

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

HÜCRE MODELİNDE SIRT4 (SİRTUİN4)'ÜN
EKSİTOTOKSİSİTEYE KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

MERVE ÇOLAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. GİZEM DÖNMEZ YALÇIN

Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
118S780 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Merve ÇOLAK tarafından hazırlanan “Hücre Modelinde SIRT4 (Sirtuin4)’ün Eksitotoksisiteye Karşı Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17/01/2020

Üye (T.D.) : Doç. Dr. Gizem Dönmez Yalçın Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Ü. Ayşegül Yıldız Muğla Sıtkı Koçman
Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Ü. Özlem Bozkurt Girit Aydın Adnan
Menderes Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi birikimi, deneyimi, yol göstericiliği, anlayışı ile bana destek olan, yapılan çalışma ile sınırlı kalmayıp hayatımda da çok güzel izler bırakan, aynı anda hem güçlü ve çalışkan hem de adaletli ve vicdanlı olmayı başaran, çok saygı duyduğum, sevgili danışmanım Doç. Dr. Gizem Dönmez Yalçın'a,

Gerek ders, gerekse tez döneminde kendisinden çokça şey öğrendiğim, çalışmalarda bilgi ve birikimiyle desteğini esirgemeyip bizlere ışık tutan, çok saygı duyduğum sevgili hocam Doç. Dr. Abdullah Yalçın'a,

Çalışmam boyunca başım her sıkıştığında yardıma yetişen, olumsuzluğa kapıldığım durumlardan pozitifliği ve neşesiyle kurtulmamı sağlayan, Arş. Gör. Umut Kerem Kolaç'a,

Sadece çalışma dönemimde değil her dönemde yanımda olan, dostluk kelimesinin anlamını dolu dolu yaşatan ve hayatımın her anına tanık olmalarını yüreктen istediğim, Meltem Açılan, Ayşenur Bostancı, Nurşen Turna, Emine Mercan, Sinem Dur, Merve Yay ve son zamanlarda hayatıma giren Düriye Nur Dağdelen'e,

Bugünlere gelmemde, yetişmemde büyük emekleri olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olup beni motive eden, sevgilerini kilometrelerce uzaktan bile gösterebilen, haklarını asla ödeyemeyeceğim Ergün Çolak ve Gülay Çolak'a,

Çocukluğumdan beri her durumda yanımda olan, destekleriyle kardeşliğin ve sevginin en eğlenceli hallerini bana sunan Mikail Çolak, Ersin Çolak ve Ecem Çolak'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Glutamat	4
2.2.Glutamat Döngüsü	4
2.3.Glutamata Bağlı Eksitotoksisite.....	6
2.4.Glutamat Reseptörleri	7
2.4.1.Metabotropik reseptörler	7
2.4.2.İyonotropik reseptörler	9
2.4.2.1.NMDA reseptörleri.....	9
2.4.2.2.AMPA reseptörleri	10
2.4.2.3.Kainat reseptörleri.....	10
2.5.Glutamat Taşıyıcıları.....	11
2.5.1.Eksitator amino asit taşıyıcıları (EAAT'ler)	11
2.6.Eksitotoksisite İçin Terapötik Stratejiler	15
2.6.1.NMDAR'lerin hedeflenmesi.....	15
2.6.2.EAAT2 (GLT-1)'in hedeflenmesi	15
2.7.Mitokondri, Endoplazmik Retikulum ve Lizozomda Eksitotoksiteye Bağlı Olarak Görülen Değişimler	16
2.7.1.Eksitotoksisite ve mitokondri	16
2.7.2.Eksitotoksisite'nin ER ve lizozom ile ilişkisi	17
2.8.Epilepsi.....	18

2.8.1.Status epileptikus	19
2.9.Kainik Asit.....	20
2.9.1.Kainik asitin nörodejeneratif etki mekanizması	21
2.9.2.Kainik asit modelinin olumlu ve olumsuz özellikleri	23
2.10.Sirtüinler	23
2.10.1.Sirtüinlerin enzim aktiviteleri	24
2.10.2.Memeli sirtüinleri.....	26
2.10.3.Sirt4	29
2.11.N2A Hücre Hattı ve Nöroblastomanın Tanımlanması	33
3.GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1.Gereç	34
3.1.1.Cihazlar.....	34
3.1.2.Kullanılan kimyasal maddeler	34
3.1.3.Deney düzeneğinin hazırlanması	35
3.2.Yöntem	36
3.2.1.Hücre kültürü uygulamaları.....	36
3.2.1.1.Besiyeri hazırlama.....	36
3.2.1.2.Hücre çözme	36
3.2.1.3.Hücre besiyerlerinin değiştirilmesi	37
3.2.1.4.Hücrelerin pasajlanması.....	37
3.2.1.5.Dondurma besiyerinin hazırlanması.....	38
3.2.1.6.Hücrelerin dondurulması	38
3.2.1.7.Hücrelerin sayılması ve hücre canlılığı	39
3.2.1.8.Kainik asitin konsantre edilmesi ve uygulama için kullanılacak dozların hazırlanışı .	39
3.2.1.9.MTT (metiltiazol difenil tetrazolyum) assay testi ve testte uygulanacak kainik asit dozlarının belirlenmesi.....	39
3.2.2.LB besiyerinin hazırlanması, Sirt4 bakteri plazmidinin ekilmesi ve dondurulması	41
3.2.3.Sirt4 plazmid izolasyonu	42
3.2.4.N2A hücrelerinin sirt4 plazmidi ile tranfeksiyonu.....	43
3.2.5.Sirt4 transfeksiyonu sonrasında N2A hücre hattına yapılan mtt canlılık testi.....	44
3.2.6.RIPA lizis tamponu kullanılarak protein izolasyonu	45
3.2.7.Bradford assay ile protein miktarının tayin edilmesi	46
3.2.8.Western blot.....	48
3.2.8.1.Tampon çözeltilerin hazırlanması	48

3.2.8.2.Örneklerin hazırlanması, jele yüklenmesi, jel elektroforezi	49
3.2.8.3.Jelden membrana transfer, bloklama, blotlama ve görüntüleme	50
3.2.9.Glutamat assay	51
3.3.İstatistik	54
4.BULGULAR	55
4.1.Kainik Asit Uygulanan N2A Hücrelerinde MTT Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi ...	55
4.2.Transfeksiyonun Teyit Edilmesi İçin Sirt4 Protein İfadesinin Western Blot İle Tespiti ...	56
4.2.1.Western blot deneyinde görüntülenen bantların image j programı kullanılarak hesaplanması.....	57
4.3.Sirt4 Transfeksiyonu Sonrasında N2A Hücre Hattında Yapılan MTT Canlılık Testinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi	58
4.4.Sirt4 ile Transfekte edilen N2A Hücre Hattının Kainik Asit Muamelesini Takiben Yapılan Glutamat Assay Sonuçlarının Değerlendirilmesi	60
5.TARTIŞMA.....	62
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACC	: Asetil-CoA karboksilaz
AceCS2	: Asetil-CoA sentetaz 2
ADP	: Adenin difosfat
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
AMP	: Adenin monofosfat
AMPA	: α -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonik Asit
AMPK	: AMP ile aktive olan protein kinaz
ANT	: Adenin nükleotid translokator
ATP	: Adenin trifosfat
CPS1	: Karbamoil fosfat sentetaz
CPT1	: Karnitin palmitoil transferaz 1
CR	: Kalori kısıtlaması
Cyt.C	: Sitokrom C
DDR	: DNA hasarı tepki mekanizması
dH₂O	: Distile su
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EAAT	: Eksitator amino asit taşıyıcısı
EDTA	: Etilen-diamin-tetra-asetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ER	: Endoplazmik retikulum
ERRa	: Östrojenle ilgili reseptör a
FBS	: Fetal sığır serumu
FOXO	: Forkhead transkripsiyon faktörlerinin bir alt sınıfı
GABA	: Gama amino bütirik asit
GDH	: Glutamat dehidrojenaz
HAT	: Histon asetil transferazlar
HCl	: Hidroklorik asit
HDAC	: Histon deasetilazlar
IDH2	: İzositrat dehidrojenaz

IgG	: İmmünoglobulin G
HRP	: Herseradish peroksidaz
IL-1	: İnterlökin-1
iGluR	: İyonotropik glutamat reseptörleri
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
KA	: Kainik asit
KAR	: Kainat reseptörleri
LCAD	: Uzun zincirli asetil CoA dehidrogenaz
MCAD	: Orta zincirli asetil-CoA dekarboksilaz
MCD	: Malonil-CoA dekarboksilaz
MEM	: Minimum esansiyel besiyeri
mGluR	: Metabotropik glutamat reseptörleri
mRNA	: Mesajcı RNA
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MTT	: Metil tiazoldifenil tetrazolyum
N2A	: Neuro2-A (Fare nöroblastoma) hücre hattı
NaCl	: Sodyum klorür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NaOH	: Sodyumhidroksit
NF-κB	: Nükleer faktör-B
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüsü
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
NMDAR	: NMDA reseptörleri
NO	: Nitrik oksit
NRF1	: Nükleer solunum faktörü 1
PARP1	: Poli [ADP-riboz] polimeraz 1
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGC1α	: Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatörü 1-alfa
RIPA	: Lizis ve ekstraksiyon tamponu
RNA	: Ribonükleik asit
RNS	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri

rRNA	: Ribozomal RNA
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SE	: Status epileptikus
Sir	: Sessiz bilgi düzenleyicisi
Sirt	: Sirtüin
SOD2	: Süperoksit dismutaz 2
TBS	: Tris-Buffered Salline
TCA	: Trikarboksilik asit
TFAM	: Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A
TGFα	: Dönüştürücü büyüme faktörü alfa
UV	: Ultraviyole



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1	: Glutamat döngüsü	5
Şekil 2	: Glutamat Reseptörlerinin sınıflandırılması	7
Şekil 3	: Metabotropik glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması	8
Şekil 4	: EAAT2'lerin ve diğer glutamat taşıyıcılarının astrositlerdeki konumu.....	13
Şekil 5	: GLT-1 tarafından glutamat molekülünün taşınımı	14
Şekil 6	: Eksitotoksisitenin mitokondri aracılı hasarı.	17
Şekil 7	: Status epileptikus takiben epileptogenezin altında yatan patofizyolojik temeller	19
Şekil 8	: KA'nın moleküler yapısı.....	21
Şekil 9	: KA aracılı nöronal ölüm mekanizması	22
Şekil 10	: Sirtuinlerin deasetilasyon aktivitesi	25
Şekil 11	: Sirtuinlerin ADP-ribozil transferaz aktivitesi.....	25
Şekil 12	: Sirt4 varlığında mitokondri ve nükleus arasındaki sinyalleşme.	30
Şekil 13	: Sirt4 yokluğunda mitokondri ve nükleus arasındaki sinyalleşme.	31
Şekil 14	: Transfeksiyon yapılan 6 well platedeki hücre grupları.	43
Şekil 15	: N2A hücre hattında transfeksiyon sonrası kontrol ve transfeksiyon gruplarından izole edilen protein örnekleri için bradford assay çalışması sonrası çizilen absorbans/standart grafiği.	47
Şekil 16	: Western blot transfer sandviçinin hazırlanış sırası.	50
Şekil 17	: Glutamat assay çalışma prensibinin gösterimi	51
Şekil 18	: Glutamat testi için toplanan besiyerlerinin yükleme sırası.	53
Şekil 19	: N2A hücre hattında 24 saat kainik asit inkübasyonu sonrası yapılan MTT canlılık testi grafiği.....	55
Şekil 20	: Kontrol ve transfeksiyon grubu hücreleri için western blot görüntüsü ve rölatif Sirt4 ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği.....	56
Şekil 21	: N2A hücre hattında kontrol ve transfeksiyon grubu için sırasıyla Sirt4 bantının ve Alfa-Tubulin bantının İmage J programı ile analizi sırasında çerçeve içine alınması.	57
Şekil 22	: N2A hücre hattında yapılan western blot sonrasında kontrol ve transfeksiyon grubu örneklerinden elde edilen Sirt4 ve Alfa-Tubulin bantları için İmage J programı ile tepe noktası grafiğinin çizilmesi	57

Şekil 23 : N2A hücre hattında transfeksiyon ve takiben kainik asit muamelesinin yapılmasının ardından yapılan MTT canlılık testi sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği	59
Şekil 24 : Sirt4 ile transfekte edilen N2A hücre hattına kainik asit muamelesinin ardından yapılan glutamat assay sonuçlarının değerlendirilmesi	60



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1	: Kemirgenlerde ekspresyon gösteren EAAT'lerin insanlardaki homologları.....	12
Tablo 2	: EAAT'lerin sınıflandırılması.	12
Tablo 3	: SE modellerinin sınıflandırılması..	20
Tablo 4	: Sirtüinlerin hücreyel yerleşimi	26
Tablo 5	: Memeli sirtüinlerinin hedef ve fonksiyonları	27
Tablo 6	: Bradford assay için kullanılacak standartların hazırlanış tablosu.	46
Tablo 7	: Glutamat testinde yer alan bileşenler ve kuyucuk başına kullanım miktarları.....	53
Tablo 8	: Sirt4 ve Alfa-Tubulin bantları için çizilen tepe grafiğı altında kalan alanlara karşılık gelen değerler ve Sirt4/Alfa-Tubulin değerleri.	58
Tablo 9	: Deneyde yer alan hücre gruplarının açıklanması.	58

ÖZET

HÜCRE MODELİNDE SIRT4 (SİRTUİN4)'ÜN EKŞİTOTOKSİSİTEYE KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Çolak M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020.

Glutamat, merkezi sinir sisteminde birçok nörolojik işleve sahiptir ve beyinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Sinir terminallerinde glutamat, yoğun olarak bulunur ve hücre içindeki konsantrasyonu dışındaki konsantrasyona göre çok daha fazladır. Sinir hücre membranının depolarizasyonu ile kalsiyuma bağlı bir süreçte presinaptik sinir uçlarındaki veziküllerden hücreler arası boşluğa glutamat salınır ve postsinaptik nörondaki glutamat reseptörleri uyarılır. Glial hücrelerde yer alan glutamat taşıyıcılarının hücreler arası boşluktan glutamati toplanmasıyla uyarım bitirilir. Glutamat seviyesinin nöronal boşlukta artışı toksiktir, nöron hasarı ve ölümüne neden olur. Bu durum, glutamata bağlı eksitotoksisite olarak adlandırılır. Eksitotoksisite, travma, serebral iskemi, epilepsi, Parkinson Hastalığı, Alzheimer Hastalığı gibi birçok nörolojik hastalığın altındaki sebeplerdendir. Kainik asit, glutamat analogudur, nörotoksisite oluşturulması için kullanılan kimyasal bir modeldir. Sessiz bilgi düzenleyicisi (Sir) protein ailesinin ilk üyesi olan Sir2'nin homologları sirtüinler olarak adlandırılır. Memelilerde yedi tane sirtüin (Sirt1-7) bulunur. Sirt4, deasetilaz ve ADP-ribosilaz etkinliği gösteren ve mitokondride bulunan memeli sirtüinidir. Sirt4, GDH'ı aracı olarak kullanarak glutamin metabolizmasını düzenler. Bundan dolayı, Sirt4'ün nöronal uyarılar ve eksitotoksisite sırasında artan glutamat seviyesine cevabı düzenleyeceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, N2A hücreleri 10 µM, 50 µM, 200 µM ve 1000 µM'lık kainik asit konsantrasyonlarıyla muamele edildi. Ardından, hücrelerin canlılık seviyeleri MTT testi ile değerlendirildi. 200 µM ve 1000 µM'lık kainik asit konsantrasyonlarında hücre canlılık seviyesinde anlamlı düşüş olduğu belirlendi. Takip eden deneylerde 1000 µM'lık kainik asit konsantrasyonunun kullanılmasına karar verildi. N2A hücrelerinde transfeksiyon yöntemi ile Sirt4 ifadesi arttırıldı ve ifade artışı western blot yöntemi ile gösterildi. Sirt4 ifadesi arttırılmamış (kontrol) ve Sirt4 ifadesi arttırılmış (transfekte edilmiş) N2A hücre grupları 1000 µM konsantrasyonda kainik asit ile muamele edildi. Muamele sonrasında,

kontrol N2A, kainik asit muamelesi yapılmış N2A, yalnızca Sirt4 ifadesi arttırılmış ve kainik asit muamelesi yapılmış ve Sirt4 ifadesi arttırılmış olmak üzere dört farklı N2A hücre grubu elde edildi. Bu hücre gruplarındaki canlılık seviyesi MTT testi ile ölçüldü. Kontrol N2A ile kainik asit muamelesi yapılmış N2A grupları arasında yapılan kıyaslamada, kainik asit muamelesi sonucu hücrelerin canlılık seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Sirt4 ifadesinin arttırılmasının ise hücre canlılığındaki düşüşü azalttığı gözlemlendi. Ayrıca, bu dört farklı deney grubunda glutamat salınımı 0, 12, 24, 48 saatlik süre için ölçüldü. Kainik asit muamelesi yapılmış ve Sirt4 ifadesi arttırılmış deney grubunda, yalnızca kainik asit ile muamele edilmiş deney grubuna kıyasla, hücre ölümünün daha az olduğu, bu nedenle daha fazla glutamat salınımı yapıldığı gösterildi. Dolayısıyla, Sirt4'ün eksitotoksisteyi engelleyerek hücre ölümünü azaltabileceği gösterildi.

