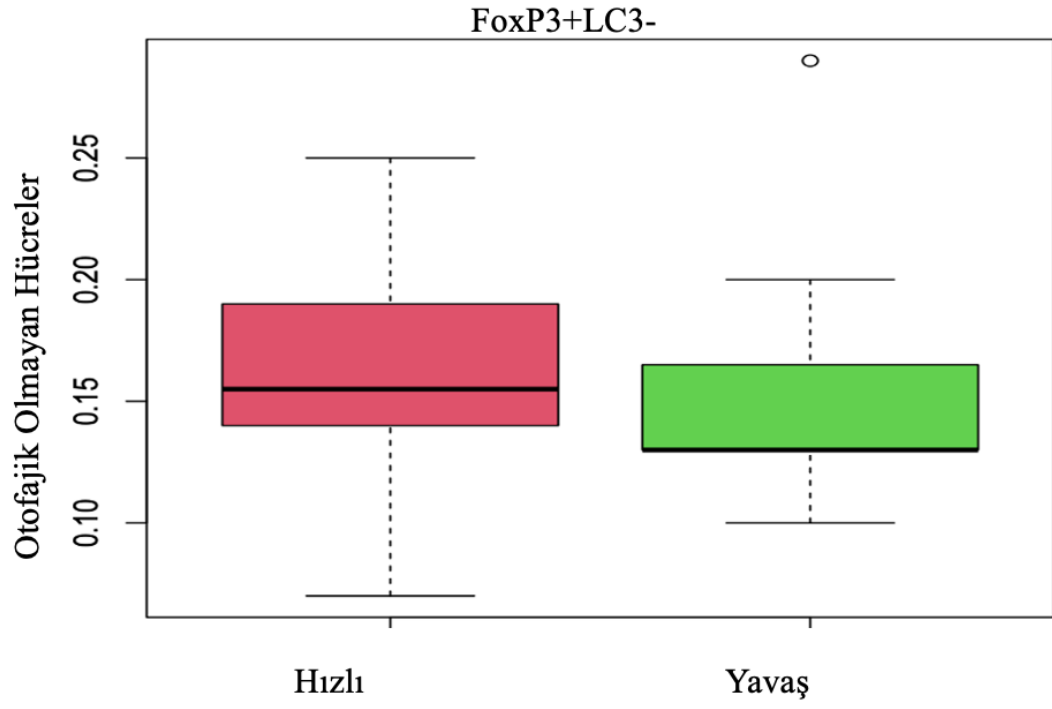
Şekil 4.4. ALS hastalarında otofajik hücrelerin oranı ve ALSFRS-R düşüş oranı arasındaki korelasyon



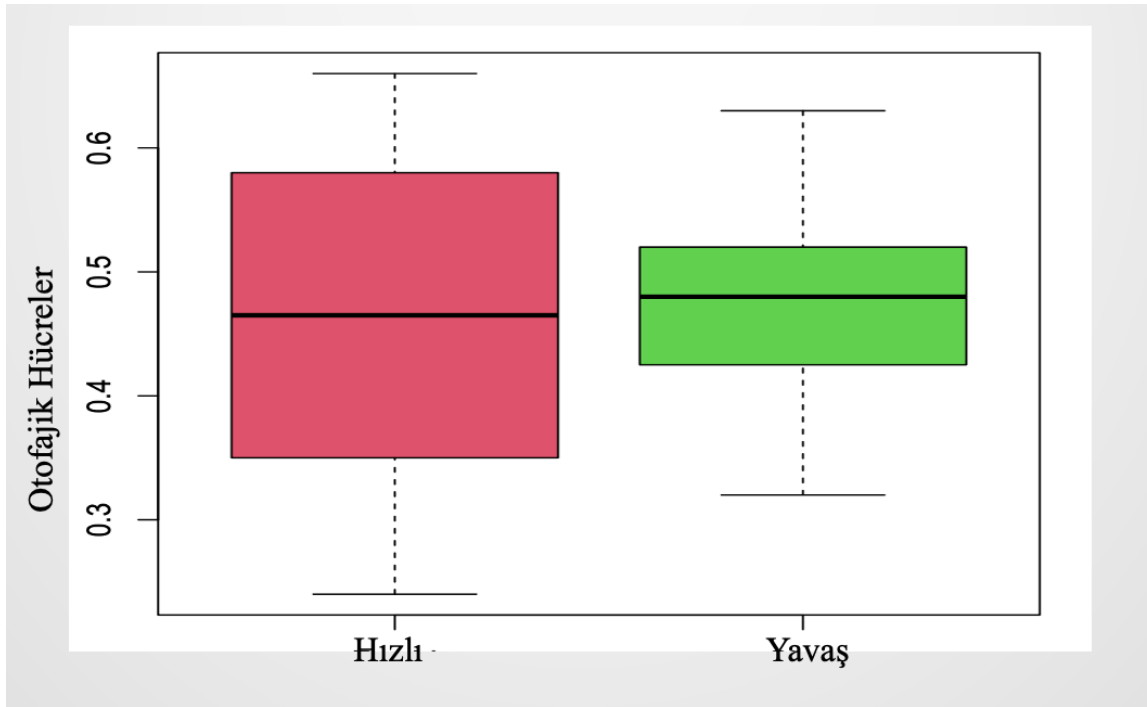
Şekil 4.5. ALS hastalarında otofajik olmayan hücrelerin oranı ve ALSFRS-R toplam oranı arasındaki korelasyon



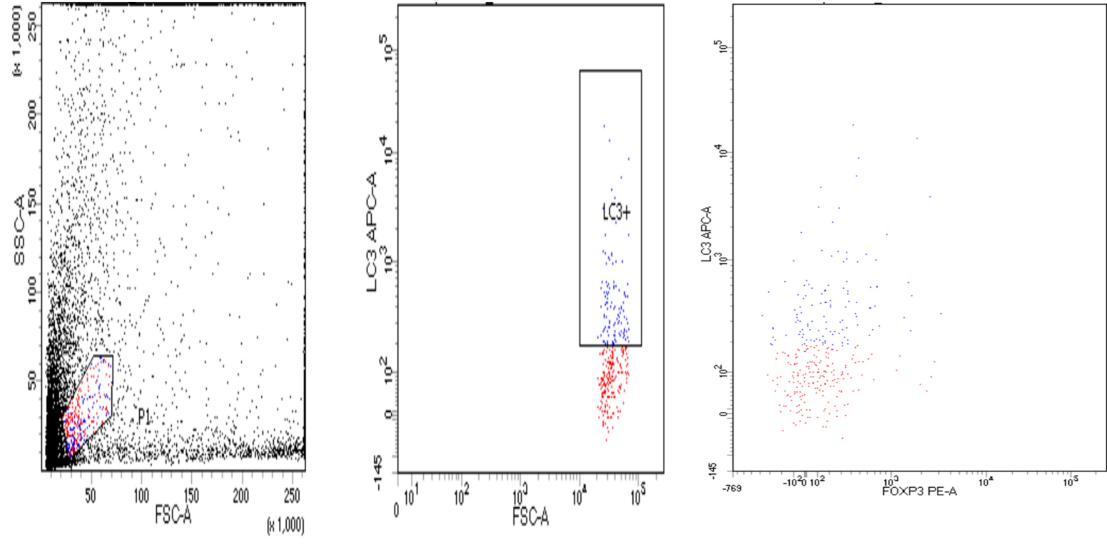
Şekil 4.6. ALS hastalarında otofajik hücreler oranı ve ALSFRS-R toplam oranı arasındaki korelasyon