Anahtar kelimeler: Eksitotoksiste, glutamat, kainik asit, sirtüin, Sirt4.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF SIRT4 (SIRTUIN4) AGAINST EXCITOTOXICITY IN A CELLULAR MODEL

**Çolak M. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Medicine
Biology Program, Master's Thesis, Aydın, 2020.**

Glutamate has many neurological functions in the central nervous system and is found at high concentrations in the brain. At the nerve terminals, glutamate is densely present and has a much higher concentration outside the cell. By depolarization of the nerve cell membrane, glutamate is released from the vesicles of the presynaptic nerve endings into the intercellular space and the glutamate receptors in the postsynaptic neuron are stimulated. Stimulation is terminated by collecting glutamate from the intercellular space by glutamate transporters on glial cells. Increased levels of glutamate in the neuronal space are toxic, causing neuron damage and death. This is called glutamate-induced excitotoxicity. Excitotoxicity is among the causes of many neurological diseases such as trauma, cerebral ischemia, epilepsy, Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease. Kainic acid is a glutamate analogue, a chemical model used to generate neurotoxicity. The homologues of Sir2, the first member of the silent information organizer (Sir) protein family, are called sirtuins. There are seven sirtuins (Sirt1-7) in mammals. Sirt4 is a mammalian sirtuin which is present in the mitochondria, showing deacetylase and ADP-ribosylase activities. Sirt4 regulates glutamine metabolism using GDH as a mediator. Therefore, Sirt4 is thought to regulate the response to increased glutamate levels during neuronal stimuli and excitotoxicity. In this study, N2A cells were treated with 10 μ M, 50 μ M, 200 μ M and 1000 μ M kainic acid concentrations. The viability of the cells was then assessed by the MTT test. There was a significant decrease in cell viability at 200 μ M and 1000 μ M kainic acid concentrations. In the following experiments, 1000 μ M concentration of kainic acid was decided to be used. In N2A cells, Sirt4 expression was increased by transfection and the enhanced expression was assessed by western blot method. N2A cell lines with or without Sirt4 overexpression were treated with kainic acid at a concentration of 1000 μ M. After treatment, four different groups of N2A cells were obtained, control N2A, N2A treated with kainic acid, Sirt4 overexpressed, and

kainic acid treated and Sirt4 overexpressed. The viability of these cells was measured by MTT test. Kainic acid treatment lead to a decrease in the cell viability. Increasing Sirt4 expression reduced the decrease in cell viability. In addition, glutamate release in these four different experimental groups was measured for 0, 12, 24, 48 hour periods. It was shown that in the experimental group with Sirt4 overexpression and kainic acid treatment, the cell death was less than that of the experimental group treated with kainic acid alone, therefore more glutamate was released. Thus, it has been shown that Sirt4 can reduce cell death by inhibiting excitotoxicity.

Keywords: Excitotoxicity, glutamate, kainic acid, sirtuin, Sirt4.



1. GİRİŞ

Memelilerin merkezi sinir sisteminde yer alan amino asitlerden bazıları, inhibitör ya da eksitatör nörotransmitterler olarak çalışır ve bu sistemde en önemli eksitatör aminoasit glutamattır. Glutamat, kendisini tanıyan reseptörler ile etkileşip onları uyararak memeli beyinde öğrenme, hafıza, hareket, sinaptik ve duyu bağlantılarının sağlanması gibi birçok nörolojik olay içerisinde yer alır (Yıldırım, 2009). Merkezi sinir sistemi içerisinde en fazla konsantrasyonda bulunan aminoasitlerden biri olmasının yanı sıra, beyin her bölgesinde glutamat konsantrasyonu birbirine eş değildir (Lewerenz ve Maher, 2015; Schousboe ve Hertz, 1981). Beyindeki en yüksek glutamat konsantrasyonu sinir terminallerindedir ve hücre içindeki glutamat konsantrasyonu dışındakine kıyasla çok daha fazladır (Storm-Mathisen ve ark, 1992; Ottersen ve ark, 1996). Nöronal boşluktaki glutamat seviyesinin yükselmesi toksiktir ve bu yükseliş, sinir hücresi membranının polarize olmasıyla sinaptik veziküllerden glutamat salınımının uyarılması, ATP yetersizliğiyle glutamatın geri toplanması için gerekli olan taşımanın sağlanamaması veya fazla glutamatın taşıyıcılar tarafından toplanamaması ile ortaya çıkmaktadır (Amar ve Levy, 1999). Hücreler arası boşlukta glutamat seviyesi arttıkça, glutamat reseptörleri aşırı uyarılır, bu uyarım nöronal hasar ve ölüme yol açar. Birbirini izleyen bu olaylar, glutamata bağlı eksitotoksikite olarak adlandırılır. Salınan glutamatın sinaptik iletimin sonunda, uyarımın sonlandırılması için hücre dışı alandan toplanması, eksitotoksikiteye bağlı nöronal hasarın önlenmesinde önemlidir. Bu sonlandırılma presinaptik ve postsinaptik hücre membranlarında bulunan reseptörler ve glial hücre membranlarındaki taşıma sistemleri tarafından sağlanır (Danbolt, 2001). Yapılan çalışmalar ışığında travma, serebral iskemi, epilepsi, Parkinson Hastalığı, Alzheimer Hastalığı gibi birçok nörodejeneratif hastalıktaki nöronal hasar ve ölümün altındaki sebeplerden birinin glutamata bağlı eksitotoksikite olduğu vurgulanmıştır (Lipton ve Rosenberg, 1994).

Status epileptikus (SE), 30 dakikadan uzun süren sürekli bir nöbet ya da ikisi arasında bilincin tam olarak yerine gelmediği iki veya ikiden fazla nöbetlerin görüldüğü epilepsi çeşididir (Cherian ve Thomas, 2009). Kainik asit, glutamatın çözünmeyen bir analogudur, nörotoksikite oluşturulmasında glutamata göre 30 kat daha fazla etki gösteren, aynı zamanda SE epilepsi çeşidini anlamak için kullanılan kimyasal bir modeldir (Zhang ve Zhu, 2011; Sairazi ve ark, 2015; Reddy ve Kuruba, 2013).

Sessiz bilgi düzenleyicisi adı verilen, Sir protein ailesinin ilk üyesi 1984'te *Saccharomyces cerevisiae*'de keşfedilmiş olan Sir2 proteindir ve yaşam süresi uzunluğu ile arasında bağlantı olduğu fikri ortaya atılmıştır (Kaeberlein ve ark, 1999). Sir2, histon deasetilazların bir sınıfında yer alır ve birçok canlıda homologlarının var olduğu bilinir, bu homologlar sirtüinler olarak adlandırılır (North ve Verdin, 2004). Proteinlerin stabilitesinin sağlanması, DNA tarafından tanınmaları, proteinlerle kurdukları etkileşimler gibi birçok hücresel fonksiyon protein asetilasyonu ile düzenlenmektedir (Kouzarides, 2000). Sirtüinler protein deasetilaz enzimi aktivitelerinin dışında, ADP-ribosil transferaz enzim aktivitesi de gösterir ve kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) kullanırlar (Landry ve ark, 2000; Dang, 2014). Memeli sirtüinlerinin hepsinde deasetilaz aktivitesi olmamakla beraber, yedi tane memeli sirtüini (Sirt1-7) bulunur ve farklı lokalizasyonlar sergilerler. Bunlardan Sirt1, Sirt6 ve Sirt7 nükleer sirtüinlerdir. Sirt2, sitoplazmada yer almasına rağmen bazen çekirdek ve sitoplazma arasında da bulunabilmektedir (José ve ark, 2012). Sirt3, Sirt4, Sirt5 ise mitokondriyal sirtüinlerdir (Michan ve Sinclair, 2007).

Sirt4, deasetilaz ve ADP-ribosilaz etkinliği gösteren ve mitokondride yerleşik halde bulunan memelilere ait bir sirtüindir (Fernandez-Marcos ve Serrano, 2013). Sirt4'ün ADP-ribosilaz aktivitesi ile insülin sekresyonunun düzenlenmesinde yer aldığı ve GDH'ı aracı olarak kullanarak glutamin metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir (Ho ve ark, 2013). Glutaminin glutamata çevrildiği ve glutamatın da beyinde yüksek oranda bulunan bir nörotransmitter olduğu bilindiği için, Sirt4'ün nöronal uyarılar ve eksitotoksiste sırasında artan glutamat seviyesine cevabı düzenleyeceği düşünülmüştür (Michan ve Sinclair, 2007). Sirt4 ekspresyonu, diğer dokulara kıyasla beyin ve karaciğerde yüksek ekspresyon seviyesi gösterir (Zhu ve ark, 2014; Haigis ve ark, 2006). Sirt4, karaciğer ve kasta bulunan hücrelerde yağ asidinin oksidasyonunu olumsuz bir şekilde düzenlemektedir. Sirt4 gen ifadesi, beslenme bolluğunda malonil-CoA-dekarboksilaz'ı (MCD) baskılar ve bu yolla lipid homeostazını düzenler (Laurent ve ark, 2013b). Sirt4, hücrede ATP seviyesini düzenlenmesinde de yer alır, hücrede Sirt4 ifadesi arttıkça ATP seviyesi artar (Ho ve ark, 2013). Ayrıca, ANT2-AMPK-PGC1 α aracılığıyla mitokondriyal biyogenez genlerini de kontrol ettiği bildirilmiştir (Ho ve ark, 2013). Sirt4 ifade edilmediğinde, hücre döngüsünün devam etmesi durumunda DNA onarımı gecikir ve kromozomal anomaliler oluşur (Fernandez-Marcos ve Serrano, 2013). Sirt4 ekspresyonu glutamin metabolizmasını ve tümör hücrelerinin proliferasyonu baskılamaktadır (Jeong ve ark, 2013).

Bu çalışmada, nöroblastoma hücreleri kullanarak Sirt4'n glutamat metabolizmasındaki rolü ve eksitotoksisiteye karşı potansiyel koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Sirt4'n eksitotoksisiteye karşı koruyuculuğunun doğrulanması durumunda, gelecekteki çalışmalarda eksitotoksisite sonucu oluşan nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde Sirt4'n aktif hale getirilmesi ve ilaç geliştirme hedefi olabilmesi için bu çalışma kaynak sağlayacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

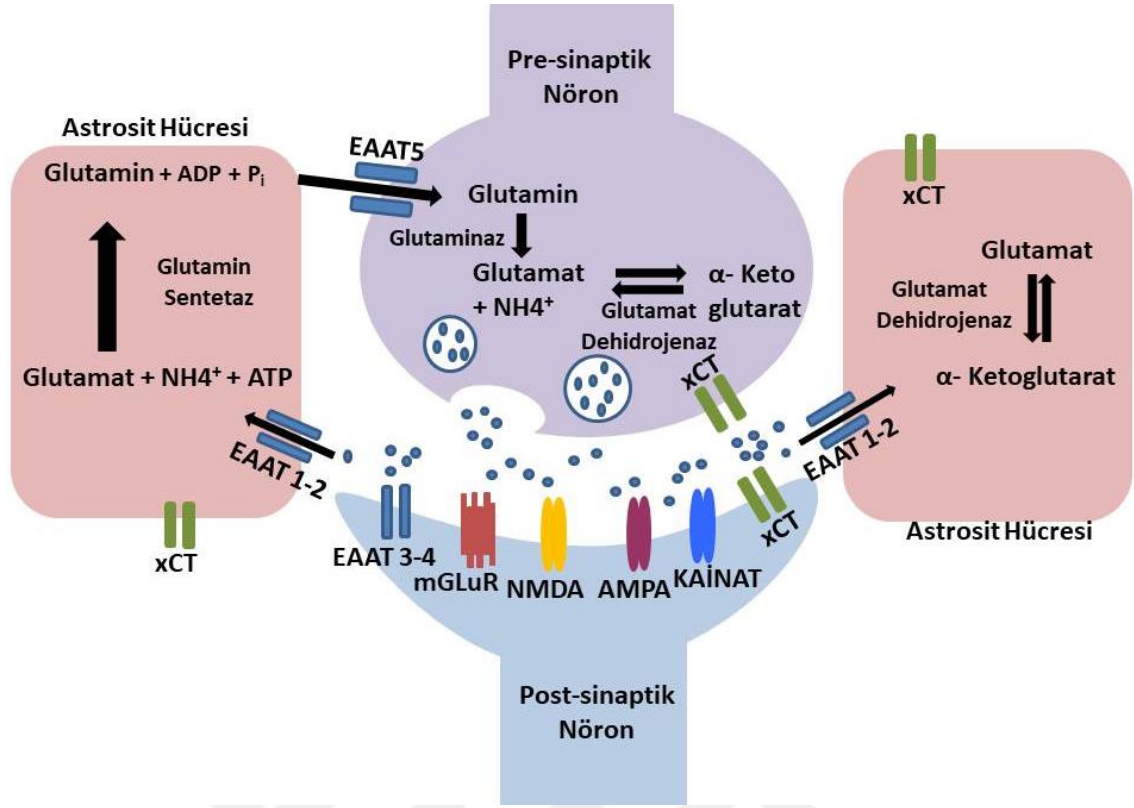
2.1. Glutamat

Memeli merkezi sinir sisteminde yer alan amino asitlerden bazıları nörotransmitter görevi de görmektedir ve bu amino asitler iki gruba ayrılırlar; eksitatör amino asitler ve inhibitör amino asitler. Eksitatör amino asitlere L-Glutamik asit ve L-Aspartik asit, inhibitör amino asitlere ise gama amino bütirik asit (GABA), glisin, taurin, prolin örnek olarak verilebilir (Yıldırım, 2009).

Merkezi sinir sisteminde nörotransmitter görevi gören en önemli eksitatör amino asit, glutamattır ve hücre membranında bulunan reseptörler ile etkileşerek öğrenme, hafıza, hareket, sinaptik ve duyu bağlantıların sağlanması gibi birçok nörolojik olayın düzenleyicisidir (Yıldırım, 2009). Glutamat ve glutamin, merkezi sinir sisteminde en fazla bulunan serbest amino asitlerdir (Lewerenz ve Maher, 2015). Beynin her bölgesinde glutamat konsantrasyonu aynı değildir ve glutamatın beyinde bulunan yaş ağırlığı 5 ila 15 mmol/kg olarak seyrederek (Schousboe ve Hertz, 1981). Ölçülen bu yüksek glutamat miktarının çok küçük bölümü hücre dışı alanda yer alır. Dolayısıyla, hücre içindeki glutamat konsantrasyonu dışına kıyasla yaklaşık bin kat daha yoğun konsantrasyona sahiptir. Beyinde en yüksek glutamat konsantrasyonuna sinir terminallerinde rastlanır (Storm-Mathisen ve ark, 1992; Ottersen ve ark, 1996). Bu önemli uyarıcı nörotransmitter, glutamaterjik sinir uçlarında, mitokondriyal bir enzim olan glutaminaz ile glutaminden sentezlenir ve sentezlendikten sonra presinaptik veziküllere taşınır ve depolanır (Greenamyre ve Porter, 1994).

2.2. Glutamat Döngüsü

Glutamat dağılımı enerji kaynaklarının durumuyla yüksek oranda ilişki içerisindedir, enerji kaynakları tükenirse glutamat hücrelerden dışarı sızar ve hızla glutamat döngüsü başlar (Gözen O, 2008)



Şekil 1: Glutamat döngüsü. Kritis ve ark (2015)'ten modifiye edilmiştir.

Glutamat, glutamaterjik sinir uçlarında, mitokondriyal bir enzim olan glutaminaz ile glutaminden sentezlenir ve sentezlendikten sonra presinaptik veziküllere taşınır ve depolanır. Sinir hücresi membranının depolarize olması, presinaptik sinir uçlarında bulunan veziküllerden ekstrasellüler boşluğa glutamat salınmasına neden olur ve Şekil 1’de görülen olaylar dizisi başlar. Glutamatın sinaptik boşluğa salınması kalsiyum (Ca^{+2}) iyonuna bağlı bir süreçte gerçekleştirilir. Sinaptik boşluğa salınımı gerçekleşen glutamat, postsinaptik uçtaki glutamat reseptörlerini aktive eder. Normal şartlar altında sinaptik boşluktaki glutamat, sodyum (Na^{+}) iyonuna bağlı olarak yüksek afinite sahibi glutamat taşıyıcıları ile hızla sinaptik boşluktan uzaklaştırılır. Glutamat taşıyıcıları glial hücre ve nöronların membranları üzerinde konumlanmıştır. Glutamat taşıyıcıları vasıtasıyla, glutamat, glial hücre içine alınır (Greenamyre ve Porter, 1994). Glial hücre olan astrositlerce geri alındıktan sonra, glutamat, glutamin ya da alfa-ketoglutarat’a dönüştürülmektedir. Glutamine dönüşüm, ATP’ye bağlı ve gliyaya özgü enzim olan glutamin sentetaz ile gerçekleştirilir (Gözen O, 2008). Glutamin yeniden glutamaterjik sinir uçlarına gönderilir (Greenamyre ve Porter, 1994). Glial glutamin, presinaptik nöronun içine Na^{+} bağımlı glutamin alım sistemleri yoluyla alınır, burada glutaminaz ile glutamata dönüştürülür (Kritis ve ark, 2015). Bununla birlikte, nörotransmitter

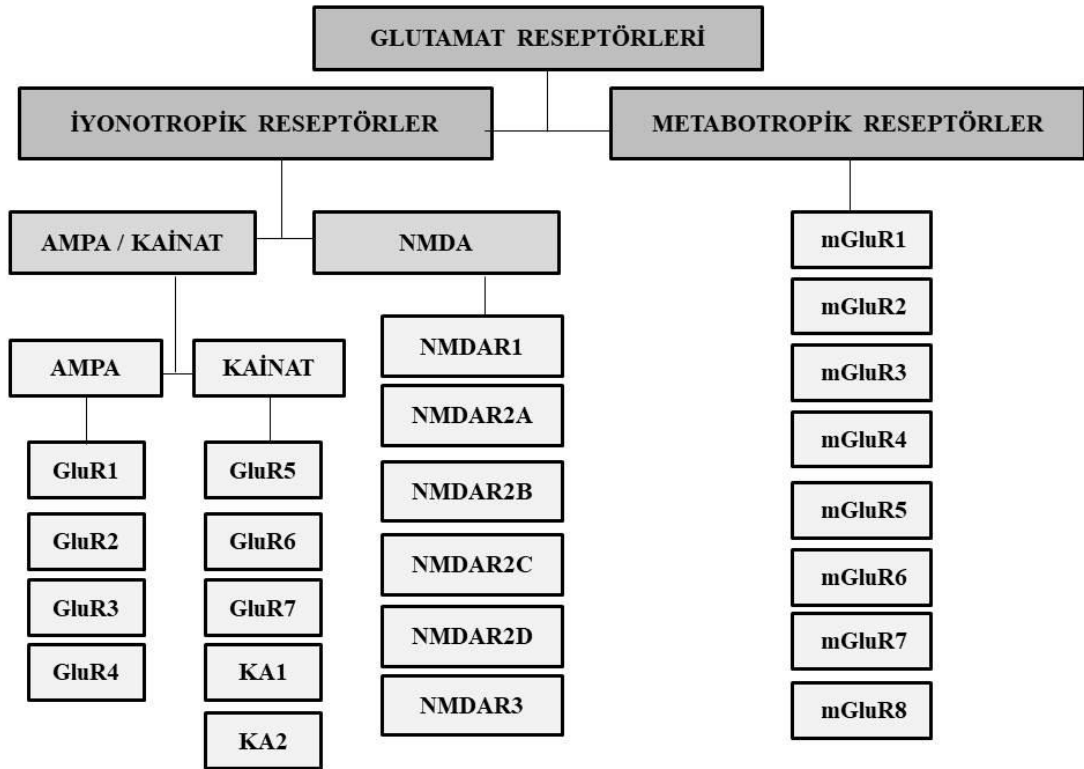
olan glutamat beyinde sadece glutaminden sentezlenmemektedir ve astrositlere geri alınan glutamatın tamamı da glutamine çevrilmemektedir (Gözen O, 2008).

2.3. Glutamata Bağlı Eksitotoksisite

MSS’de katyonlar aracılığı ile gerçekleşen nöronal hasarda en sık rastlanan uyarıcı nörotransmitter glutamattır ve birçok nörodejeneratif hastalığın temelinde, nöronal boşluktaki glutamat seviyelerinde artış görüldüğü bildirilmiştir (Faden ve ark, 1989). Hücre dışındaki glutamatın düşük seviyede tutulması sinaptik ve ekstrasinaptik iletişimin sağlanması için önemlidir ve glutamat seviyesinin yükselmesi toksiktir. Nöronal boşlukta glutamat seviyesinin toksik olan bu artışına, sinir hücresi membranının polarize olmasıyla sinaptik veziküllerden glutamat salınımının uyarılması ya da ATP yetersizliğiyle glutamatın geri toplanması için gerekli olan taşınmanın sağlanamaması yol açmaktadır (Amar ve Levy, 1999). Hücreler arası boşlukta glutamat seviyesi arttıkça, glutamat reseptörleri aşırı uyarılır, bu uyarım nöronal hasar ve ölüme yol açar. Birbirini izleyen bu olaylar, glutamata bağlı eksitotoksisite olarak adlandırılır (Lipton ve Rosenberg, 1994). Glutamat eksitotoksisitesi, hücre içine aşırı kalsiyum iyonunun girişiyle başlar, voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları açılır ya da iyonotropik glutamat reseptörlerinden NMDA reseptörleri aşırı uyarılır. Hücre içindeki yüksek Ca^{+2} seviyesi, mitokondrial işlev kaybı, nükleer şişme ve nekrotik hücre ölümünü beraberinde getirir. Daha az görülen hasarda mitokondri fonksiyonu değişmez, hücreler apoptoza uğramayı seçerler ve hücre içi proteaz, fosfolipaz ve endonükleaz enzimleri aktifleşerek hasar oluşturur (Yıldırım, 2009). Yapılan çalışmalar ışığında travma, serebral iskemi, epilepsi, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı gibi birçok nörodejeneratif hastalıkta nöronal hasar ve ölümün altındaki sebeplerden birinin glutamata bağlı eksitotoksisite olduğu vurgulanmıştır (Lipton ve Rosenberg, 1994). Bu sebeple salınan glutamatın yeniden hücre dışı alandan toplanması önemlidir. Glutamatın uyarıcı etkisinin sonlandırılması presinaptik ve postsinaptik hücre membranlarında bulunan reseptörler ve glial hücre membranlarındaki taşıma sistemleri tarafından sağlanır (Danbolt, 2001).

2.4. Glutamat Reseptörleri

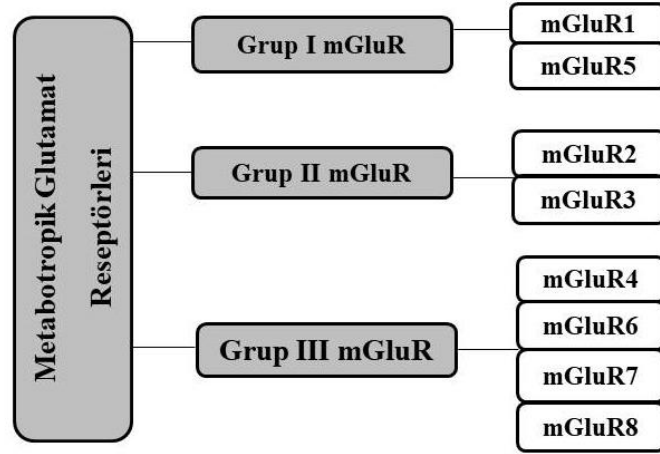
Glutamatın etki etmesinde, farklı yapılara sahip bir dizi glutamat reseptörü görevlidir. Sinir sisteminde bulunan birçok nöron ve glial hücrenin plazma membranı glutamat reseptörlerini ihtiva eder. Glutamat reseptörleri iki ana gruba ayrılır ve farklı gruplarda bulunan reseptörler Şekil 2’de sınıflandırılmıştır (Yıldırım, 2009).



Şekil 2: Glutamat Reseptörlerinin sınıflandırılması. Heath ve Shaw (2002)'den modifiye edilmiştir.

2.4.1. Metabotropik Reseptörler

Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) G-proteinine bağlı olan reseptör familyasıdır ve iyon kanalları oluşturmazlar (Spooren ve ark, 2010). Hücre içi G-proteinleri ile birleşmelerinden dolayı, yavaş sinaptik tepkilere izin verilir (Dong ve ark, 2009). Sekiz farklı mGluR (mGluR1-8) bilinir ve kendi aralarında üç gruba ayrılırlar.



Şekil 3: Metabotropik glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması. Salinska ve ark (2005)'ten modifiye edilmiştir.

Metabotropik glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması Şekil 3'te görüldüğü gibidir ve sırasıyla Grup I, II ve III mGluR'lerin etkileri şu şekildedir:

Grup I mGluR'lerin, aktivasyonları ER (endoplazmik retikulum) depolarından Ca^{2+} salgılanmasında artışa yol açar. Grup I mGluR'lerin iki ana alt tipi vardır, bunlar mGluR 1 ve 5'tir (Salinska ve ark, 2005). Grup I mGluR'lerin aktivasyonu, G-proteinleri yoluyla inositol trifosfat üretimi ve peşinden gelen hücre içi fosfolipaz C'nin aktivasyonuna bağlanır. Ayrıca, G proteininden bağımsız olarak tirozin kinazlarla hipokampal sinapslardaki uyarıcı postsinaptik potansiyelleri de düzenlerler (Lau ve Tymianski, 2010).

Grup II mGluR'ler, iki alt tipe ayrılırlar, bunlar mGluR2 ve mGluR3'tür. mGluR3'ün çoğu, glial hücrelerde bulunur, mGluR2, transmitterlerin serbest bırakılmasını düzenleyen nöronlar üzerinde bulunur (Salinska ve ark, 2005). Bu mGluR'ler, adenilil siklaz sinyallerinde bir azalmaya neden olarak voltaja bağlı kalsiyum kanallarının inhibisyonunu sağlar (Lau ve Tymianski, 2010). Grup II mGluR'ler, voltaja bağlı kalsiyum kanalları üzerinde etkilerle nörotransmisyonu düzenlerler.

mGluR grubu III, en az araştırılan mGluR sınıfıdır, 4 alt tip bulundurulur. Bunlar mGluR4, 6, 7, 8'dir ve özellikleri grup II mGluR'lerle benzerdir. Kalsiyum kanalı girişlerinin düzenlenmesi ile nörotransmisyonu düzenlerler (Salinska ve ark, 2005; Lau ve Tymianski, 2010).

2.4.2. İyonotropik Reseptörler

İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR) üç tiptir ve ligand kapılı iyon kanalları olarak görev alır. Bunlar;

- 1) NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri,
- 2) AMPA (α -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonik Asit) reseptörleri
- 3) Kainat reseptörleri, olarak sınıflandırılabilir (Lewerenz ve Maher, 2015).

2.4.2.1. NMDA Reseptörleri

NMDA reseptörleri (NMDAR), memeli merkezi sinir sisteminde glutamat ile uyarılan ana ligand kapılı iyon kanallarıdır (Danbolt, 2001). NMDAR'ler, glutamat, poliamin, glisin, Mg^{+2} , Zn^{+2} bağlama bölgeleri bulunduran karmaşık bir yapıya sahiptir (Kritis ve ark, 2015). NMDAR'ler nöronların içine yüksek oranda Ca^{2+} girişinin sağlanmasına yardımcı olurlar ve diğer iGluR'lerden farkla Mg^{2+} varlığında voltaja bağlı olarak bloke olurlar. Bir nöron dinlenme potansiyelindeyken Mg^{2+} 'un varlığı, NMDA reseptöründen Ca^{2+} geçişini engeller, fakat depolarizasyon durumunda bu durum ortadan kalkar (Yıldırım, 2009). NMDAR kanalının açılması için diğer iyonotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu ile Mg^{2+} 'un uzaklaştırıldığı bildirilmiştir (Lau ve Tymianski, 2010). Bu reseptörler aynı anda glutamat ve glisin için farklı bağlanma bölgelerine sahip olan karmaşık yapıda reseptörlerdir ve aktivasyonları için bu bölgelere glutamatın ve glisinin bağlanmış olması gereklidir. Glutamat ve glisin için bağlanma bölgelerinin dışında spermin, spermidin gibi poliaminlerin bağlanabileceği bölgelere sahiptirler. Bu bölgelere poliaminlerin bağlanması ise NMDAR'lerin aktivasyonunu yükseltmektedir (Yıldırım, 2009). Çinko (Zn^{+2}) ise glutamat eksitotoksitesi ile ortaya çıkan NMDAR akımlarının inhibe edilebilmesini sağlayabilmektedir (Lau ve Tymianski, 2010).

NMDAR'ler tetramer halindedir, iki NR1 alt birimi ve iki NR2 ya da NR3 alt birimi yer alır. Bu alt birimlerin farklı kombinasyonları farklı işlevlerde NMDAR'leri meydana getirmektedir (Lewerenz ve Maher, 2015). Bunlardan NR1 dimerinden oluşan alt birim iyon kanalı oluşturur ve Mg^{2+} bloğu, glutamat aktivasyonu, Zn^{+2} etkisizleştirme, poliaminler ile etkileşim sağlanması, glisin aktivasyonu ve pH duyarlılığı dahil NMDAR' lara özgü özelliklerin sergilenmesinden sorumludur. NR2 alt birimleri ise NMDAR fonksiyonunda

düzenleyici role sahiptir ve dört farklı NR2 alt tipi (NR2A-D) bulunmaktadır (Lau ve Tymianski, 2010).