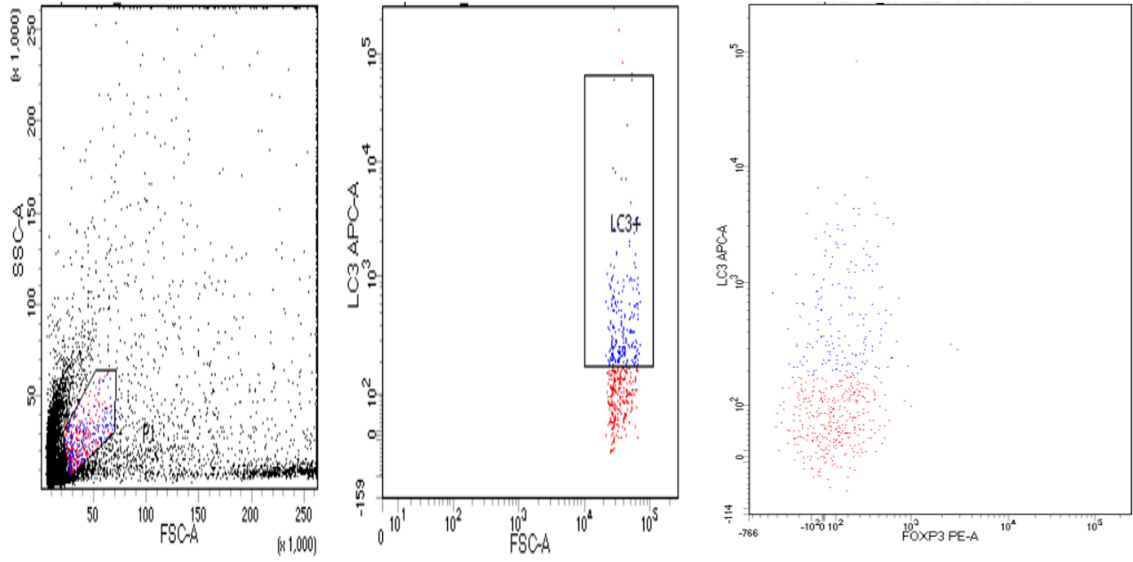
Şekil 4.7. Hızlı ve yavaş ilerleyen hasta grubunda otofajik olmayan hücrelerin seviyesi



Şekil 4.8. Hızlı ve yavaş ilerleyen hasta grubunda otofajik hücrelerin seviyesi



Şekil 4.9. Hasta bireyde sitogram örneği



Şekil 4.10. Kontrol bireyde sitogram örneği

5. TARTIŞMA

5.1. ALS Hastasında Regülatör T hücrelerinin Otofaji Durumu

ALS hastalığında birden fazla mekanizma ve yolak yer aldığından çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilir (7,8). Son zamanlarda, ALS'nin patofizyolojisinde regülatör T hücrelerinin (Treg'ler) önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Nöroinflamasyon, birçok nörodejeneratif hastalığın ayırt edici özelliğidir ve üst ve alt motor nöronları seçici olarak yok ederek ölümle sonuçlanan bir hastalık olan ALS patolojisinin önemli bir parçasıdır. ALS, prognozları farklı seyreden heterojen bir hastalıktır ve nöroinflamasyon patolojik bir özellik olmasına rağmen, patojenik süreçteki rolü farklı açılardan hala bilinmemektedir. (Appel ve ark., 2010; Zhao ve ark., 2013)

ALS hastalarının merkezi sinir sisteminde, muhtemelen artan kemokin C-C motifi ligand 2 (CCL2) seviyeleri ve mikrogliya'nın morfolojik aktivasyonu ile ilişkili T lenfositlerin periferaldan merkezi sinir sistemine infiltrasyonu artmaktadır. Nöroinflamasyon, hem transgenik kemirgen modellerde hem de hastalarda ALS'nin patolojik bir özelliğidir ve proinflamatuvar T lenfositleri ve aktive edilmiş makrofajlar/mikrogliya ile karakterize edilir. ALS fare modellerinde, azalmış regülatör T lenfositler (Treg'ler) nöroinflamatuvar süreci şiddetlendirerek motor nöron ölümünün hızlanmasına ve hayatta kalma süresinin kısılmasına yol açması ile ilişkilendirilmiştir (Beers ve ark., 2017; Thonhoff ve ark., 2018b).

Bizim hipotezimize göre ALS hastalarında regülatör T hücrelerinin azalması ve işlev kaybı otofaji düzensizliği ile korelasyon gösterebilmektedir. Bu araştırmada ise otofaji düzensizliğinin, regülatör T hücrelerinin kaybında olası rolü incelendi. Bu doğrultuda, hasta ve kontrol grubu seçildi, hastalar klinik açıdan hastalığın ileri evresinde değildi. King'in evreleme sistemine göre yalnızca dört hastanın 3 puan gösterdiği, geri kalan hastaların ise 3'ün altında puan gösterdiği kaydedildi. MiTos evrelemesi de benzer sonuçlar ortaya koydu; hastalardan sadece ikisinin puanı 2, üçünün puanı 1, geri kalanların puanı ise 0 idi. Hastaların hiçbiri PEG kullanmıyordu. Bu bulgular gözönüne alındığında hastaların hastalığın ileri evresinde olmadığı değerlendirilmiştir. Kontrol grubu da akraba olmayan

ve hasta grubunun cinsiyet ve yaş açısından yakın özellik gösteren kişilerden oluşturuldu. Projede ALS'den kaynaklanan immün değişikliklerine başka sebeplerin yol açmasına ekarte etmek amacı ile hastalar ve kontrol gruplarından kan alındığında kronik veya geçici enfeksiyon bulunmaması dikkate alındı. Kan alındıktan sonra ilk aşamada regülatör T hücreleri CD4 + CD25 + CD127low kit ile izole edildi, sonra FoxP3 markeri ile boyandı. Elde edilen FoxP3+Regülatör T hücrelerinden protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford analizi ve jel sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen protein seviyesinin çok az veya saptanamayacak seviyelerde olduğu görüldü. Bu sorunun regülatör T sayılarının çok düşük olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca, daha fazla regülatör T hücre elde etmek için projeden B planı olan taze kandan mononükleer hücre elde edildi ve dondurmadan regülatör T hücre elde edilmesi çalışması gerçekleştirildi. Bu çalışma ile dondurulmuş mononükleer hücrelerden elde edilen ve dondurmadan kullanılan mononükleer hücrelerden elde edilen Treg hücrelerinin miktarları karşılaştırıldığında herhangi bir fark bulunmadı. Regülatör T hücreleri lenfositlerin yaklaşık %3-%5'ni oluşturmaktadır, bu nedenle bizim projemizde de örneklerin yaklaşık %40'ında yeterli miktarda protein elde edilmedi.

Flow sitometri çalışması için FoxP3 ve LC3 antikorları kullanıldı. Sonuç olarak FoxP3+ LC3+ hücre popülasyonu oranı, FoxP3+ LC3- hücre oranı saptandı. FoxP3+ LC3+ hücre popülasyonu otofajisi aktif olan (otofajik) regülatör T hücrelerini göstermektedir. FoxP3+ LC3- hücreler, otofajisi aktif olmayan (otofajik olmayan) regülatör T hücreleri göstermektedir. Bu hücre popülasyonlarının her ikisi de otofaji seviyesi hakkında bilgi vermektedir.

FoxP3+ LC3+ hücre popülasyonu (otofajik hücreler) oranı hasta ve kontrol grupları arasında farklı bulundu. Ortalama olarak FoxP3+LC3+ hücreleri hasta grubunda 0,47, kontrol grubunda ise 0,45 olarak tespit edildi ve bu da hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek bir otofaji düzeyine işaret ediyor. Ancak hasta ve kontrol grubu arasında FoxP3+LC3+ hücre popülasyonundaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). (Şekil 4.1). P değerinin büyük çıkması örneklem sayısından kaynaklanmış olabilir. Daha fazla kontrol ve hasta örneklerinin dahil edilmesi ile istatistiksel olarak daha net sonuçların elde edilmesi ön görünmektedir. Öte yandan FoxP3+LC3- hücre (otofajik olmayan)

popülasyonunda hasta ve kontroller arasında anlamlı fark gözlemlendi (Şekil 4.2). Bu oran hasta grubunda 0,15, kontrol grubunda ise 0,20 olarak bulundu. Bu durum hasta grubunda otofajik olmayan hücrelerin kontrol grubuna göre daha az olduğunu, hasta grubunda otofaji düzeyinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Hasta ve kontrol grupları arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu, $p=0,03$ ($p<0,05$). Bu verilere dayanarak ALS hastalarında otofajinin düzensiz olduğu sonucuna varabiliriz. ALS hastalarında otofaji seviyesi artar ve bu FoxP3+regülatör T hücrelerinin hayatta kalmasını olumsuz olarak etkileyebilir.