2.4.2.2. AMPA Reseptörleri

Bu reseptörler GluR1-4 ya da GluRA-D adı verilen dört alt ünitenin ikili kombinasyonlarından meydana gelirler ve yakınlarında bulunan NMDAR'ları Mg^{2+} bloğundan kurtardıkları düşünülmektedir. Esasen bu reseptörler Na^+ geçişine aracılık ederler; fakat, GluR2 alt ünitesi olmayan AMPA reseptörleri Ca^{+2} 'a da yüksek geçirgenlik gösterir (Yıldırım, 2009). AMPA reseptör alt birimlerinde GluR2 ifadesi azaldıkça, Ca^{2+} geçirgenliğini yüksek ölçüde sağlayan AMPA reseptörleri meydana gelmektedir (Dong ve ark, 2009). Eksitotoksikite mekanizmasına etkileri büyük olasılıkla, depolarizasyon meydana getirirerek voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasını sağlamak ve Na^+-Ca^{+2} pompasını tersine işleterek GluR2 alt ünitesinin üretim miktarının azalmasına yol açmaktır (Yıldırım, 2009).

AMPA reseptörlerinin afinitesi düşüktür, glutamat ile uyarıldıklarında reseptörler hızla açılır, hızla duyarsızlaşırlar. NMDA reseptörlerinin ise zıt şekilde glutamata afiniteleri daha yüksektir ve inaktivasyonları daha yavaştır (Gözen O, 2008). Ayrıca, Kainat ve AMPA reseptörlerinin aktivasyonlarının doğrudan ER stresıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Kritis ve ark, 2015).

2.4.2.3. Kainat Reseptörleri

AMPA reseptörleri ile aralarındaki belirgin farklar saptanamadığından AMPA/KAINAT reseptörleri olarak da adlandırılır ve GluR5-7, KA1-2 alt üniteleri içerirler. AMPA reseptörleri gibi glutamat uyarımını takiben iyon akışına izin verirler, çoğunlukla Ca^{+2} 'ya karşı geçirgen değillerdir (Yıldırım, 2009; Lau ve Tymianski, 2010). AMPA ve kainat reseptörleri Na^+ iletkenliğine sahiptir (Lewerenz ve Maher, 2015). Bu reseptörlerin beyindeki yerleşimleri amigdala, bazal ganglionlar, entorinal korteks ve serebellumda farklı ifade seviyeleri göstermektedir Bununla beraber, hipokampusta yüksek oranda ifade edilirler. KA1 (GluK4) alt birimleri CA3 piramidal hücrelerinde yüksek ifade seviyesi gösterirken,

KA2 (GluK5) alt birimleri ise CA1 ve CA3 piramidal hücrelerinde yüksek seviyede ifade göstermektedir (Lévesque ve Avoli, 2013).

2.5. Glutamat Taşıyıcıları

2.5.1. Eksitatör Amino Asit Taşıyıcıları (EAAT'ler)

Eksitatör amino asit taşıyıcıları (EAAT'ler), membrana bağlı konumlanmış iyon kanallarına benzer pompalardır. Bu pompalar glutamat sinaptik boşluğa salındıktan sonra, hücre dışı alanda artan glutamat seviyesini azaltmak için glutamati hızla toplarlar ve sinaptik aktarım bu taşıyıcılarla sona erdirilir (Beart ve O'Shea, 2007).

MSS'de bulunan tüm hücre tiplerinde glutamat taşıyıcıları bulunmasına rağmen, hücre dışı alandan glutamatın toplanmasında en çok astrosit hücreleri görev almaktadır (Kim ve ark, 2011). Astrosit hücrelerinde glutamatın glutamin sentetaz enzimiyle glutamine çevrildiği, oluşan glutaminin tekrar nöronlar tarafından alınarak glutamata dönüştürülüp yeniden nörotransmisyonunda kullanıldığı düşünülmektedir (Coulter ve Eid, 2012). EAAT'lerin aktivitesi protein ekspresyonu, fosforilasyon ve doğrudan modifikasyonlar gibi birçok olay ile düzenlenir (Kim ve ark, 2011).

2.5.1.1. Eksitatör Amino Asit Taşıyıcı Tipleri

Presinaptik nörondan glutamat salınır, postsinaptik nöronlardaki iyonotropik glutamat reseptörleri uyarılır, hücre depolarizasyonu ve aksiyon potansiyeli oluşur. Glutamatın hücreler arası boşluğa salınması ve hücreler arası boşluktan temizlenmesi arasında sıkı bir denge ve denetim vardır (Kanai ve Hediger, 2003). Bu denetimi sağlayan glutamat taşıyıcıları beş alt tipte toplanmıştır (Arriza ve ark, 1994). Bunlardan üçü kemirgen beyinde tanımlanmış ve GLAST, GLT-1 ve EAAC1 olarak adlandırılmıştır. Kemirgenlerdeki, bu glutamat taşıyıcılarının insanlardaki homologları Tablo 1'de gösterildiği gibi sırasıyla EAAT1, EAAT2 ve EAAT3'tür. EAAT4 ve EAAT5 ise insan ve kemirgen için ortaktır (Kim ve ark, 2011).

Tablo 1: Kemirgenlerde ekspresyon gösteren EAAT'lerin insanlardaki homologları. Kim ve ark (2011)'den modifiye edilmiştir.

Kemirgenlerdeki EAAT Tipleri	Kemirgenlerdeki EAAT Tiplerinin İnsanlardaki Homologları
GLAST	EAAT1
GLT-1	EAAT2
EAAC1	EAAT3
EAAT4	EAAT4
EAAT5	EAAT5

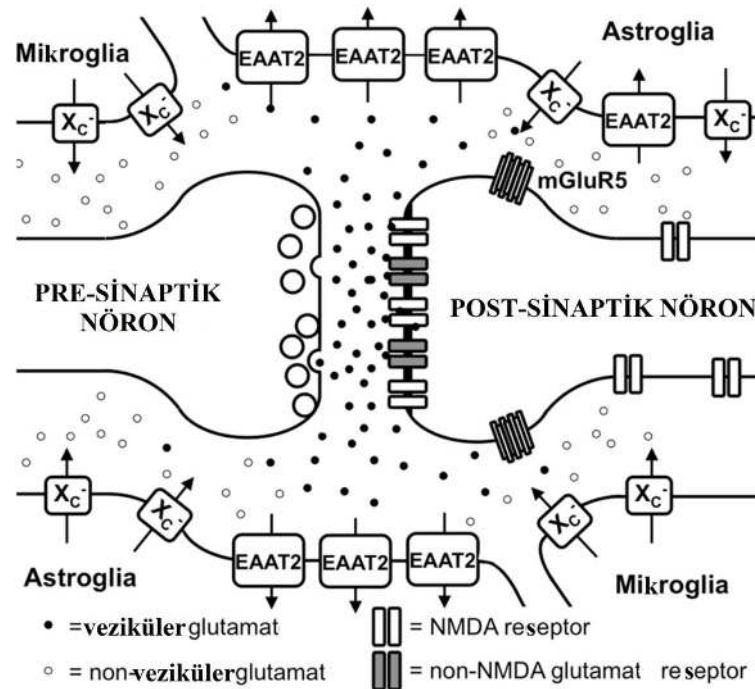
Tablo 2: EAAT'lerin sınıflandırılması. Kim ve ark (2011)'den modifiye edilmiştir.

EAAT Tipi	MSS'de İfade Yeri	Hücre İfade	Özellikleri
EAAT1	Serebellumda en yüksek ifade, ayrıca korteks korteks ve omurilik	Astrositler	MSS gelişimi sırasında ifadesi gerçekleşen ana alt tiptir.
EAAT2	Beyin boyunca omurilik	Öncelikli olarak astrositler ayrıca nöron ve oligodendrositler	Glutamat toplanımının %90'dan fazlasından sorumludur.
EAAT3	Beyin boyunca, özellikle korteks, hipokampus, beyincik ve bazal gangliyonlar	Post-sinaptik nöronal terminaller, astrositler	Hücre içi kinazlar ve kolesterol tarafından dinamik düzenlenme altında membran ekspresyonu özelliği gösterir.
EAAT4	Purkinje hücrelerinin soma ve dendritleri (serebellum), hipokampus ve neokorteks	Post-sinaptik nöronal terminaller ve astrositler	Yüksek Cl ⁻ iletkenliği, nöron uyarılabilirliğinin düzenlenmesi, nöronların depolarizasyonuna karşı koyma özelliklerine sahiptir.
EAAT5	Retina	Çubuk, fotoreseptör ve bipolar hücreler	Yüksek Cl ⁻ iletkenliği gösterir.

Tablo 2’de gösterildiği gibi glutamat taşıyıcıları beyinde farklı bölgelerde farklı şekillerde ifade edilirler. GLAST ekspresyonu beyinde serebellumda, ön beyin ve hipokampusta, GLT1 ekspresyonu ise serebellumda ve ön beyinde belirgin seviyelerde seyrederek. GLAST ve GLT-1 (EAAT1 ve EAAT2) aynı zamanda astrosit hücrelerinde yer alan taşıyıcılardır. EAAT3, ağırlıklı nöronal ifadeye sahiptir. Fakat, beynin farklı bölgelerinde çok düşük seviyelerde ifadelerine rastlanılabilir. EAAT4 sadece serebellumda, EAAT5 ise sadece retinada eksprese edilir (Kim ve ark, 2011).

2.5.1.2. GLT-1 (EAAT2)

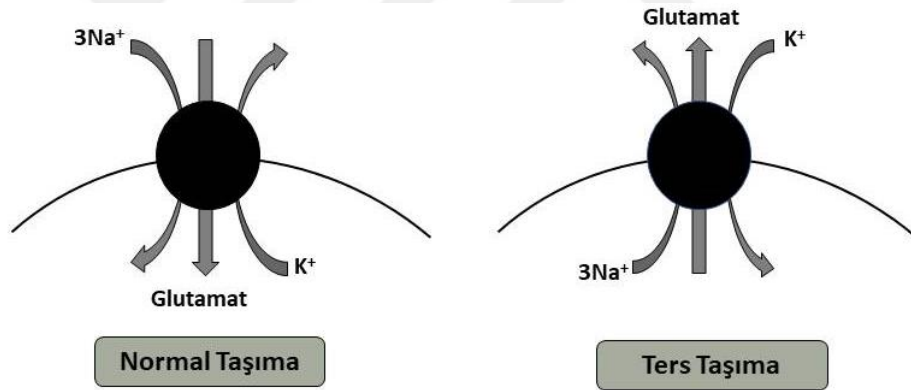
GLT-1 (EAAT2)' in fizyolojik görevi, MSS boyunca nöronlardan hücre dışı boşluğa salınan glutamati geri toplamaktır. GLT-1 ifadesi azaldığında ya da işlevini yerine getiremediğinde glutamat geri alınımı bozulur ve hücreler arası boşlukta glutamat seviyesi artar. Sinaptik boşlukta glutamat seviyesinin artması, nöronal ölümü beraberinde getirir ve Alzheimer hastalığı, farklı epilepsi çeşitleri, inme/iskemi, travmatik beyin hasarı, ALS (amyotrofik lateral skleroz) gibi pek çok nörolojik rahatsızlığın patogenezinde yer alır (Kim ve ark, 2011).



Şekil 4: EAAT2’lerin ve diğer glutamat taşıyıcılarının astrositlerdeki konumu. Lewerenz ve Maher (2015)’ten modifiye edilmiştir.

Şekil 4'te gösterildiği gibi glutamat presinaptik nörondan veziküller aracılığıyla sinaptik boşluğa salınır ve sinaptik boşlukta konsantrasyonu artan glutamat, postsinaptik nöronda bulunan glutamat reseptörlerini uyarır. Sistin/glutamat değişiricisi olan X^c sistemi astrositlerde ve mikroglia da ifade edilmektedir. Bu taşıyıcı glutatyon üretiminin gerçekleşmesi için gereken hücrelere sistin kaynağı sağlayarak işlev görür, düşük kapasiteli gibi düşünülmesine rağmen, hücre dışında glutamatın büyük oranda azaltılmasını sağlar (Lewerenz ve Maher, 2015; Sheldon ve Robinson, 2007).

MSS' de, gelişim dönemi sırasında GLT-1 ifadesi oldukça düşük miktarda seyreder ve MSS'de bulunan astrosit hücrelerinde daha fazla ifade edilir. Hücresel boşlukta fazla glutamatın toplanmasının %90' ından fazlası GLT-1 ile sağlanır. Bu nedenle, yapılan çalışmalarda GLT-1 nakavt farelerde, gelişimlerinin altıncı haftalarında hipokampal nöronlarda yüksek ölüm miktarı görüldüğü ve buna bağlı nöbetler geliştiği bildirilmiştir (Tanaka ve ark, 1997; Kim ve ark, 2011).



Şekil 5: GLT-1 tarafından glutamat molekülünün taşınımı. Kanai ve Hediger (2003)'ten modifiye edilmiştir.

GLT-1 (EAAT2), glutamatın astrositler içerisine alınmasını inorganik iyonların taşınması ile eşleştirir. Bu iyonlarda depo edilen serbest enerji glutamatın taşınması için kullanılır. GLT-1, Şekil 5'te olduğu gibi taşınımı gerçekleştirecek olan her bir glutamat amino asiti için üç Na^+ ve bir H^+ iyonunu glutamat ile birlikte hücre içine alır ve bir K^+ iyonunu hücrenin dışına çıkarır (Kanai ve Hediger, 2003).

2.6. Eksitotoksisite İçin Terapötik Stratejiler

2.6.1. NMDAR'lerin Hedeflenmesi

NMDAR'ler, Ca^{2+} 'un nöronlara akışında oldukça geçirgendir, bu nedenle eksitotoksitede önemli bir noktada yer alır. NMDAR hedeflenmesi ve bloke edilmesinin, glutamat salınımı ve eksitotoksik etkilerinin belirli bir kısmına engel olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, nörodejeneratif hastalıklara karşı terapötik stratejiler arasında yer alır (Lin ve ark, 2012). Fakat, yapılan çalışmalarda NMDA antagonistlerinin çoğunluğunun kullanımının hastalarda şizofreni benzeri semptomlar geliştirdiği bildirilmiştir. Kullanımda olan NMDA antagonistlerine örnek olarak memantin ve rilüzol verilebilir. Memantin, Alzheimer hastalığının ileri aşamalarında tedavi amaçlı olarak kullanılırken, rilüzol ALS hastalığı için onay verilmiş olan tek farmakolojik tedavidir (Lin ve ark, 2012).

2.6.2. EAAT2 (GLT-1)'in Hedeflenmesi

Eksitotoksite için diğer bir terapötik strateji, hücreler arası boşlukta glutamat konsantrasyonunun düşürülmesinde en çok görev alan EAAT2 (GLT-1)'nin hedeflenmesidir. EAAT2'nin ifadesi transkripsiyon ve translasyon ile düzenlenir (Lin ve ark, 2012).

EAAT2 ifadesinin arttırılması, EAAT2 transkriptlerinin arttırılması ile sağlanabilir. Bu nedenle kortikosteron, retinol gibi transkripsiyonel faktörler EAAT2 transkriptlerinin seviyelerini yükseltmek için kullanılabilir. (Tian ve ark, 2007; Sheldon ve Robinson, 2007). EAAT2 transkripsiyonel aktivatörlerinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada insan EAAT2 promotörü aktivasyonun seftriakson (β -Laktam antibiyotik), amoksisilin ve dibutiril siklik AMP ile düzenlenebileceği bildirilmiştir (Rothstein ve ark, 2005).

EAAT2 mRNA'sında azalma görülmediğinden dolayı, EAAT2 proteinin kaybının transkripsiyon sonrası oluşan problemlerden kaynaklı geliştiği düşünülür. EAAT2 translasyon düzenleyicilerini klonlamak için yapılan bir çalışmada EAAT2 protein seviyesini attıran birçok bileşik kaydedilmiş ve elde edilen bileşik serilerinden biri, ALS ve epilepsi kronik eksitotoksisite modeli olacak şekilde iki hayvan modelinde çalışılmıştır. Yapılan çalışma sonunda bileşiğin önemli koruyucu etkiler sağladığı bildirilmiştir (Colton ve ark, 2010; Xing

ve ark, 2011). EAAT2 ifadesi arttırılmış transgenik farelere kainik asit, pilokarpin gibi glutamat toksisitesi oluşturan kimyasallar uygulandıktan sonra diğer farelere kıyasla daha az şiddetli nöbetler geçirdikleri ve nöron hücre ölümünde azalma olduğu bildirilmiştir (Sheldon ve Robinson, 2007). Ayrıca, EAAT2 geninin transkripsiyonu ve ekspresyonu EGF, hipofiz adenilat siklaz aktifleştirici polipeptit, TGF- α , PDGF gibi büyüme faktörleri hedef alınarak artırabilir (Zelenaia ve ark, 2000; Figiel ve ark, 2003).

2.7. Mitokondri, Endoplazmik Retikulum ve Lizozomda Eksitotoksiteye Bağlı Olarak Görülen Değişimler

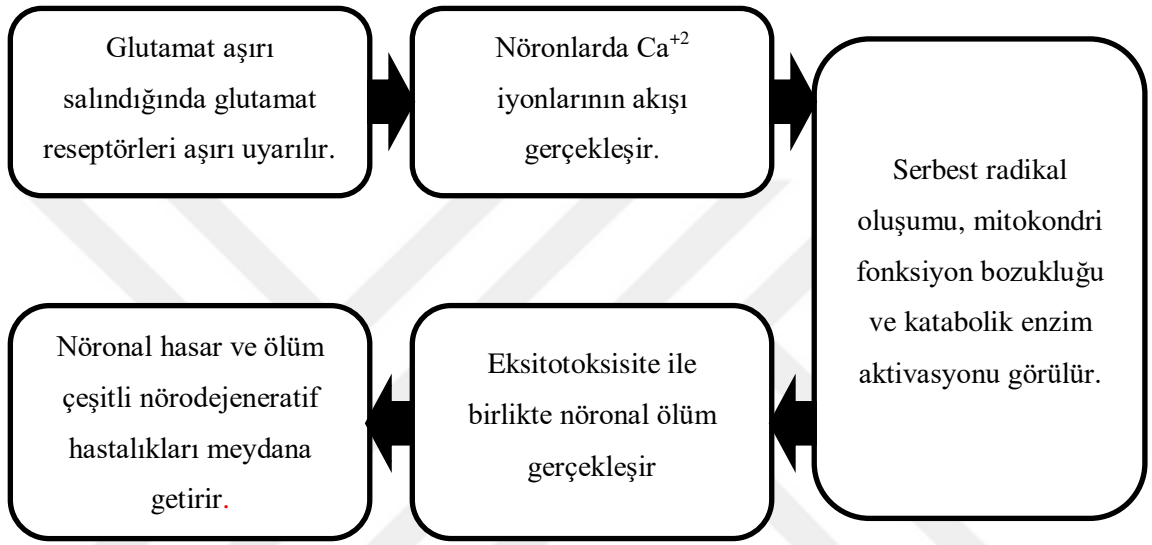
Glutamat reseptörlerinin aşırı uyarımı ile hücrel kalsiyum dengesi bozulur ve nitrik oksit (NO) oluşumu, serbest radikal oluşumu ve apoptoz aktivasyonu görülür (Wong ve ark, 2002). Glutamat reseptör kanallarından devamlı gerçekleşen Ca^{2+} akışının nöronların ölümünde ortak nokta olduğu düşünülmektedir. MSS'deki glutamatın artan seviyeleri hücre içi Ca^{2+} seviyesinde yükselmeye, bu da mitokondri ve ER gibi hassas organellerin Ca^{2+} düzeylerinde artışa neden olmaktadır (Friedman, 2006). Ca^{2+} artışı hücre ölümünü teşvik eder, Ca^{2+} dengesinin yeniden kurulamaması Ca^{2+} aracılığıyla oluşan nörotoksiste ve hücre ölümüne neden olur (Dong ve ark, 2009).

2.7.1. Eksitotoksiste ve Mitokondri

Mitokondri sadece ATP üretmekten sorumlu değildir. Aynı zamanda, hayatta kalma/ölüm sinyal yollarında (otofaji ve apoptoz) hücre kaderini belirler. Eksitotoksiste ile birlikte hücre içinde Ca^{2+} seviyesi artar. Bu artış mitokondride de Ca^{2+} artışına neden olarak ROS (reaktif oksijen türleri) oluşumuna ve proapoptotik faktörlerin sitozole serbestlenmesine aracılık eder. Bu etkinin sonucunda apoptoz mekanizmaları ile nöronal ölüme giden birçok olay gerçekleştirilir (Dong ve ark, 2009).

Eksitotoksistede artan ROS seviyeleri, antioksidan mekanizmaların düzenlenmesini azaltır ve bu durum nörodejeneratif hastalıklarda nöron ölümü ile sonuçlanır (Farooqui ve Farooqui, 2009). Normalde hücreler serbest radikal hasarına karşı antioksidanlarla korunurlar, antioksidan sistemler serbest radikallere maruz kaldığında, oksidatif hasar ve hücre ölümü

gerçekleşebilir. Oksidatif stres sonucunda NO oluşumu gerçekleşir. NO, süperoksit radikalleriyle reaksiyona girdiğinde peroksinitrit adı verilen zararlı reaktifi oluşturur. Bu reaktifin miktarının artması nörodejeneratif hastalıklara neden olur (Ezza ve Khadrawy, 2014). Hücre içinde ROS, JNK yolağının ya da nükleer faktör-B (NF-κB) transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile sitokrom-C'nin salınmasına yol açar. Bu değişimler mitokondri aracılığıyla hücre ölümü ve hasarına neden olabilir. ROS'un kontrol edilmesi nörodejeneratif hastalıklar için çok önemlidir (Morgan ve ark, 2007)



Şekil 6: Eksitotoksisitenin mitokondri aracılı hasarı. Ezza ve Khadrawy (2014)'den modifiye edilmiştir.

Özetle, Şekil 6'da gösterildiği gibi glutamatın aşırı salınması glutamat reseptörlerini aşırı uyarır, nöronlara Ca^{2+} akışı gerçekleşir, mitokondride de artan Ca^{2+} seviyesinin zararlı etkileri arasında, serbest radikallerin oluşumu, mitokondri fonksiyonunun bozulması, katabolik enzimlerin aktive edilmesi görülmektedir. Eksitotoksisitenin meydana gelmesiyle nöronal ölüm görülür ve bu birçok nörodejeneratif hastalığa yol açabilir (Ezza ve Khadrawy, 2014).

2.7.2. Eksitotoksisite'nin ER ve Lizozom ile İlişkisi

Endoplazmik retikulum, proteinlerin doğru katlanması, translasyonu, translasyon sonrasında geçirdikleri modifikasyonlar ve hücre içi Ca^{2+} depolamasında sorumlu hücresel bir organeldir. ER fonksiyonlarının bozulması katlanmamış proteinlerin birikmesi, Ca^{2+}

dengeindeki değişimler gibi hasarlara neden olabilir (Kritis ve ark, 2015). Lizozomlar, hücre içinde sindirim için gerekli hidrolitik enzimleri içerirler, eksitotoksik koşullarda ise artan otofaji seviyesinden dolayı lizozom sayılarının artışıyla nöronal ölüm artar (Kritis ve ark, 2015).

2.8. Epilepsi

Epilepsi, tekrarlayan nöbetler ile karakterize edilen, her yaştan ve cinsiyetten insanı etkileyen kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalıkta görülen nöbetlere beyin, bilinç, duyum ve davranışta değişikliklere neden olan normal olmayan elektriksel boşalmalar neden olmaktadır. Epilepsi gelişiminde, beyindeki elektriksel iletide anormallik ve nörotransmitter dengesizlik ya da bunların birleşmesi görülebilir. Primer ve sekonder epilepsi olarak iki gruba ayrılabilir. Primer epilepsi bilinmeyen nedenlerle ortaya çıkarken, sekonder epilepside görülen nöbetlerin altında anoksi, travma, metabolizmadaki dengesizlikler, ensefalit, tümörler, nörotoksisite gibi birçok neden olabilir (Reddy ve Kuruba, 2013). Epileptik nöbetler, kısmi nöbetler, kortikal bölge merkezli başlayan nöbetler ve başlangıçta her iki yarımküreyi de etkileyen nöbetler olarak sınıflandırılır (Duncan ve ark, 2006). Epilepsi için risk faktörleri arasında, serebrovasküler hastalıklar, alkol, travmatik baş hasarları, beyin tümörleri, kortikal gelişim malformasyonu, genetik kalıtım ve MSS’de görülen enfeksiyonlar yer almaktadır (Jacobs ve ark, 2009).

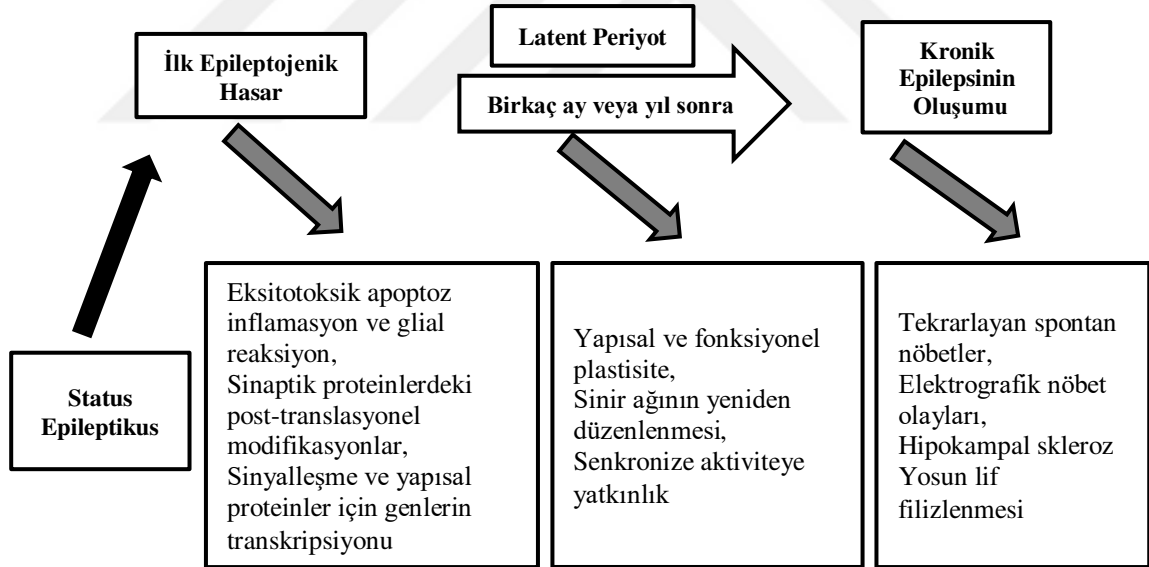
Nöronal ağların değiştirildiği ve kronik nöbetlerin oluşumuna neden olan süreç epileptogenez olarak adlandırılır ve üç aşamayı içerdii düşünölmektedir (Maguire, 2016).

1. İlk hasar, travmaya bağlı beyin hasarı, beyin enfeksiyonları, inme ya da uzun süreli nöbet gibi epileptogenez sürecini başlatan etkidir.
2. Gizli dönem, haftalarca ya da aylarca süren, nöbet görölmeyen, hücrel ve moleköl değişikliklerle nöronal ağın uyarılabilirliğinin değiştii dönemdir ve bu dönem ilk hasar ile ilk spontan nöbet arasında geçen süreyi ifade eder.
3. Kronik epilepsi aşaması, kendiliğinden ve tekrarlayan nöbetlerin sergilendiği aşamadır.

Günümüzde, daha etkili antikonvülsan ilaçların olması ve epilepsi türlerinin çeşitliliği nedeniyle doğal epilepsi ilerlemesinin izlenmesi kolay değildir. Bu nedenle epileptogenez ve anti-epileptojenik hedef tanımlamasının yapılması da zordur (Maguire, 2016).

2.8.1. Status Epileptikus

Status epileptikus (SE), 30 dakikadan uzun süren sürekli bir nöbet ya da ikisi arasında bilincin tam olarak yerine gelmediği iki veya ikiden fazla nöbet olarak tanımlanır. SE hastalarının yaklaşık üçte birinde birinci basamak ilaçlara dirençli kalıcı nöbetler olabildiğinden genellikle ikinci basamak ilaçlarla agresif yönetimin sağlanması gerekir. SE'nin tanınması ve tedavisinin erken başlatılması oldukça önemlidir (Cherian ve Thomas, 2009). SE, hayati tehlike oluşturan acil bir durumdur, tedavisi gerçekleştirilmezse nöbetlerin sona ermemesine bağlı olarak beyin hasarı ve ölüm gerçekleşebilir (DeLorenzo, 1992; Knake ve ark, 2009). SE patofizyolojisi açıkça aydınlatılamamakla birlikte, aşırı uyarıcı glutamatın nörotransmisyonu ve normal inhibitör GABA'nın nörotransmisyon kaybının en olası mekanizmalar olduğu düşünülmektedir (Reddy ve Kuruba, 2013).



Şekil 7: Status epileptikusu takiben epileptogenezin altında yatan patofizyolojik temeller. Reddy ve Kuruba (2013)'ten modifiye edilmiştir.

SE ile gerçekleşen nöronal hasar Şekil 7'de tarif edildiği gibi birçok sinyalleme olayını aktif hale getirir ve nöron yapısı ve fonksiyonu değiştirilir. Latent dönemde uzun sürede gerçekleşen sinaptik devrelerde yeniden düzenleme, nörogenez, yosun lif çimlenmesi ve aşırı

derecede stabilite durumu görülür. Son olarak tekrarlayan spontan nöbetler geçirilen döneme geçilir (Reddy ve Kuruba, 2013).

SE' yi ya da sürekli nöbetleri taklit eden deneysel modeller geliştirilmiştir, bu modellerin sınıflandırılması Tablo 3'te gösterilmiştir ve nöronal hasar ve epilepsi mekanizmalarını anlamada yarar sağlarlar (Reddy ve Kuruba, 2013).

Tablo 3: SE modellerinin sınıflandırılması. Reddy ve Kuruba (2013)'ten modifiye edilmiştir.

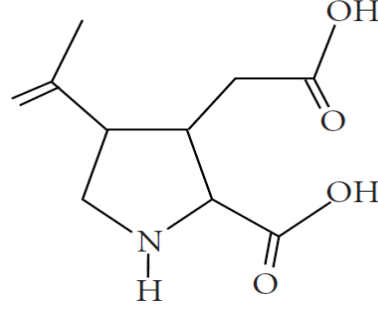
Sınıflandırma	Modeller
Elektrikli model	Perforant yolak uyarımı, Kendini sürdüren uyarım
Kimyasal modeller	Kainik Asit, Pilokarpin, Lityum-Pilokarpin, Organofosfatlar
Termal modeller	Hipertermi veya ateşli nöbetler, Beyin dilimlerinde yüksek potasyum, Beyin dilimlerinde 4-Aminopiridin, Organotipik dilim kültürleri
İn vitro modeller	Beyin dilimlerinde düşük magnezyum
Reflektör modelleri	Lityum-Pilokarpin, Kainik Asit, DFP

SE, patofizyolojisi, karakterizasyonu ve terapötik müdahalelerin değerlendirilmesinin sağlanması için kemirgenlerde kullanılan kimyasal modeller bulunur. Kainik asit, pilokarpin, lityum-pilokarpin gibi ajanlar ile SE indüklemesi gerçekleştirilir. Kainik asit modeli en çok çalışılan nöbet modellerinden biridir (Reddy ve Kuruba, 2013).