5.2. ALS’de FoxP3+ Regülatör T hücresinde Otofaji Düzensizliği Nasıl Etki Gösterebilir?

Otofajinin, hücre homeostazisi ve besin açlığı, enerji tükenmesi, endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres ve hipoksi gibi çevresel stres koşullarına adaptasyon için temel bir fonksiyon olduğu kabul edilmiştir (Kroemer ve ark., 2010; Ryter ve ark., 2013; W Ryter ve ark., 2013; Nakahira ve ark., 2014). Ayrıca otofaji, patojen enfeksiyonlarına karşı direnç de dahil olmak üzere doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık mekanizmalarında hayati bir rol oynar (Deretic ve ark., 2009; Sumpter Jr ve ark., 2010; Levine ve ark., 2011). Homeostatik rollerine rağmen, otofajinin artık hücre ölümü programlarında karmaşık ve tam olarak anlaşılmayan roller oynadığı kabul edilmektedir. Ayrıca, otofajinin moleküler düzenlenmesi ile hücre ölümünün diğer düzenlenmiş formları arasında önemli bir karşılıklı etkileşim vardır (Galluzzi ve ark., 2008) (Maiuri ve ark., 2007; Kroemer ve ark., 2008). Son çalışmalarda, otofajinin belirli hastalıklarda hem adaptif hem de zararlı çok işlevli roller oynayabileceğini göstermektedir. Otofaji düzensizliği belli hastalıklarda patojenik bir rol oynayabilir (Levine ve ark., 2008; Mizushima ve ark., 2008; Choi ve ark., 2013). İnsan hastalığının patogenezi açısından otofaji, apoptoz, düzenlenmiş nekroz ve diğer hücre ölümü modları arasındaki dinamik dengede çok önem taşımaktadır. Diğer taraftan, piroptoz ve otofaji arasındaki regülasyon, inflamatuvar hastalıklarda ve otoimmün hastalıklarda çok önem taşımakta ve bu konunun daha iyi aydınlatılması için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Bortoluci ve ark., 2010). Otofajinin, hücre sağkalımı ve hücre ölümünde ikili bir rol oynuyor olması dikkate değerdir. "Otofajik hücre ölümü" terimi, programlanmış hücre ölümünün morfolojik olarak apoptozdan farklı ve "hücre sel"

otofajinin aşırı düzeylerinden sonuçlandığı varsayılan bir hücre ölüm biçimini tanımlar (Schweichel ve ark., 1973). Klasik apoptozda veya tip I programlanmış hücre ölümünde, hücre iskeleti öğelerinde erken çöküş vardır, ancak organellerin süreç içinde geç bir zamana kadar korunması görünmektedir. Buna karşın, otofajik hücre ölümünde veya tip II programlanmış hücre ölümünde, organellerde 'erken' bozunma vardır, ancak hücre iskeleti öğelerinin son aşamalara kadar korunması gözlenmektedir. Oysa "apoptotik" hücre ölüm" kaspaz bağımlıdır ve "internükleozomal" DNA "klevaj", "kaspaz" aktivasyonu" ve "DNA" parçalanma ile karakterize edilir (Levine ve ark., 2005). Son çalışmalar, otofaji yolağının hücre ölümünde rol oynadığına genetik kanıtı sağlar. RNA interferans (RNAi) vasıtasıyla 2 otofaji geni, atg7 ve beclin 1 fare L929 hücrelerinde susturulmuş ve sonuç olarak hücre ölümü engellenmiştir. Ayrıca, başka bir çalışmada atg5 ve beclin 1 otofaji genleri RNAi yöntemi ile susturulmuş ve böylece hücre ölümü bax^{-/-}, bak^{-/-} murin embriyonik fibroblast (MEF) hücrelerinde bloke edilmiştir (Shimizu S. ve ark., 2004).

Programlanmış hücre ölümü (PCD), geri dönüşü olmayan şekilde hasar görmüş, gereksiz ve/veya potansiyel olarak zararlı hücrelerin ortadan kaldırılması için veya gelişim sırasında hücrelerin programlı olarak ortadan kaldırılması için genetik olarak kodlanmış mekanizmaların neden olduğu hücre ölümünü ifade eder. PCD, yararsız veya (potansiyel olarak) zararlı hücreleri ortadan kaldırmak veya ölmekte olan hücrelerin organizmayı veya koloniyi bir tehdit hakkında uyaran molekülleri salmasına izin vermek için bir organizma veya koloni düzeyinde çalışır (Galluzzi ve ark., 2018; Jung ve ark., 2020). Son araştırmalar, otofajinin birden fazla PCD türünde önemli veya kolaylaştırıcı bir rol oynadığını göstermiştir. Hücre ölümü adlandırma komitesi'ne göre, otofajiye bağlı hücre ölümü (ACD), otofaji mekanizmasına veya bunların bileşenlerine dayanan bir PCD türü olarak tanımlanır. Otofajiye bağlı hücre ölümüne ek olarak, otofaji ferroptoz, FAS güdümlü ekstrinsik PCD ve nekroptoz sürecini de kolaylaştırır (Galluzzi ve ark., 2018).

Bizim bulgularımıza göre ALS hastalarında, FoxP3⁺ regülatör T hücresinde, otofaji seviyesi kontrollere göre anlamlı bir şekilde artmaktadır. Bu aşırı otofaji FoxP3⁺ regülatör T hücrelerinin ölümüne sebep olabilmektedir. Regülatör T hücrelerinin kaybı

norön hücrelerinde hücre homeostezisi kaybı ve noröinflamasyonun ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

5.3. ALS'de Regülatör T Hücresinde Otofaji Düzensizliği Hastalığın Seyrini Etkiler mi?

En önemli sorulardan biri FoxP3+ regülatör T hücresinde otofaji düzensizliğinin ALS hastalığının seyrini etkileyip etkilemediğidir. FoxP3+ regülatör T hücresinde otofaji düzensizliği ALS hastalığının seyrini nasıl etkilediğini araştırmak amacıyla hasta grubu ALSFRS-R düşüş hızına göre iki alt gruba bölündü. Hızlı ilerleme gösteren grup ve yavaş ilerleme gösteren grup. Hızlı ilerleyen hasta grubunda, ayda 0,5 ALSFRS-R düşüş hızı puanına eşit veya daha yüksek bir hızla puan kaybeden hastalar yer alırken, yavaş ilerleyen hasta grubunda, ayda 0,5 ALSFRS-R düşüş hızı puanından daha az bir hızla ilerleyen hastalar olarak tanımlandı (Tablo 4.1). Bu kritere göre 13 hastada hastalığın seyri yavaş olarak saptandı ve 10 hastada hastalığın seyri hızlı olarak belirlendi. Otofaji düzeyi iki grup arasında incelendi (Şekil 4.7 ve 4.8) Otofaji seviyesinin hızlı ilerleme gösteren hastalar ve yavaş ilerleme gösteren hastalar arasında anlamlı bir şekilde farklı olmadığı tesbit edildi. Aynı soruyu cevaplamak için ALSFRS-R düşüş oranı ve otofaji seviyesi arasındaki korelasyon incelendi. ALSFRS-R düşüş oranı hastalığın ilerlemesi ve nöronlara verdiği zarar ile ilgili bir değerdir. Yapılan korelasyon analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (Şekil 4.3 ve 4.4). Ayrıca, ALSFRS-R toplam değeri ve otofaji seviyesi arasındaki korelasyon da incelendi, bu analizde ALSFRS-R toplam ve hastalığın hızı ile ters bir korelasyonun var olduğu tesbit edildi ($p=0,29$ ve $r= 0,027$) (şekil 4.5). Yani otofaji azalınca ALSFRS-R toplam değeri artmaktadır (otofajik olmayan hücre artışı otofaji düşüşü işareti olarak değerlendirildi). ALSFRS-R toplam sağlıklı bireyde 48 olarak kabul edilmektedir. Ve bu değer düşüncede daha kötü prognoza işaret etmektedir.