2.9. Kainik Asit

Kainik asit (KA), [2-karboksi-4-(1-metiletenil)-3-pirrolidiasetik asit], glutamatın bir analogudur ve nörotoksisite oluşturulmasında glutamata göre otuz kat daha fazla etki göstermektedir (Zhang ve Zhu, 2011; Sairazi ve ark, 2015). 1950'lerin başlarında kırmızı algerlerden olan *Digenea simplex*'ten izole edilmiştir (Murakami ve ark, 1953). Şekil 8'de moleküler yapısı ifade edilen KA'nın molar kütlesi 213.23 g/mol, moleküler formülü ise C₁₀H₁₅N₀₄'dür. Önceleri bağırsaktan solucanları uzaklaştırmak için kullanılan antihelminth bileşiği iken, sonraki çalışmalarda güçlü nörotoksin özelliğine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Vincent ve Mulle, 2009). KA'nın ortaya koyduğu patolojik değişiklikler MSS'de

nörodejenerasyon ile birlikte görülen patolojik etkilere benzediğinden nörodejeneratif hastalık temelinde yatan eksitotoksisitenin patogenezinin anlaşılmasında model olarak kullanılmaktadır (Zheng ve ark, 2011). KA, iGluR'lerinin kainat alt tipinin agonisti olarak işlev göstermektedir. (Sairazi ve ark, 2015)



Şekil 8: KA'nın moleküler yapısı. Zheng ve ark (2011)'den modifiye edilmiştir.

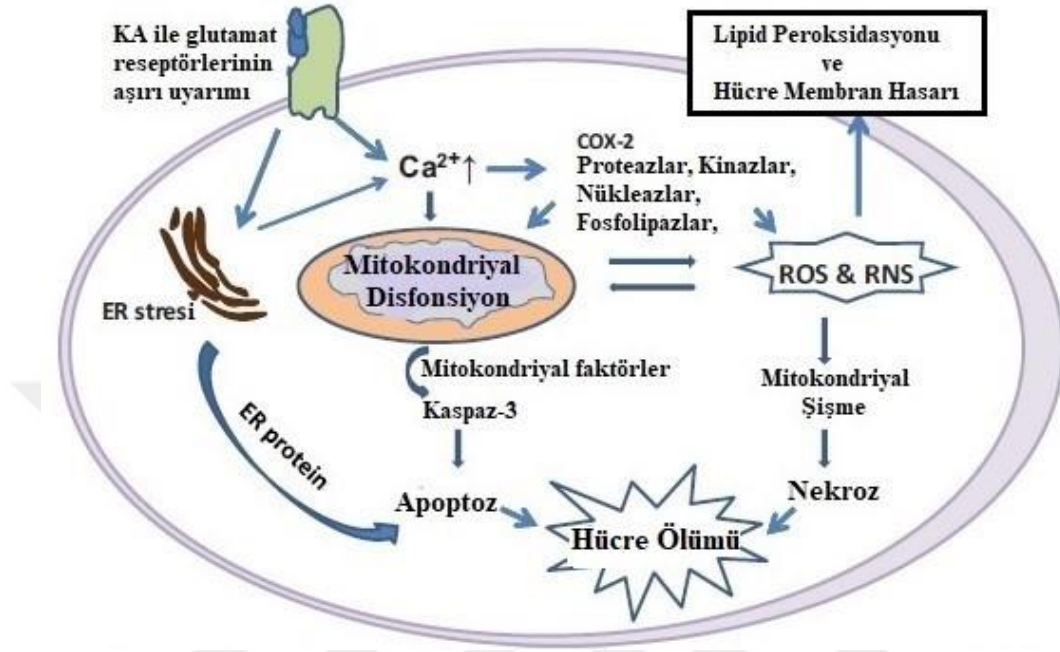
KA, epileptojenik ve nöreksitotoksik etkilerini, kainat reseptörlerini (KAR) uyarak ortaya koyar. Bu reseptörlerin glutamata karşı yüksek afiniteye sahip olması ve hipokampusun CA3 bölgesinde yüksek oranda bulunmaları hipokampusu KA kaynaklı eksitotoksik hasara için duyarlı duruma getirir ve bu bölge bazı epilepsi modellerinde nöbet başlangıç bölgesini oluşturmaktadır. KA1 ve KA2 dışındaki KAR alt birimleri KA'nın uyarıcı özelliğine katkı sağlar (Lévesque ve Avoli, 2013). KAR'ler, nörodejeneratif modeller için glutamatın etkisinin taklit edilmesinin yanı sıra glutamat için diğer iyonotropik reseptörleri ayırt etmek için de kullanılmaktadır (Zheng ve ark, 2011).

2.9.1. Kainik Asitin Nörodejeneratif Etki Mekanizması

KA, glutamat reseptörlerini aşırı uyarır, nöronal membranda depolarizasyona neden olur. Bunu takiben, hücre içine Ca^{2+} iyonu akışı görülür ve eksitotoksisite kaynaklı birçok nöronal olay tetiklenir (Sairazi ve ark, 2015).

KA'nın deneysel hayvan modellerindeki çalışmalarda, KA uygulaması nöbet, oksidatif stres, glial aktivasyon, ER stresi, inflamatuvar mediatörlerin üretimi, mitokondriyal disfonksiyon gibi olaylara neden olmaktadır (Sairazi ve ark, 2015). KA uygulamasının, hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerinde ve dentat gyrus hilüsünde geri dönüşümü olmayan

nöronal dejenerasyona neden olduğu bilinmektedir (Ben-Ari, 1985). Kemirgenlere KA enjeksiyonu, limbik SE'ye yol açarak kemirgenlerde uzun süren ve tekrarlayan nöbetlere sebep olmaktadır (Sairazi ve ark, 2015).



Şekil 9: KA aracılı nöronal ölüm mekanizması. Zhang ve Zhu (2011)'den modifiye edilmiştir.

KA, Şekil 9'da gösterildiği gibi kainat reseptörlerini uyarır ve hücre içinde Ca^{2+} seviyesi yükselir, bu yükseliş serbest radikal oluşumunu uyarabilir (Sairazi ve ark, 2015). KA ile glutamat reseptörlerinin aşırı uyarımı, oksidatif stres araçları olan ROS'ların miktarında artışa sebep olur (Bruce ve Baudry, 1995). Oksidatif stres hücre, membran ve DNA gibi birçok hücresel yapıda zarara neden olur. KA kaynaklı, mitokondride görülen fonksiyon bozukluğu ile birlikte mitokondriyal faktörlerin serbest bırakılması, kaspaz aktivasyonu ve apoptotik aktivasyonundan sorumlu olan proteazları tetiklemektedir (Sairazi ve ark, 2015). Hücre içi Ca^{2+} miktarındaki artış, Ca^{2+} iyonuna bağımlı enzimlerin aktivasyonunu artırır. KA, nöronal apoptozda görevli ER proteinleri Bip, Chop ve kaspaz-12'nin aktive olmasına neden olur ve endoplazmik retikulumda ER stresine yol açar. Ca^{2+} iyonunun aşırı artışı ve aşırı serbest radikal miktarı, doğrudan mitokondriyal şişme yaratarak nöronlarda nekroza sebep olur (Zhang ve Zhu, 2011).

Glial aktivasyon ve nöroinflamasyonun nörodejenerasyonun gelişimine ve ilerlemesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Nöronal yaralanma ile birlikte nöronlar, glial hücrelerle etkileşime geçerler yani nöronların hayatta kalması glial hücrelerin aktivitesi ile bağlantılıdır. Glial hücrelerin aktivasyonu KA uygulamasını takiben gözlenen nöronal ölüm ile ilişkilidir (Chen ve ark, 2005; Zhang ve ark, 2007). Aktif glia hücreleri interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi nörodejenerasyona neden olan birçok inflamatuvar mediatörün üretimini gerçekleştirir ve bu mediatörlerin nörodejenrasyona katkı sağladığı düşünülmektedir (Zhang ve ark, 2007; Lu ve ark, 2008).

2.9.2. Kainik Asit Modelinin Olumlu ve Olumsuz Özellikleri

KA, insanlarda görülen epilepsi nöbetlerine benzer, nöronal hasarla bağlantılı, sağlam ve kalıcı nöbetlere yol açması ve kullanımının basit olması gibi olumlu özelliklere sahiptir. Bu modelin sahip olduğu bir dezavantaj, farklı suş, cinsiyet, yaş ve ağırlıktaki sıçanların KA'ya karşı farklı duyarlılık sergilemeleridir Bu modelin sahip olduğu diğer bir kısıtlama, KA'nın doğrudan nötr toksik etkiye sahip olmasıdır ve bu doğrudan oluşan nöronal hasarı, nöbetin neden olduğu nöron hasarından ayırmayı zorlaştırır (Ben-Ari ve ark, 1981; Rao ve ark, 2006).

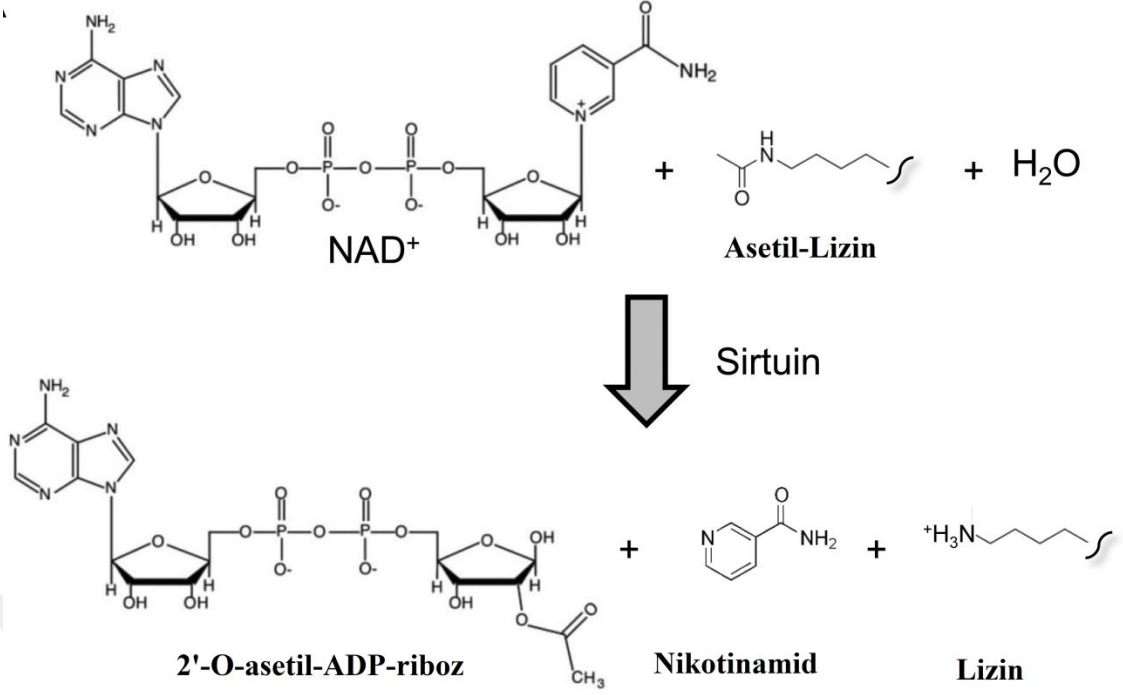
2.10. Sirtüinler

Sessiz bilgi düzenleyicisi adı verilen ve hücresel birçok süreçte rol oynayan Sir protein ailesinden Sir2, 1984'te *Saccharomyces cerevisiae*'de keşfedilmiştir ve yaşam süresi uzunluğu ile Sir2 arasında bir bağlantı olduğu düşünülmüştür (Kaeberlein ve ark, 1999). Sir2 ile ilgili yapılan sonraki çalışmalarda, *C. elegans* ve *D. melanogaster* üzerinde de yaşam süresinin desteklenmesine olan etkilerinin benzer olduğu başarıyla gösterilmiştir. Yaşam süresi artışı *C. Elegans* 'ta iyi bir şekilde gözlenirken, *D. melanogaster*'de ise yaşam süresindeki artış kalori kısıtlaması ile korele bir şekilde gözlenmiştir. Bu durum *D.melanogaster*'da Sir2'nin yaşam süresine olan etkisini tartışmalı hale getirmiştir (Yalcin G, 2018). Sir2 homologları sirtüinler olarak adlandırılmıştır.

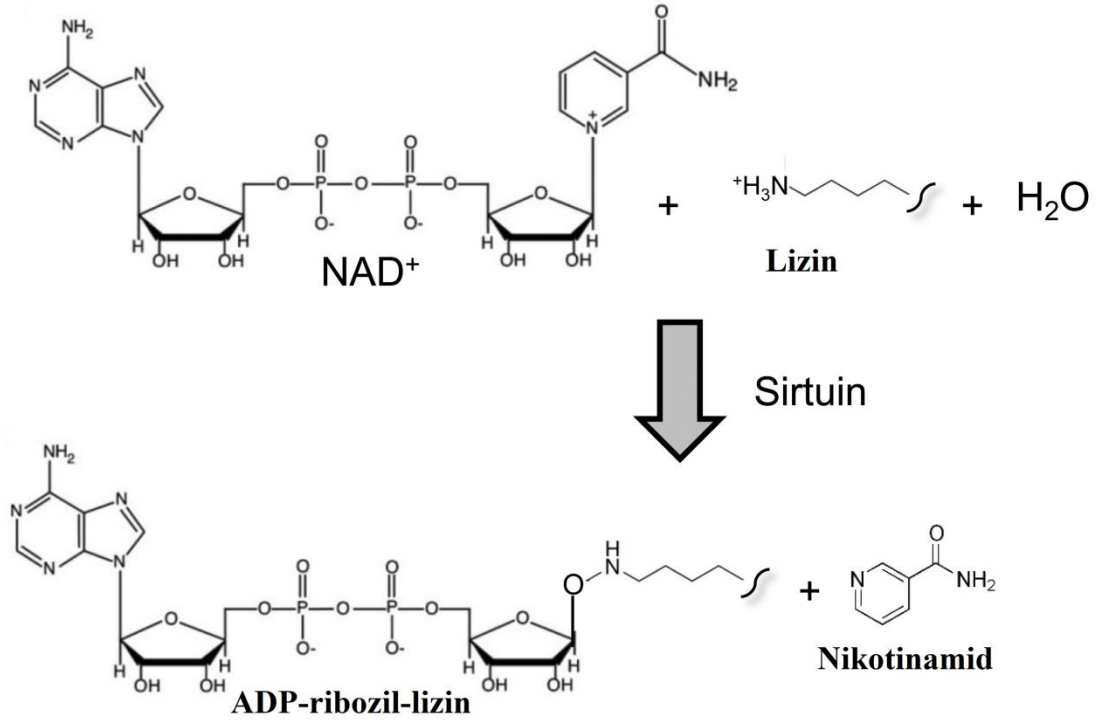
2.10.1. Sirtüinlerin Enzim Aktiviteleri

Proteinlerin stabilitesinin sağlanması, DNA tarafından tanınmaları, proteinlerle kurdukları etkileşimler gibi birçok hücrel fonksiyon protein asetilasyonu ile düzenlenmektedir (Kouzarides, 2000). Proteinlerin deasetilasyon ve asetilasyonu, proteinlerin translasyon sonrasındaki modifikasyonlarının düzenlenmesinde önemli mekanizmalardandır. Post-translasyonel modifikasyonlarda histon ve histon olmayan proteinlerin lizin rezidüleri üzerinde etkili olan histon deasetilazlar (HDAC'lar) ve histon asetiltransferazlar (HAT'lar) birbirlerine zıt şekilde çalışmaktadır. HDAC'lar sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere üç temel sınıfa ayrılmıştır. Sınıf III HDAC'lar içerisinde Sir2 yer alır ve birçok canlıda homologlarının varlığı bilinmektedir, bu homologlar sirtüinler olarak isimlendirilir ve sirtüinlerin tümünde yüksek oranda benzerlik gösteren 260 aminoasitlik katalitik bir bölge bulunmaktadır (North ve Verdin, 2004).