Kısaca, ALS hastalığında hayati immün tolerans faktörleri ve nöroinflamasyon inhibitörleri olan regülatör T hücrelerinin aşırı otofaji düzensizliğine bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Bu düzensizlik FoxP3+ regülatör T hücrelerinin otofajik ölümüne yol açabilir. Proinflamatuvar sitokinler antiinflamatuvar sitokinlere göre daha fazla artıp nöroinflamasyonu hızlandırır. Dolayısıyla FoxP3+ T hücrelerinde otofaji düzensizliği

ALS patofizyolojisinin bir parçası olabilir (Şekil 6.1). Ancak ALS hastalığında FoxP3+ regülatör T hücrelerinde otofaji düzensizliği ve hastalığın seyri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. Hastalarda ALSFRS-R toplamı ile otofaji düzeyi arasındaki korelasyon anlamlı olmasına rağmen ($p=0,29$ ve $r= 0,027$), bu korelasyon yalnızca otofaji düzensizliğine atfedilemeyebilir, çünkü ALSFRS-R toplamı aynı zamanda hastalık süresi ve hastalık süresi gibi diğer faktörlerden de etkilenir.

Gen mutasyonu taşıyan hastalar ve mutasyon taşımayan hastalar arasında regülatör T hücrelerinin otofajisi açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir.

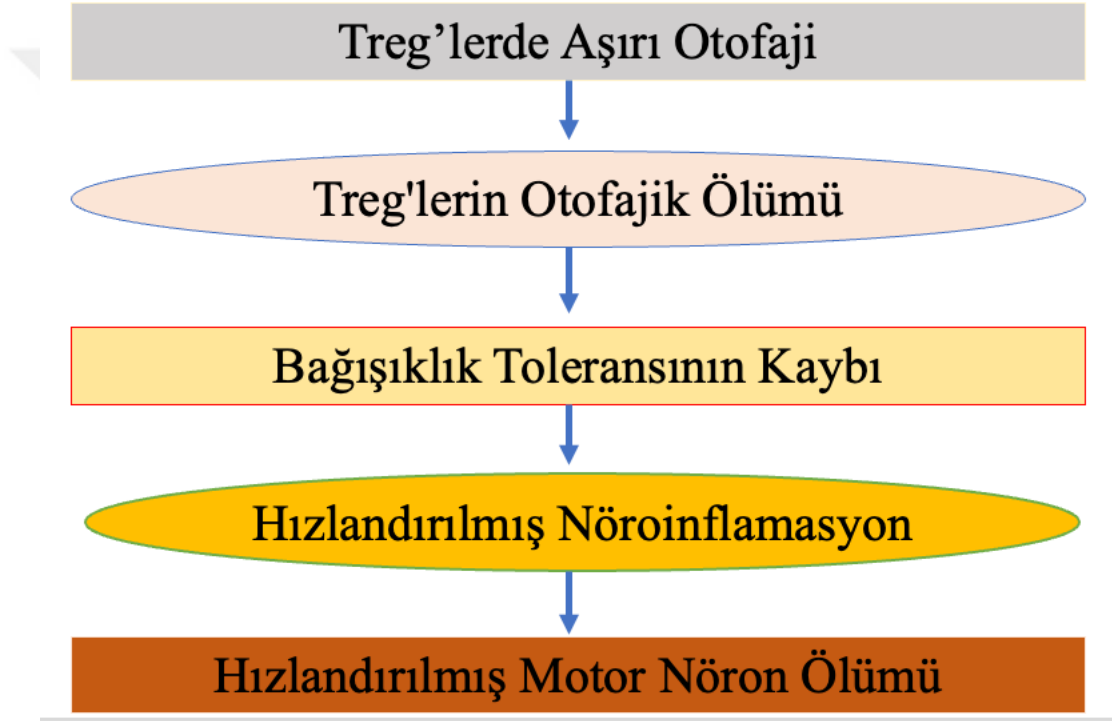


6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmanın verilerine göre otofaji seviyesi ALS hastalarının FoxP3+ regulator T hücrelerinde sağlıklı kontrol bireylerine göre, düzensizlik göstermektedir. Otofaji hücrelerin sağkalımı için vazgeçilmez bir metabolik olaydır. FoxP3+ regülâtör T hücreler immün tolerans için çok önemli rol oynamaktadır. ALS hızlı ilerleme gösteren hastalarda regülâtör T hücrelerin azalması ve fonksiyon kaybı daha önce kanıtlanmıştır. Bu araştırma verileri otofaji düzensizliğinin regülâtör T hücrelerinin ölümü ve azalması için bir neden olma olasılığını göstermektedir. Regülâtör T hücresindeki aşırı otofaji, bu hücrelerin otofajik ölümüne yol açabilir. Regülâtör T hücresinin kaybı, nöroinflamasyon gelişimine ve daha fazla motor nöron ölümüne neden olur ve ALS hastalığına yol açar. Sonuç olarak, FoxP3+ regülâtör T hücresindeki otofaji düzensizliği ALS etiyolojisinin bir parçası olabilir ve hastalığın başlangıcını etkileyebilir. Ancak FoxP3+ regülâtör T hücresinde otofaji düzensizliği ile ALS hastalığının seyri arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır.

Çalışmamız FoxP3+ regülâtör T hücresindeki aşırı otofajinin bu hücrelerin ölümüne yol açabileceğini gösteren ilk çalışmadır. Bu bilgiler, ALS etiyolojisinde otofaji düzensizliğinin önemli rol oynayabileceğini işaret etmektedir. ALS hastalığında, immün toleransında özellikle FoxP3+ regülâtör T hücresinin rolünü vurgulayarak otofaji düzensizliğinin bu hücrelerin kaybında rol oynadığını belirterek, tedavi hedefleri arasında FoxP3+ regülâtör T hücresi otofajisinin değerli bir bulgu olduğuna dikkat çekmek istemekteyiz. Regülâtör T hücrelerinde FoxP3 geninin fonksiyon açısından çok önemli olduğu bilinmektedir. Bazı gen mutasyonları geni işlevsel olarak etkileyebilmektedir. Bu yüzden bundan sonraki araştırmalarımızda FoxP3+ regülâtör T hücresinde otofajide önemli faktörler ve genlerin mutasyon açısından bakılması ve olası mutasyonların da ayrı bir araştırma konusu olarak ele alınması planlanmaktadır. Önceki araştırmalara göre ALS hastalarında bazen FoxP3+ regülâtör T hücreleri işlevsel kayba uğramaktadır. FoxP3 geni regülâtör T hücrelerinin tolerans fonksiyonu için elzem olduğu bilinmektedir. Bu sebeple regülâtör T hücresinde FoxP3 geninde fonksiyon kaybettiren mutasyon ihtimali vardır. Dolayısıyla ALS hastalarında regülâtör T hücresinde FoxP3 geninde mutasyon incelenmesi önem taşıyabilir.

Bulgularımıza göre FoxP3+ regülatör T hücresinde otofaji düzensizliği ALS hastalığında önemli rol oynamaktadır. Regülatör T hücresindeki otofaji düzensizliği farklı sebeplerden kaynaklanabilir. Bu düzensizlik, otofajide önemli genlerin mutasyonundan kaynaklanabilir. Ayrıca otofaji ve apoptoz arasındaki karşılıklı dialoğunda rol oynayan moleküllerden kayanaklanabilmektedir. Bu nedenlerle, bu konuların her birisi ayrı bir araştırma konusu olabilir. Ayrıca, daha fazla sayıda hasta ve kontrol ile çalışılmasının istatistiksel olarak daha avantajlı olacağını değerlendirmekteyiz.



Şekil 6.1. Foxp3+ regülatör T hücresinde otofaji düzensizliği ve als ilişkisi

KAYNAKLAR

- Abe K, Aoki M, Tsuji S, Itoyama Y, Sobue G, Togo M , ve ark. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*. 2017; 16: 505-512.
- Abe K, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M , ve ark. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (mci-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2014; 15: 610-617.
- Al-Chalabi A, Calvo A, Chio A, Colville S, Ellis CM, Hardiman O , ve ark. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: A population-based modelling study. *The Lancet Neurology*. 2014; 13: 1108-1113.
- Algassim A. The role of autophagy in regulatory t cell function and homoeostasis. Harvard University; 2016.
- Andrews JA, Jackson CE, Heiman-Patterson TD, Bettica P, Brooks BR, Pioro EP. Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2020; 21: 509-518.
- Appel SH, Beers DR, Henkel JS. T cell-microglial dialogue in parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis: Are we listening? *Trends in immunology*. 2010; 31: 7-17.
- Appel SH, Beers DR, Zhao W. Amyotrophic lateral sclerosis is a systemic disease: Peripheral contributions to inflammation-mediated neurodegeneration. *Current Opinion in Neurology*. 2021; 34: 765-772.
- Armon C. An evidence-based medicine approach to the evaluation of the role of exogenous risk factors in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2003; 22: 217-228.
- Armon C. Smoking may be considered an established risk factor for sporadic als. *Neurology*. 2009; 73: 1693-1698.
- Aubert A, Pellerin L, Magistretti PJ, Costalat R. A coherent neurobiological framework for functional neuroimaging provided by a model integrating compartmentalized energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104: 4188-4193.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A , ve ark. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*. 2008; 182: 685-701.
- Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in als: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 48: 629-641.
- Beardsley PM, Hauser KF. Glial modulators as potential treatments of psychostimulant abuse. *Advances in pharmacology*. 2014; 69: 1-69.
- Beers DR, Appel SH. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: Mechanisms and emerging therapies. *The Lancet Neurology*. 2019; 18: 211-220.

- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Appel SH. Cd4+ t cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited als. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105: 15558-15563.
- Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Huang A, Wen S , ve ark. Endogenous regulatory t lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2011; 134: 1293-1314.
- Beers DR, Zhao W, Wang J, Zhang X, Wen S, Neal D , ve ark. Als patients' regulatory t lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI insight*. 2017; 2.
- Béland L-C, Markovinovic A, Jakovac H, De Marchi F, Bilic E, Mazzini L , ve ark. Immunity in amyotrophic lateral sclerosis: Blurred lines between excessive inflammation and inefficient immune responses. *Brain Communications*. 2020; 2: fcaa124.
- Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA , ve ark. Fadd and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105: 16677-16682.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, Group ARS. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 1994; 330: 585-591.
- Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of atg4d stimulates gabarap-11 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of cell science*. 2009; 122: 2554-2566.
- Blair IP, Williams KL, Warraich ST, Durnall JC, Thoeng AD, Manavis J , ve ark. Fus mutations in amyotrophic lateral sclerosis: Clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2010; 81: 639-645.
- Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK , ve ark. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory t cells. *Science translational medicine*. 2015; 7: 315ra189-315ra189.
- Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G , ve ark. Onset and progression in inherited als determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006; 312: 1389-1392.
- Bonapace L, Bornhauser BC, Schmitz M, Cario G, Ziegler U, Niggli FK , ve ark. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120: 1310-1323.
- Bortoluci KR, Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: Role of tlr and nlr. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010; 67: 1643-1651.
- Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N , ve ark. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25: 1025-1040.
- Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M , ve ark. Stages of ptdp-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*. 2013; 74: 20-38.

- Brettschneider J, Toledo JB, Van Deerlin VM, Elman L, McCluskey L, Lee VM-Y, et al. Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PloS one*. 2012; 7: e39216.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders*. 2000; 1: 293-299.
- Brown CA, Lally C, Kupelian V, Flanders WD. Estimated prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis and *sod1* and *c9orf72* genetic variants. *Neuroepidemiology*. 2021; 55: 342-353.
- Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2017; 377: 162-172.
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in als. *Annu. Rev. Neurosci*. 2004; 27: 723-749.
- Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded t regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: Safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011; 117: 1061-1070.
- Byrne BG, Dubuisson J-F, Joshi AD, Persson JJ, Swanson MS. Inflammasome components coordinate autophagy and pyroptosis as macrophage responses to infection. *MBio*. 2013; 4: 10.1128/mbio.00620-00612.
- Cai J, Wang S, Du H, Fan L, Yuan W, Xu Q, et al. Ndv-induced autophagy enhances inflammation through *nlrp3/caspase-1* inflammasomes and the *p38/mapk* pathway. *Veterinary Research*. 2023; 54: 43.
- Cebollero E, Reggiori F, Kraft C. Reticulophagy and ribophagy: Regulated degradation of protein production factories. *International journal of cell biology*. 2012; 2012.
- Cha H-H, Hwang JR, Kim H-Y, Choi S-J, Oh S-y, Roh C-R. Autophagy induced by tumor necrosis factor α mediates intrinsic apoptosis in trophoblastic cells. *Reproductive sciences*. 2014; 21: 612-622.
- Chang NC, Nguyen M, Germain M, Shore GC. Antagonism of beclin 1-dependent autophagy by *bcl-2* at the endoplasmic reticulum requires *naif-1*. *The EMBO journal*. 2010; 29: 606-618.
- Charcot JM. Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux anterolateraux de la moelle epiniere. *Archives de Pathologie Normale et Pathologique*. 1869; 2: 744-760.
- Chen S-Y, Maa M-C, Chiu L-Y, Wang J-S, Chien C-L, Lin W-W. Withdrawn: Zvad-induced autophagic cell death requires c-src-dependent erk and jnk activation and reactive oxygen species generation. *Autophagy*. 2010a; 6: 1-1.
- Chen Z-H, Kim HP, Sciruba FC, Lee S-J, Feghali-Bostwick C, Stolz DB, et al. Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one*. 2008; 3: e3316.
- Chen Z-H, Lam HC, Jin Y, Kim H-P, Cao J, Lee S-J, et al. Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3b (*lc3b*) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010b; 107: 18880-18885.
- Chio A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among italian professional football players. *Brain*. 2005; 128: 472-476.

- Chiot A, Lobsiger CS, Boillée S. New insights on the disease contribution of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Current Opinion in Neurology*. 2019; 32: 764-770.
- Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *New England Journal of Medicine*. 2013; 368: 651-662.
- Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS , ve ark. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science*. 2015; 347: 1436-1441.
- Cistaro A, Pagani M, Montuschi A, Calvo A, Moglia C, Canosa A , ve ark. The metabolic signature of c9orf72-related als: Fdg pet comparison with nonmutated patients. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2014; 41: 844-852.
- Contreras AU, Mebratu Y, Delgado M, Montano G, Hu C-aA, Ryter SW , ve ark. Deacetylation of p53 induces autophagy by suppressing bmf expression. *Journal of Cell Biology*. 2013; 201: 427-437.
- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR , ve ark. Dram, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*. 2006; 126: 121-134.
- Crugnola V, Lamperti C, Lucchini V, Ronchi D, Peverelli L, Prella A , ve ark. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*. 2010; 67: 849-854.
- de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J , ve ark. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of als. *Clinical neurophysiology*. 2008; 119: 497-503.
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G , ve ark. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell*. 2006; 10: 51-64.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ , ve ark. Expanded ggggcc hexanucleotide repeat in noncoding region of c9orf72 causes chromosome 9p-linked ftd and als. *Neuron*. 2011; 72: 245-256.
- Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *The EMBO journal*. 2008; 27: 1110-1121.
- Deosaran E, Larsen KB, Hua R, Sargent G, Wang Y, Kim S , ve ark. Nbr1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *Journal of cell science*. 2013; 126: 939-952.
- Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell host & microbe*. 2009; 5: 527-549.
- Desport J-C, Torny F, Lacoste M, Preux P-M, Couratier P. Hypermetabolism in als: Correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegenerative Diseases*. 2006; 2: 202-207.
- Desport JC, Preux P, Truong T, Vallat J, Sautereau D, Couratier P. Nutritional status is a prognostic factor for survival in als patients. *Neurology*. 1999; 53: 1059-1059.
- Di Gioacchino M, Petrarca C, Perrone A, Farina M, Sabbioni E, Hartung T , ve ark. Autophagy as an ultrastructural marker of heavy metal toxicity in human cord blood hematopoietic stem cells. *Science of the total environment*. 2008; 392: 50-58.
- Di Ianni M, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Cantelmi MG , ve ark. T regulatory cell separation for clinical application. *Transfusion and Apheresis Science*. 2012; 47: 213-216.