Sirtüinler, protein deasetilaz enzimi aktivitelerinin dışında ADP-ribosil transferaz enzim aktivitesi de gösterebilmektedir (Dang, 2014). Sirtüinler, kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD^+) kullanırlar (Landry ve ark, 2000). Şekil 10'da gösterildiği gibi proteinlerin deasetilasyonu sırasında NAD^+ bir kofaktör olarak kullanılarak, proteinlerin lizin rezidüsündeki asetil grubu ADP-riboz grubuna aktarılır ve proteinler deasetile edilir. Bu reaksiyon sonucunda nikotinamid ve 2'-O-asetil-ADP-riboz salınımı gerçekleştirilir. Sirtüinlerden bazıları ise Şekil 11'da gösterildiği gibi ADP-ribozil grubunu lizinlere ekleyerek ADP-ribozil transferazlar olarak da işlev gösterirler ve bu aktivite sırasında da nikotinamid salınımı gözlenmektedir (Dang, 2014).



Şekil 10: Sirtuinlerin deasetilasyon aktivitesi. Dang (2014)'ten modifiye edilmiştir.



Şekil 11: Sirtuinlerin ADP-ribozil transferaz aktivitesi. Dang (2014)'ten modifiye edilmiştir.

2.10.2. Memeli Sirtüinleri

Memeli sirtüinleri, sınıf I ve II histon deasetilazlardan farklı olarak, yapısal protein, metabolik enzim, histon proteinleri ve histon olmayan proteinleri substrat olarak kullanırlar (Zhu ve ark, 2014). Memeli sirtüinlerinin hepsi için deasetilaz aktivitesi bildirilmemiş olmasına rağmen yedi tane memeli sirtüini (Sirt1-7) bulunmaktadır. Memeli sirtüinleri hücrede farklı yerlerde lokalize olurlar. Tablo 4'te yerleşimlerinin gösterildiği gibi bunlardan Sirt1'e yüksek oranda nükleusta rastlanılır, Sirt6 ve Sirt7 de nükleer sirtüinlerdir. Sirt2 sitoplazmada yer almasına rağmen bazen çekirdek ve sitoplazma arasında da yer alabilmektedir (José ve ark, 2012). Sirt3, Sirt4, Sirt5 ise mitokondriyal sirtüinlerdir (Michan ve Sinclair, 2007).

Tablo 4: Sirtüinlerin hücresel yerleşimi. Michan ve Sinclair(2007); José M ve ark (2012)'den modifiye edilmiştir.

Memeli Sirtüini	Hücresel Yerleşimi
Sirt1	Nükleus
Sirt2	Sitoplazma
Sirt3	Mitokondri
Sirt4	Mitokondri
Sirt5	Mitokondri
Sirt6	Nükleus
Sirt7	Nükleus

Sirtuinlerin enzimatik rollerinin açıklanmasından sonra, yaşam süresini uzatma kabiliyetlerinin, Kalori kısıtlaması (CR) ile benzerlik gösteren benzer yollara sahip olduğu farkedilmiştir. Fakat CR'de maya, sinek ve solucan sirtuinlerinin üstlendikleri roller tartışmalıdır. Bununla beraber, memelilerdeki sirtuinlerin MSS, pankreas, karaciğer, yağ dokusu ve iskelet kasında çeşitli fonksiyonları olduğu bildirilmiştir (Yalcin G, 2018).

Tablo 5: Memeli sirtüinlerinin hedef ve fonksiyonları. McGuinness ve ark (2011)'den modifiye edilmiştir.

Sirtüin	Enzimatik Aktivite	Substratlar/Hedefler	Fonksiyon
Sirt1	Deasetilaz	p53, FOXO, NF κ B, MyoD, Ku70, LXR, PPAR γ , p300, Tat, PCAF, ER α , AR, SMAD7, PCAF, p73, Sox9, HES1, PGC1 α , HEY2, NcoR /SMRT, E2F1, RelA /p65	Glukoz metabolizması, yağ asidi ve kolesterol metabolizması, farklılaşma, insülin sekresyonu ve nöroproteksiyon
Sirt2	Deasetilaz	α - tubulin, FOXO	Hücre döngüsü kontrolü, tubulin deasetilasyonu
Sirt3	Deasetilaz	AceCS2, GDH kompleksi I	ATP üretimi, mitokondriyal proteinlerin deasetilasyonu ve yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesi
Sirt4	ADP-Ribozil transferaz	GDH, IDE, ANT	İnsülin sekresyonu
Sirt5	Deasetilaz	CPS1	Üre döngüsü
Sirt6	Deasetilaz, ADP-Ribozil transferaz	NF- κ B, Hif1 α , helikaz, DNA polimeraz β	Telomerler ve telomerik fonksiyonlar, DNA onarımı
Sirt7	Deasetilaz	RNA polimeraz tip I, E1A, SMAD6	RNA polimeraz I transkripsiyonu

Tablo 5' te hedefleri ve fonksiyonları verilen sirtüinlerin etkileri aşağıda açıklanmaktadır.

Sirt1, Sirt2'nin en yakın memeli homologu olup üzerinde en fazla çalışma yapılan memeli sirtüinidir. Kalori kısıtlaması çalışmalarında beslenme durumuna bağlı olarak düzenlendiği bildirilmiştir (José ve ark, 2012). Sirt1 aşırı ekspresyonu P53 gibi tümör baskılayan genleri deasetile ederek, tümör oluşumunu destekler (McGuinness ve ark, 2011). P53'ün Sirt1 ile deasetile edilmesi sonucunda oksidatif stres ve DNA hasarı oluşumundan sonra devreye girmesi gereken apoptoz mekanizmasının çalışmasında azalma gözlenmektedir. Sirt1, PGC1 α 'yı deasetile ederek aktif hale getirir ve bu yolla mitokondri aktivasyonunu ve

biyogenezini düzenler. FOXO transkripsiyon faktörleri Sirt1 asetilasyonu ile düzenlenir ve bunun metabolizma ve strese verilen yanıtta seçici yönlendirmede görev aldığı düşünülmektedir. İnsülin sinyallemesinin inhibe olması durumunda, Sirt1 aktif olarak nükleustan sitoplazmaya geçmektedir. Aynı zamanda Sirt1'in kanserlerde ve apoptoz mekanizmalarında yer aldığına dair birçok çalışma bulunmaktadır. Sirt1'in belirlenen yeni işlevleri arasında, birçok nörodejeneratif hastalığa karşı nöroproteksiyon, karaciğerde rejenerasyon, kök hücrelerin farklılaşması, hücrenin kaderinin belirlenmesi gibi birçok biyolojik olayda rol aldığı belirlenmiştir (Dang, 2014). Sirt1, DNA-onarım faktörü olan Ku70'in ve Bax-aracılı apoptoz inhibitörünü etkisiz hale getirerek hücre sağkalımı üzerinde etki göstermektedir (Michan ve Sinclair, 2007).

Sirt2, tubulini deasetile eder ve iskelet kası farklılaşmasının düzenlenmesinde görevlidir. Yaşlanma sonucu MSS'de Sirt2'nin nöronlarda birikim gösterdiği bilinmektedir (Dang, 2014). Sirt2, Schwann hücre polaritesi ve miyelin düzeneğinin düzenleyicisi olan Par-3'ü deasetile eder ve bu düzenlemede önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Sirt2, Adipositlerde, FOXO1 ve PCG1 α 'yı deasetile ederek metabolizmayı düzenlemektedir (Dang, 2014). İnsan meme kanseri ve hepatosellüler karsinom dokularında Sirt2 seviyelerinde düşüş görülmektedir. Sirt2'nin, beyinde görülen ve glioma olarak adlandırılan tümörleri baskıladığı öne sürülmüştür. Sirt2 hücre döngüsüyle yakından ilişkilidir ve DNA hasarından sonra döngüyü düzenleyebilir (Michan ve Sinclair, 2007).

Sirt3, yağ asidi oksidasyonu yolağında, uzun zincirli asetil-CoA dehidrogenazın (LCAD) deasetile edilmesini sağlar. Sirt3, TCA döngüsünde yer alan enzimlerden, izositrat dehidrojenaz (IDH2) ve glutamat dehidrojenazın (GDH), deasetilasyonunu sağlar. Bununla birlikte Sirt3, oksidatif fosforilasyondaki elektron taşıma zincirinin her basamağında yer alan bileşenlerin etkisini kaybetmesine neden olur (Jing ve ark, 2011). Asetil-CoA üretimi için gerekli AceCS2, SIRT3 ile deasetilasyona uğrar. Ayrıca SIRT3, mitokondriyal antioksidan olan SOD2'yi deasetile eder ve aktivasyonu ile oksidatif strese karşı korumada rol oynar (Bell ve Guarente, 2011).

Sirt4, GDH'ı hedef alan ADP ribosilazdır, pankreastaki GDH'yi inhibe ederek glutamat metabolizmasının kontrolünde görev alır. Glutamatın beyinde yüksek oranda bulunan bir nörotransmitter olduğu düşünüldüğünde Sirt4'ün nöronal uyarılar ve eksitotoksiste sırasında gözlenen artan glutamat seviyesine cevap verebilmeyi düzenleyeceği düşünülebilir (Michan

ve Sinclair, 2007). Sirt4, karaciğer ve kasta bulunan hücrelerde yağ asidinin oksidasyonunu olumsuz bir şekilde düzenlemektedir (Laurent ve ark, 2013b).

Sirt5, proteinlerden malonil veya süksinil gruplarını çıkarmak için karbamoil fosfat sentetaz (CPS1) 'ı hedef alır (Dang, 2014).

Sirt6, genom stabilitesi ve telomer fonksiyonu koruması için histon H3K9 ve H3K56'yı deasetilasyona uğratır. Aynı zamanda Sirt6 oksidatif stres altında DNA onarımını desteklemek için PARP1 fonksiyonunu uyarmaktadır (Dang, 2014). Sirt6, DNA tamirinde ve oksidatif strese cevapta genomik stabilitenin korunmasında önemli bir rol oynar (José ve ark, 2012).

Sirt7 aktif halde bulunan rRNA genleri ile ilgilidir, transkripsiyonu düzenler ve RNA polimeraz I ve II 'ye bağlı transkripsiyonel işlemlerde çeşitli faktörlerle etkileşime girer (José ve ark, 2012).

2.10.3. Sirt4

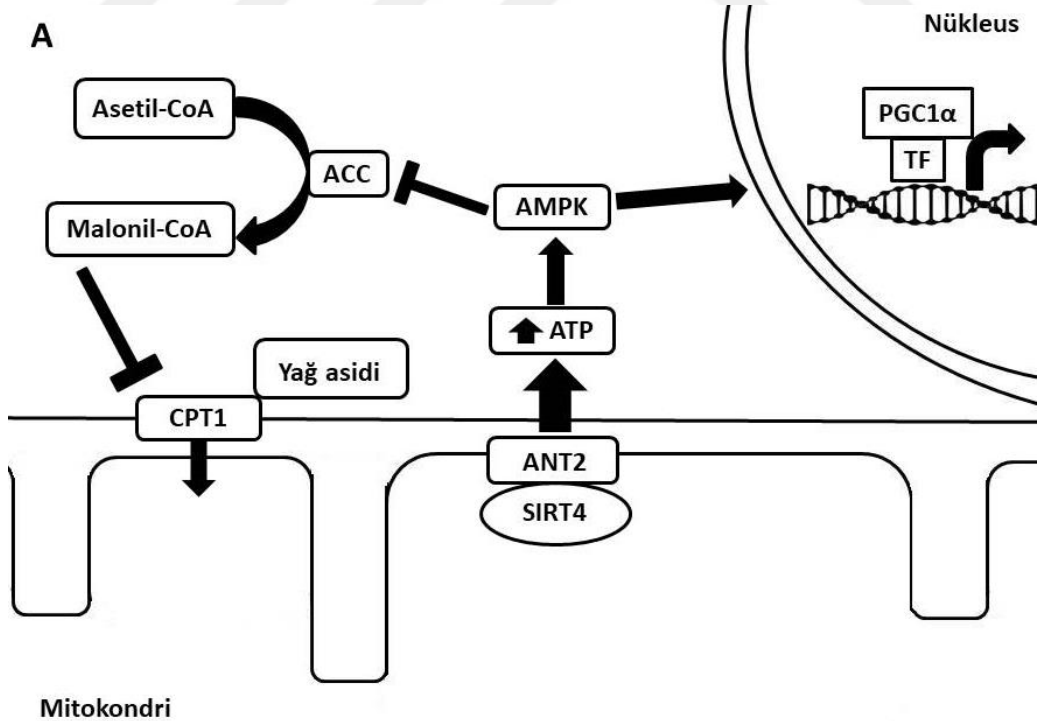
Sirt4, deasetilaz ve ADP-ribosilaz etkinliği gösteren ve mitokondride yerleşik halde bulunan memelilere ait bir sirtüindir (Fernandez-Marcos ve Serrano, 2013). Sirt4'ün ADP-ribosilaz aktivitesi ile insülin sekresyonunun düzenlenmesinde yer aldığı ve GDH'ı aracı olarak kullanarak glutamin metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir (Ho ve ark, 2013). Sirt4 ekspresyonu insülin üretimi gerçekleştiren β hücrelerinin dışında, böbrek, karaciğer, çizgili kas, testis ve vasküler düz kas hücrelerinin de içinde bulunduğu birçok hücre tipinde görülmektedir (Zhu ve ark, 2014). Sirt4, diğer dokulara kıyasla beyin ve karaciğerde yüksek ekspresyon seviyesi göstermektedir (Haigis ve ark, 2006).

Lipit homeostazında malonil-CoA dekarboksilaz (MCD), malonil-CoA'yı asetil-CoA'ya çevirirken, asetil-CoA karboksilaz (ACC) tam tersi işlev gösterir ve bu enzimler birlikte malonil-CoA seviyesini düzenlemektedir. Malonil-CoA seviyesi ve organizmanın beslenme durumu sıkı bağlantılıdır. Beslenme bolluğunda malonil-CoA düzeyi artış gösterir, yağ sentezi arttırılırken yağ oksidasyonu azaltılır. Açlık durumunda ise malonil-CoA seviyesi düşer ve mitokondriye taşınan yağ asitleri β -oksidasyona uğratılır. Sirt4 gen ifadesi, beslenme

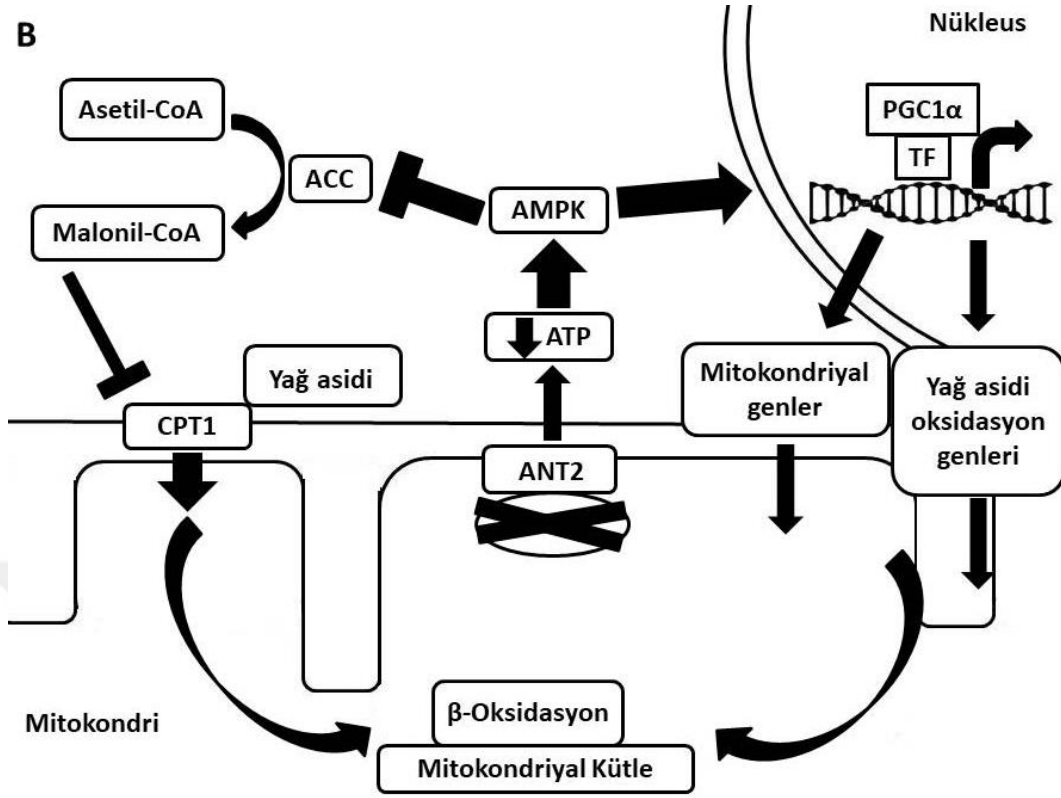
bolluğunda MCD'yi baskılar ve bu yolla lipid homeostazını düzenler. Sirt4, nakavt farelerde lipid metabolizmasında yağ asidi oksidasyonunun artması ile egzersiz gibi enerji gerektiren mücadelelerde %20 daha fazla çalışma süresi kaydedildiği bildirilmiş olup, bu farelerde yüksek yağ içeren diyetlerde yağ oksidasyonu obeziteye karşı koruma sağladığı çalışmalarla desteklenmiştir (Laurent ve ark, 2013b).