- Dijke I, Hoeppli R, Ellis T, Pearcey J, Huang Q, McMurchy A , ve ark. Discarded human thymus is a novel source of stable and long-lived therapeutic regulatory t cells. *American Journal of Transplantation*. 2016; 16: 58-71.
- Dorsey ER, Elbaz A, Nichols E, Abbasi N, Abd-Allah F, Abdelalim A , ve ark. Global, regional, and national burden of parkinson's disease, 1990–2016: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *The Lancet Neurology*. 2018; 17: 939-953.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar J-L, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R , ve ark. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008; 70: 1004-1009.
- Dupuis L, Oudart H, René F, de Aguilar J-LG, Loeffler J-P. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101: 11159-11164.
- Endo F, Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. 2016; 7: 126-138.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mtor pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102: 8204-8209.
- Ferraiuolo L, Higginbottom A, Heath PR, Barber S, Greenald D, Kirby J , ve ark. Dysregulation of astrocyte–motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2011; 134: 2627-2641.
- Filipi T, Hermanova Z, Tureckova J, Vanatko O, Anderova M. Glial cells—the strategic targets in amyotrophic lateral sclerosis treatment. *Journal of clinical medicine*. 2020; 9: 261.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of cd4+ cd25+ regulatory t cells. *Nature immunology*. 2003; 4: 330-336.
- Freischmidt A, Wieland T, Richter B, Ruf W, Schaeffer V, Müller K , ve ark. Haploinsufficiency of tbk1 causes familial als and fronto-temporal dementia. *Nature neuroscience*. 2015; 18: 631-636.
- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T , ve ark. An atg4b mutant hampers the lipidation of lc3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell*. 2008; 19: 4651-4659.
- Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C , ve ark. Discovery of a novel type of autophagy targeting rna. *Autophagy*. 2013; 9: 403-409.
- Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends in immunology*. 2007; 28: 12-18.
- Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasdemir E, Maiuri MC, Kroemer G. To die or not to die: That is the autophagic question. *CURRENT MOLECULAR MEDICINE-NETHERLANDS THEN UAE-*. 2008; 8: 78.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P , ve ark. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018; 25: 486-541.
- Ganley IG, Lam dH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. Ulk1· atg13· fip200 complex mediates mtor signaling and is essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 12297-12305.

- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ , ve ark. Pink1/parkin-mediated mitophagy is dependent on vdac1 and p62/sqstm1. *Nature cell biology*. 2010; 12: 119-131.
- Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC. Immune privilege as an intrinsic cns property: Astrocytes protect the cns against t-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators of inflammation*. 2013; 2013.
- Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *Journal of neuroscience*. 1993; 13: 3510-3524.
- Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJC, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K , ve ark. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature immunology*. 2016; 17: 797-805.
- Gravel M, Béland L-C, Soucy G, Abdelhamid E, Rahimian R, Gravel C , ve ark. Il-10 controls early microglial phenotypes and disease onset in als caused by misfolded superoxide dismutase 1. *Journal of Neuroscience*. 2016; 36: 1031-1048.
- Gupta K, Harvima IT. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunological reviews*. 2018; 282: 168-187.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A , ve ark. Astrocytes from familial and sporadic als patients are toxic to motor neurons. *Nature biotechnology*. 2011; 29: 824-828.
- Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W , ve ark. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Disease primers*. 2017; 3: 1-19.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*. 2009; 43: 67-93.
- He C, Levine B. The beclin 1 interactome. *Current opinion in cell biology*. 2010; 22: 140-149.
- Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE , ve ark. Regulatory t-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO molecular medicine*. 2013; 5: 64-79.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory t cell development by the transcription factor foxp3. *Science*. 2003; 299: 1057-1061.
- Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T , ve ark. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- β , and bcl-2. *Molecular cell*. 2007; 25: 193-205.
- Jones MK, Nair A, Gupta M. Mast cells in neurodegenerative disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019; 13: 171.
- Jung S, Jeong H, Yu S-W. Autophagy as a decisive process for cell death. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020; 52: 921-930.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Velde CV , ve ark. Tardbp mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics*. 2008; 40: 572-574.
- Kamel F, Umbach DM, Bedlack RS, Richards M, Watson M, Alavanja MC , ve ark. Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotoxicology*. 2012; 33: 457-462.
- Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA , ve ark. Dynamic association of the ulk1 complex with omegasomes during autophagy induction. *Journal of cell science*. 2013; 126: 5224-5238.

- Kato S, Sumi-Akamaru H, Fujimura H, Sakoda S, Kato M, Hirano A , ve ark. Copper chaperone for superoxide dismutase co-aggregates with superoxide dismutase 1 (sod1) in neuronal lewy body-like hyaline inclusions: An immunohistochemical study on familial amyotrophic lateral sclerosis with sod1 gene mutation. *Acta neuropathologica*. 2001; 102: 233-238.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer P. Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *The American journal of pathology*. 1992; 140: 691.
- Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011; 91: 461-553.
- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O , ve ark. Amyotrophic lateral sclerosis. *The lancet*. 2011; 377: 942-955.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. Ampk and mtor regulate autophagy through direct phosphorylation of ulk1. *Nature cell biology*. 2011; 13: 132-141.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T , ve ark. The reversible modification regulates the membrane-binding state of apg8/aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of cell biology*. 2000; 151: 263-276.
- Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A , ve ark. A role for nbr1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Molecular cell*. 2009; 33: 505-516.
- Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory t cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunological reviews*. 2014; 259: 231-244.
- Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS letters*. 2010; 584: 1374-1378.
- Kretschmer BD, Kratzer U, Schmidt WJ. Riluzole, a glutamate release inhibitor, and motor behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1998; 358: 181-190.
- Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: The story of a misnomer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008; 9: 1004-1010.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*. 2010; 40: 280-293.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T , ve ark. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*. 2004; 432: 1032-1036.
- Kwiatkowski Jr T, Bosco D, Leclerc A, Tamrazian E, Vanderburg C, Russ C , ve ark. Mutations in the fus/tls gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2009; 323: 1205-1208.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh P, Guillet P, Powe L, Durrleman S , ve ark. A confirmatory dose-ranging study of riluzole in als. *Neurology*. 1996; 47: 242S-250S.
- Lai JD, Ichida JK. C9orf72 protein function and immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*. 2019; 713: 134523.
- Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: Selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *International journal of cell biology*. 2012; 2012.
- Lee J-S, Li Q, Lee J-Y, Lee S-H, Jeong JH, Lee H-R , ve ark. Flip-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nature cell biology*. 2009; 11: 1355-1362.

- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN , ve ark. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012; 487: 443-448.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008; 132: 27-42.
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011; 469: 323-335.
- Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: An innocent convict? *The Journal of clinical investigation*. 2005; 115: 2679-2688.
- Li M, Lin J, Wang Z, He S, Ma X, Li D. Oxidized low-density lipoprotein-induced proinflammatory cytokine response in macrophages are suppressed by cd4⁺ cd25⁺ foxp3⁺ regulatory t cells through downregulating toll like receptor 2-mediated activation of nf-kb. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2006; 25: 649-656.
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh B-H , ve ark. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel beclin1-binding protein uvrag. *Nature cell biology*. 2006; 8: 688-698.
- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G , ve ark. Protection against fatal sindbis virus encephalitis by beclin, a novel bcl-2-interacting protein. *Journal of virology*. 1998; 72: 8586-8596.
- Ling S-C, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in als and ftd: Disrupted rna and protein homeostasis. *Neuron*. 2013; 79: 416-438.
- Liu G, Ma H, Qiu L, Li L, Cao Y, Ma J , ve ark. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory cd4⁺ cd25⁺ t cells in mice. *Immunology and cell biology*. 2011; 89: 130-142.
- Liu K, Czaja M. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death & Differentiation*. 2013; 20: 3-11.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S , ve ark. Cd127 expression inversely correlates with foxp3 and suppressive function of human cd4⁺ t reg cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2006; 203: 1701-1711.
- Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang Y-J, Vanderwyde T, Citro A, Mehta T , ve ark. Tar DNA binding protein-43 (tdp-43) associates with stress granules: Analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PloS one*. 2010; 5: e13250.
- Loftis JM, Janowsky A. Neuroimmune basis of methamphetamine toxicity. *International review of neurobiology*. 2014; 118: 165-197.
- Longinetti E, Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: An update of recent literature. *Current opinion in neurology*. 2019; 32: 771.
- Loos B, Engelbrecht A-M, Lockshin RA, Klionsky DJ, Zakeri Z. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy*. 2013; 9: 1270-1285.
- Lu C-H, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T , ve ark. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology-Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2016; 3.
- Luo S, Rubinsztein D. Apoptosis blocks beclin 1-dependent autophagosome synthesis: An effect rescued by bcl-xl. *Cell Death & Differentiation*. 2010; 17: 268-277.
- Lyon MS, Wosiski-Kuhn M, Gillespie R, Caress J, Milligan C. Inflammation, immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: I. Etiology and pathology. *Muscle & nerve*. 2019; 59: 10-22.

- MacIntosh GC, Bassham DC. The connection between ribophagy, autophagy and ribosomal rna decay. *Autophagy*. 2011; 7: 662-663.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007; 8: 741-752.
- Maria Fimia G, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R , ve ark. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*. 2007; 447: 1121-1125.
- Martinet W, Schrijvers DM, Herman AG, Meyer GRD. Z-vad-fmk-induced non-apoptotic cell death of macrophages: Possibilities and limitations for atherosclerotic plaque stabilization. *Autophagy*. 2006; 2: 312-314.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y , ve ark. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2010; 465: 223-226.
- Masseret E, Banack S, Boumédiène F, Abadie E, Brient L, Pernet F , ve ark. Dietary bmaa exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from southern france. *PloS one*. 2013; 8: e83406.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007; 7: 961-967.
- Matyszak M. Inflammation in the cns: Balance between immunological privilege and immune responses. *Progress in neurobiology*. 1998; 56: 19-35.
- McCauley ME, O'Rourke JG, Yáñez A, Markman JL, Ho R, Wang X , ve ark. C9orf72 in myeloid cells suppresses sting-induced inflammation. *Nature*. 2020; 585: 96-101.
- Metcalf DJ, García-Arencibia M, Hochfeld WE, Rubinsztein DC. Autophagy and misfolded proteins in neurodegeneration. *Experimental neurology*. 2012; 238: 22-28.
- Mizushima N. Autophagy: Process and function. *Genes & development*. 2007; 21: 2861-2873.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011; 147: 728-741.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *nature*. 2008; 451: 1069-1075.
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K , ve ark. Dissection of autophagosome formation using apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology*. 2001; 152: 657-668.
- Morris HR. Genetics of parkinson's disease. *Annals of medicine*. 2005; 37: 86-96.
- Morselli L, Bongioanni P, Genovesi M, Licitra R, Rossi B, Murri L , ve ark. Growth hormone secretion is impaired in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical endocrinology*. 2006; 65: 385-388.
- Nakahira K, Cloonan SM, Mizumura K, Choi AM, Ryter SW. Autophagy: A crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2014; 20: 474-494.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC , ve ark. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the nalp3 inflammasome. *Nature immunology*. 2011; 12: 222-230.

- Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*. 2008; 183: 795-803.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT , ve ark. Ubiquitinated tdp-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006; 314: 130-133.
- Nikolietopoulou V, Tavernarakis N. Regulation and roles of autophagy at synapses. *Trends in cell biology*. 2018; 28: 646-661.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005; 308: 1314-1318.
- O'rourke J, Bogdanik L, Yáñez A, Lall D, Wolf A, Muhammad A , ve ark. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science*. 2016; 351: 1324-1329.
- Oral O, Oz-Arslan D, Itah Z, Naghavi A, Deveci R, Karacali S , ve ark. Cleavage of atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis*. 2012; 17: 810-820.
- Palamiuc L, Schlagowski A, Ngo ST, Vernay A, Dirrig-Grosch S, Henriques A , ve ark. A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO molecular medicine*. 2015; 7: 526-546.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N , ve ark. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005; 122: 927-939.
- Pehar M, Harlan BA, Killoy KM, Vargas MR. Role and therapeutic potential of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Current pharmaceutical design*. 2017; 23: 5010-5021.
- Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Role of glial activation in motor neuron disease. *The Lancet Neurology*. 2011; 10: 253-263.
- Plowey ED, Chu CT. Synaptic dysfunction in genetic models of parkinson's disease: A role for autophagy? *Neurobiology of disease*. 2011; 43: 60-67.
- Polson HE, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ , ve ark. Mammalian atg18 (wipi2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates lc3 lipidation. *Autophagy*. 2010; 6: 506-522.
- Pradat P-F, Bruneteau G, Gordon PH, Dupuis L, Bonnefont-Rousselot D, Simon D , ve ark. Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2010; 11: 166-171.
- Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience*. 2014; 17: 17-23.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR , ve ark. A hexanucleotide repeat expansion in c9orf72 is the cause of chromosome 9p21-linked als-ftd. *Neuron*. 2011; 72: 257-268.
- Reyes ET, Perurena OH, Festoff BW, Jorgensen R, Moore WV. Insulin resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 1984; 63: 317-324.

- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A , ve ark. Mutations in cu/zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993; 362: 59-62.
- Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2001; 344: 1688-1700.
- Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The autophagy protein atg12 associates with antiapoptotic bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*. 2011; 44: 698-709.
- Ryter SW, Cloonan SM, Choi AM. Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Molecules and cells*. 2013; 36: 7-16.
- Safinia N, Vaikunthanathan T, Fraser H, Thirkell S, Lowe K, Blackmore L , ve ark. Successful expansion of functional and stable regulatory t cells for immunotherapy in liver transplantation. *Oncotarget*. 2016; 7: 7563.
- Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T , ve ark. Loss of the autophagy protein atg16l1 enhances endotoxin-induced il-1 β production. *Nature*. 2008; 456: 264-268.
- Sakaguchi S. Naturally arising foxp3-expressing cd25+ cd4+ regulatory t cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*. 2005; 6: 345-352.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing il-2 receptor alpha-chains (cd25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1995; 155: 1151-1164.
- Santegoets SJ, Dijkgraaf EM, Battaglia A, Beckhove P, Britten CM, Gallimore A , ve ark. Monitoring regulatory t cells in clinical samples: Consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory t cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2015a; 64: 1271-1286.
- Santegoets SJ, Dijkgraaf EM, Battaglia A, Beckhove P, Britten CM, Gallimore A , ve ark. Monitoring regulatory t cells in clinical samples: Consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory t cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2015b; 64: 1271-1286.
- Sasaki S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2011; 70: 349-359.
- Sawada H. Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2017; 18: 735-738.
- Scarmeas N, Shih T, Stern Y, Ottman R, Rowland LP. Premorbid weight, body mass, and varsity athletics in als. *Neurology*. 2002; 59: 773-775.
- Scherz-Shouval R, Elazar Z. Ros, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in cell biology*. 2007; 17: 422-427.
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *cell*. 2010; 140: 821-832.
- Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 1973; 7: 253-266.
- Shaid S, Brandts C, Serve H, Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death & Differentiation*. 2013; 20: 21-30.
- Shaw P, Ince P. Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology*. 1997; 244: S3-S14.

- Sheean RK, McKay FC, Cretney E, Bye CR, Perera ND, Tomas D , ve ark. Association of regulatory t-cell expansion with progression of amyotrophic lateral sclerosis: A study of humans and a transgenic mouse model. *JAMA neurology*. 2018; 75: 681-689.
- Shefner JM, Al-Chalabi A, Baker MR, Cui L-Y, de Carvalho M, Eisen A , ve ark. A proposal for new diagnostic criteria for als. *Clinical Neurophysiology*. 2020; 131.
- Shen H-M, Codogno P. Autophagic cell death: Loch ness monster or endangered species? *Autophagy*. 2011; 7: 457-465.
- Shi C-S, Kehrl JH. Myd88 and trif target beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 33175-33182.
- Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA , ve ark. Activation of autophagy by inflammatory signals limits il-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature immunology*. 2012; 13: 255-263.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB , ve ark. Role of bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology*. 2004; 6: 1221-1228.
- Shimizu T, Nagaoka U, Nakayama Y, Kawata A, Kugimoto C, Kuroiwa Y , ve ark. Reduction rate of body mass index predicts prognosis for survival in amyotrophic lateral sclerosis: A multicenter study in japan. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2012; 13: 363-366.
- Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class iii pi3-kinase complexes. *Journal of cell biology*. 2009; 186: 773-782.
- Sokoloff L. Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochemical research*. 1999; 24: 321-329.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B , ve ark. Tdp-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2008; 319: 1668-1672.
- Sumpter Jr R, Levine B. (2010). *Autophagy and innate immunity: Triggering, targeting and tuning*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, Kriz J , ve ark. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with tdp-43 genomic fragments. *Brain*. 2011; 134: 2610-2626.
- Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'amelio M , ve ark. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology*. 2008; 10: 676-687.
- Thonhoff JR, Beers DR, Zhao W, Pleitez M, Simpson EP, Berry JD , ve ark. Expanded autologous regulatory t-lymphocyte infusions in als: A phase i, first-in-human study. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation*. 2018a; 5.
- Thonhoff JR, Berry JD, Macklin EA, Beers DR, Mendoza PA, Zhao W , ve ark. Combined regulatory t-lymphocyte and il-2 treatment is safe, tolerable, and biologically active for 1 year in persons with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation*. 2022; 9.
- Thonhoff JR, Simpson EP, Appel SH. Neuroinflammatory mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Current opinion in neurology*. 2018b; 31: 635-639.

- Trageser KJ, Smith C, Herman FJ, Ono K, Pasinetti GM. Mechanisms of immune activation by c9orf72-expansions in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Frontiers in neuroscience*. 2019; 13: 1298.
- Trancikova A, Tsika E, Moore DJ. Mitochondrial dysfunction in genetic animal models of parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2012; 16: 896-919.
- Upadhyay A, Amanullah A, Joshi V, Mishra R, Mishra A. Molecular and cellular insights: Neuroinflammation and amyotrophic lateral sclerosis. *Inflammation: the Common Link in Brain Pathologies*. 2016: 209-230.
- Uysal H, Taghiyeva P, Türkay M, Köse F, Aktekin M. Amyotrophic lateral sclerosis in antalya, turkey. A prospective study, 2016–2018. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2021; 22: 101-107.
- Van den Bergh R, Swerts L, Hendrikx A, Boni L, Meulepas E. Adipose tissue cellularity in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurology and neurosurgery*. 1978; 80: 226-240.
- Vance C, Rogelj B, Hortobágyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J , ve ark. Mutations in fus, an rna processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009; 323: 1208-1211.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by cd4+ cd25+ regulatory t cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 2004; 199: 971-979.
- Vucic S, Nicholson GA, Kiernan MC. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2008; 131: 1540-1550.
- W Ryter S, MK Choi A. Regulation of autophagy in oxygen-dependent cellular stress. *Current pharmaceutical design*. 2013; 19: 2747-2756.
- Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SS, Sandoe J , ve ark. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell reports*. 2014; 7: 1-11.
- Wang S-J, Wang K-Y, Wang W-C. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience*. 2004; 125: 191-201.
- Wang Y, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA , ve ark. Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27: 304-307.
- Wang Y-Q, Wang L, Zhang M-Y, Wang T, Bao H-J, Liu W-L , ve ark. Necrostatin-1 suppresses autophagy and apoptosis in mice traumatic brain injury model. *Neurochemical research*. 2012; 37: 1849-1858.
- Wei J, Long L, Yang K, Guy C, Shrestha S, Chen Z , ve ark. Autophagy enforces functional integrity of regulatory t cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis. *Nature immunology*. 2016; 17: 277-285.
- Wosiski-Kuhn M, Robinson M, Strupe J, Arounleut P, Martin M, Caress J , ve ark. Il6 receptor358ala variant and trans-signaling are disease modifiers in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology-Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2019; 6: e631.
- Wu Y-H, Mo S-T, Chen I-T, Hsieh F-Y, Hsieh S-L, Zhang J , ve ark. Caspase-8 inactivation drives autophagy-dependent inflammasome activation in myeloid cells. *Science Advances*. 2022; 8: eabn9912.

- Wu Y-T, Tan H-L, Huang Q, Kim Y-S, Pan N, Ong W-Y , ve ark. Autophagy plays a protective role during zvad-induced necrotic cell death. *Autophagy*. 2008; 4: 457-466.
- Xu Y, Jagannath C, Liu X-D, Sharafkhaneh A, Kolodziejska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*. 2007; 27: 135-144.
- Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 19179-19187.
- Yoshino H, Kimura A. Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (phase ii study). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2006; 7: 247-251.
- Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011; 12: 9-14.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L , ve ark. Calpain-mediated cleavage of atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature cell biology*. 2006; 8: 1124-1132.
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S , ve ark. Regulation of an atg7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*. 2004; 304: 1500-1502.
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB , ve ark. Mitochondrial autophagy is an hif-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 10892-10903.
- Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated mechanisms in the pathoprogession of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2013; 8: 888-899.
- Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu T-T, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of foxp3 target genes in developing and mature regulatory t cells. *Nature*. 2007; 445: 936-940.
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in nlrp3 inflammasome activation. *Nature*. 2011; 469: 221-225.
- Zhou X, Wang J, Shi W, Brand DD, Liu Z, Fan H , ve ark. Isolation of purified and live foxp3+ regulatory t cells using facs sorting on scatter plot. *Journal of molecular cell biology*. 2010; 2: 164-169.
- Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, Eils R , ve ark. Modulation of serines 17 and 24 in the lc3-interacting region of bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288: 1099-1113.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Asef	Uyruğu	T.C.
Soyadı	AZAD	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Ali Turabi
Lisans	Sabzevar Teacher Training University
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
Doktora	Akdeniz Üniversitesi

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	IELTS	7.5/9
Farsça	Ana Dili	
Arapça		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
ALS Hastalarının Regülatör T Lenfositlerinde Otofaji Düzensizliğinin Araştırılması	BAP	2018-2023
Amyotrofik Lateral Sikleroz Hastalarının FoxP3+ Regülatör T Lenfositlerinde Otofaji Düzensizliğinin Araştırılması	TÜBİTAK	2020-2021
Meme/Over Kanseri Ailelerinde Brca1/Brca2 Dışı Genlerin Hastalık Riskine Etkisinin Araştırılması	BAP	2012-2016

Burslar-Ödüller:

Türkiye Bursları- Yurtdışı Türkler ve Akraba Toplulukları Başkanlığı (YTB) -Yüksek Lisans Bursu

Yayınlar ve Bildiriler:

Yayımlar

Azad A, Gökmen ÜR, Uysal H, Köksoy S, Bilge U, Manguoğlu AE. Autophagy dysregulation plays a crucial role in regulatory t-cell loss and neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis (als). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2023: 1-9.

Başaran AE, Başaran A, Kocacik Uygun DF, Yılmaz E, **Moballegh A**, Öz L, Alper Ö, Bingöl A. Association Between Cystic Fibrosis Severity Markers and CFTR Genotypes in Turkish Children. *Turk Thorac J*. 2021 Nov;22(Kawamata ve ark.):426-431. doi: 10.5152/TurkThoracJ.2021.20282. PMID: 35110256; PMCID: PMC8975339.

Moballegh A, Doğan Ö, Kargün S, Yıllmaz N, Manguoglu E. "A rare HNF1A gene mutation in a Turkish family with maturity-onset diabetes of the young (MODY)." *Erciyes Medical Journal*, vol. 41, no. S1, June 2019.

Moballegh A, Karaman T, Keser I. A new strategy in diabetes in *health science research in the globalizing world*, Elina Alexandrova, Nelya Lukpanovna shapekova, Bilal Ak, Fugen ozcanaslan, Editor. 2018, St. Klement Ohridski University press, sofya p. 2-8.

Bildiriler

Asef Moballegh, Ayşe Esra Manguoğlu, Mustafa Özdoğan, Cumhuriyet Arıcı, 26th-29th October 2017, Identification of the germline mutations of P53, CHEK2 and PTEN genes in non-BRCA1/2 mutation carrier high-risk Turkish breast cancer families, 15th national congress of medical biology and genetics, Fethiye, Turkey (poster presentation by A. Moballegh)

E. Manguoglu, **A. Moballegh**, M. Ozdogan, C. Arici; 21th -24th May, 2016, Identification of the germline mutations of P53, CHEK2 and PTEN genes in nonBRCA1/2 mutation carrier high risk Turkish breast cancer families, European Human Genetics Conference, Barcelona, Spain (poster presentation by E. Manguoglu).