Sirt4 ile hepatositlerde yağ oksidasyonunu düzenleyen PPAR α arasında sinyal bağlantısı olduğu, Sirt4 ekspresyonunun PPAR α aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir (Laurent ve ark, 2013a).

Sirt4, hücrede ATP seviyesini düzenler, hücrede Sirt4 ekspresyon seviyesi ile ATP seviyesi korelasyon gösterirken solunum ile negatif korelasyon göstermektedir. Mitokondride enerji homeostazında ANT'ler, ADP ve ATP'nin zıt yönlü taşınmasını sağlarlar ve asilasyon sonrasında mitokondri zarını ayırırlar. Sirt4, ANT2'yi deasetile ettiği zaman mitokondri zarları birleştirilir, oksidatif fosforilasyon verimi azalır ve mitokondriyal solunum sistemi düzenlenir (Ho ve ark, 2013).



Şekil 12: Sirt4 varlığında mitokondri ve nükleus arasındaki sinyalleşme. Ho ve ark (2013)'ten modifiye edilmiştir.



Şekil 13: Sirt4 yokluğunda mitokondri ve nükleus arasındaki sinyalleşme. Ho ve ark (2013)'ten modifiye edilmiştir.

Şekil 12’de gösterildiği gibi Sirt4-ANT2 etkileşimi, mitokondriden nükleusa uzanan bir sinyalleşme ile enerji dengesini düzenler ve hücrede ATP dengesinin sağlanması için gereklidir. Hücresel enerji sensörü görevi üstlenen AMPK, AMP ile aktive edilir ve yağ asidi oksidasyonunun artması için AMPK’nın fosforilasyonla aktive olması gerekir. AMPK’nın görevi, ACC’nin fosforile olmasını sağlayarak malonil-CoA düzeyinin düşmesine neden olmaktadır (Ho ve ark, 2013). β -oksidasyonu için, yağ asitlerinin iç ve dış mitokondriyal membranlardan geçmesi gerekir ve bu tepkime, malonil-CoA ile inhibe edilen karnitin palmitoiltransferaz 1 (CPT1) enzimi ile katalize edilir (Laurent ve ark, 2013b). Sirt4 ekspresyonuna bağlı ATP artışı, AMPK fosforillenmesini azaltarak AMPK aktivitesini düşürür, ACC ve PGC1 α işlevlerini sinyalleşme yoluyla düzenler.

Sirt4 eksikliğinde, Şekil 13’te gösterildiği gibi ANT2’ye bağlı ayrılma sonucunda, hücre içerisinde ATP düşüşü görülür ve bunu takiben AMPK aktive edilir. AMPK aktivasyonu, sitozolde malonil-CoA seviyesini azaltır ve mitokondriyal yağ asidi alımını arttıran ACC’nin

fosforile olmasına neden olur. Sirt4 yokluğunda AMPK aktivasyonu, PGC1 α 'nın ifadesini ve β -oksidasyon ve mitokondriyal biyogeneze yer alan genlerin ifadesini arttırır. Böylelikle bu feedback döngüsü, açlığa karşı verilen yanıtta yağ asidi oksidasyon genlerinin transkripsiyonunun aktivasyonunda bir gen olan PGC1 α 'yı da düzenlemektedir.

Sirt4 ekspresyonu ile ERR α , CPT1b ve MCAD gibi yağ asidi oksidasyon genlerinin ekspresyon seviyelerinin ve nükleusta kodlanan PGC1 α , ERR α , TFAM, NRF1 ve Cyt.C gibi transkripsiyonu ile mitokondriyal kütleyi düzenleyen genlerin mRNA seviyelerinin zıt seyrettiği bildirilmiştir. Böylece Sirt4'ün, ANT2-AMPK-PGC1 α aracılığıyla mitokondriyal biyogeneze genlerini de kontrol ettiği bildirilmiştir (Ho ve ark, 2013).

DNA hasarı tepki mekanizması (DDR), DNA hasarı sonucunda genomik bütünlüğün sağlanması için ortaya çıkar. Bilinmeyen bir şekilde DDR mitokondride Sirt4 transkripsiyonunu meydana getirir. Sirt4, GDH'ı inhibe eder ve glutaminin α -ketoglutarata dönüştürülmesini durdurur. α -ketoglutarat azalışı, TCA (Trikarboksilik asit) döngüsünün anaplerotik desteğini durdurur ve anapleroz durmasının DNA tamiri ile sonuçlandığı bildirilmiştir. DNA hasarı sonrasında Sirt4'ün hücrede mRNA seviyesinin bu konuda üzerine daha fazla çalışma yapılmış olan Sirt1 ve Sirt3'e kıyasla daha fazla arttığı gösterilmiştir. DNA hasarı sonrasında Sirt4 yokluğunda, hücre döngüsü devam ettiğinde DNA onarımının geciktiği ve kromozomal anaploidiler oluştuğu bildirilmiştir (Fernandez-Marcos ve Serrano, 2013).

Glutamin metabolizması memeli hücrelerinde hücre bölünmesinde protein ve nükleotidler için azot kaynağı oluşturmak, mitokondriyal anaplerozun gerçekleşmesine neden olmak gibi birçok yolakta etkilidir. Glutamin, glutamat dehidrojenaz veya aminotransferazların yardımıyla TCA döngüsü ara maddesi α -ketoglutarata dönüştürülebilir. Bu dönüşüm, TCA döngüsüne karbon sağlar ve hücrelerde amonyanın büyük bir kısmı bu metabolizma sonucunda oluşturulur (Jeong ve ark, 2013).

Glikoz yokluğunda hücre yaşamının sürdürülebilmesi için mitokondride glutaminin yıkılması, TCA döngüsünü devam ettirmektedir. Kanser hücreleri için glikoz yokluğunda glutamin enerji kaynağı için alternatiftir. Bu nedenle, glutamin metabolizması tümör hücrelerinde kritik bir öneme sahiptir. Sirt4 ekspresyonu glutamin metabolizmasını ve tümör hücrelerinin proliferasyonu baskılanmaktadır (Jeong ve ark, 2013). Sirt4 aracılığı ile

gerçekleşen glutamin anapleroz inhibisyonunun tümör gelişimini baskıladığı, Sirt4 eksikliği olan farelerde akciğer tümörü insidansında artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Fernandez-Marcos ve Serrano, 2013). Hücre modellerinde yapılan çalışmalar dışında in-vivo çalışmalarda mide, mesane, meme, lösemi, küçük hücreli akciğer kanseri gibi kanser çeşitlerinin ortak noktasında Sirt4 mRNA seviyelerinde azalma görülmesi, Sirt4'ün insan kanserlerinde de tümör baskılayıcı rolünün olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca, Sirt4 kaybı, yaşam boyu tümör insidansında artış görülmesine neden olmaktadır (Jeong ve ark, 2013).

2.11. N2A Hücre Hattı ve Nöroblastomanın Tanımlanması

Public Health England internet sayfası 2019 verilerine göre, N2A hücre hattı Neuro 2a olarak adlandırılır, bir albino soy A faresinde spontan bir tümörden türetilmiştir. Bu hücre hattındaki hücreler, sinir hücrelerinde aksoplazmik akış sağlayan kasılma sisteminde bir rol oynadığına inanılan mikrotübüler bir protein üretir ve fare sinir dokusundan üretilmiştir. N2A hücre hattı beyin hastalıkları için hücre modeli olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır.

Nöroblastoma, fetal dönemde ya da doğum sonrasında ortaya çıkan sempatik sinir sisteminin embriyonik bir tümörüdür. Çocukluk döneminde en çok rastlanan ekstrakranial malignite ve bebeklerde ise en çok gözlenen malign tümördür ve 15 yaşından küçük hastalarda rastlanan malignitenin neredeyse %8'ini temsil etmektedir. Genelde sporadik olarak ortaya çıkar. Tümörlerin görüldükleri yerler sıklıklarına göre, adrenal bez, retroperitondaki paraspinal gangliyonlar, mediasten, boyun ve pelvis şeklinde sıralanabilir (Davidoff, 2012; Kembhavi ve ark, 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Çalışmada ,sıvı azot tankı (-196 °C), sıcak su banyosu (Memmert), inkübatör (Nuaire), buz cihazı (Uğur buzaL60), santrifüj (Hettich zentrifugen), -80°C buz dolabı (Nuaire), hücre sayım cihazı (İnvitrogen countessTM), ısı bloğu (Lab companion), invert mikroskop (Olympos CK40), ultra saf su cihazı (Millipore), spektrofotometre (Thermo fisher scientific), çalkalamalı inkübatör, masa üstü santrifüj (Hettich zentrifugen mikkro20), soğutmalı santrifüj (eppendorf centrifuge 5415 R), vorteks (İsolab), nanodrop (Thermo Fisher Scientific), hücre kültür kabini (Logic⁺ purifier,biosafety cabinet), distile su cihazı (Nüve), çalkalayıcı (IKA[®] KS 130), hassas terazi (Scaltec SBC31), pH metre (Mettler toledo), otoklav (Hirayama), western blot seti (yürütme, transfer tankı, güç kaynağı, Biorad), UV görüntileme cihazı (G:BOX SYNGENE), lüminometre (Thermo fisher scientific)kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

N2A hücre hattı (ECACC), MEM with Earle's Salts with L-Glutamine (MEM, 500 ml, Capricorn), Fetal Bovine Serum (FBS, 500 ml, Capricorn), L-Glutamine Solition (200 mM, 100 ml, Capricorn), Penisilin/Streptomisin (100x, 100 ml, Capricorn), Sodyum pirüvat (Capricorn), 50 ml'lik steril falkon (Axygen), Tek kullanımlık steril pipet (10 ml, Costar), Tek kullanımlık steril pipet (5 ml, Biologix), 10 cm²'lik petri kabı (SPL Life Sciences), Etanol (Merck Millipore Emsure), Pastör pipeti (VWR), Dulbecco's PBS (1x, Capricorn), Tripsin-EDTA (% 0,05, Capricorn), Dimetil Sülfoksit (DMSO, Merck), 15 ml'lik falkon (Axygen), 6 well plate (Biologix), Dondurma tüpü (İsolab), Enjektör filtresi (İsolab), 10 ml şırınga (BD-Luer-LokTM Tip), Mikro santrifüj tüpü (Tarsons), Hücre sayım slaytı (CountessTM), Tripan mavisı (İnvitrogen), Kainik asit (Sigma), MTT testi kiti (Biotum), 96 well plate (Biologix), Kanamisin (Santa Cruz Biotechnology), Sirt4 plazmidi (Origene), Plazmit DNA izolasyon kiti (WizBio-WizPrepTM), RNase içermeyen su (GeneAll),

Lipofektamin (İnvitrogen), RIPA Lizis Tamponu (VWR), Proteaz ve fosfataz inhibitörü (1 ml, 100x, MedChem Express), 1 ml'lik steril enjektör (Beybi), Protein Quantitation Kit (Bradford testi, Abcam), Tris Hidrokrolid (Sigma), Sodyum Klorür (Merck Millipore Emsure), Tween 20 (Sigma), Tris Base (Tris(hidroksimetil)aminometan) (1000g, Nzytech), Glisin (1000g, Nzytech), Metanol (LiChrosolv® Merck Millipore), SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (BioShop), Yağsız süt tozu (Pmar), β -Merkaptoetanol (250 ml, Merck Millipore), Tris (Sigma), Ponceau S (Sigma), SDS-Page for Loading Dye (5x-1ml, Nzytech), SDS-Page jeli (Biorad), Whatman Kağıdı (Filtre kağıdı, Whatman®), Membran (Whatman®), Marker (SeeBlue® Plus2-Stained Protein Standart), Yeast extract (Sigma), Tripton (Tryptone, ChemCruz), Glutamat Assay (Promega), Sirt4 antikoru (Elabscience), Tubulin antikoru (Elabscience), Anti-Rabbit IgG-HRP 2.Antikor (Elabscience), ECL (Novex® Chemiluminescent Substrat - İnvitrogen)

3.1.3. Deney Düzenekinin Hazırlanması

Yapılan çalışmada hücresel modellendirme için N2A hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerde kainik asit muamelesi yapıldı ve eksitotoksisitenin etkisinin ölçülmesi için MTT hücre canlılık testi uygulandı. Hücre sağkalımında anlamlı bir düşüş gördüğümüz konsantrasyon çalışma konsantrasyonu olarak seçildi. N2A hücrelerinde transfeksiyon yöntemiyle Sirt4 ifadesinin arttırılması sağlandı. Daha sonra Sirt4 proteinin miktarı western blot ile kontrol edilerek Sirt4 ifade artışı doğrulandı.

1. Kontrol N2A hücresi: C
2. Kainik asit ile muamele edilmiş N2A hücresi: C+KA
3. Sirt4 ifadesi transfeksiyon ile arttırılmış N2A hücresi: T
4. Sirt4 ifadesi transfeksiyon ile arttırılmış ve kainik asit ile muamele edilmiş N2A hücresi: T+KA

Bu dört grup deney hücresinde Sirt4 protein ifadesi artışının, kainik asitin yol açtığı eksitotoksisite sonucu oluşan hücre ölümüne olan etkisini araştırmak için MTT yapıldı. Ayrıca bu dört grup hücrede, eksitotoksisite oluşumunu gözlemlemek ve besiyerindeki glutamat miktarını ölçmek amacıyla glutamat assay yapıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

3.2.1.1. Besiyeri Hazırlama

Kullanılacak olan N2A hücre hattına uygun tamamlanmış (complete) MEM besiyeri %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 penisilin/streptomisin, %1 sodyum piruvat ve 15 ml L-glutamin içermektedir. Buna tarife uygun olacak şekilde hücre kültürü ortamında, 500 ml olarak temin edilen MEM besiyerinin içerisinde 75 ml besiyeri çıkarıldı, kalan 425 ml MEM besiyeri üzerine 50 ml FBS, 5 ml penisilin/streptomisin, 5 ml sodyum piruvat ve 15 ml L-glutamin eklendi ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

3.2.1.2. Hücre Çözme

ECACC'den temin edilen N2A hücre hattının bu basamakta sıvı azottan çıkarılarak, yapılacak olan çalışmalar için kültür ortamı ve prosedürlerine uygun bir biçimde çözülmesi amaçlanmıştır.

N2A hücre hattı çözme basamağından önce sıcak su banyosu 37 °C'ye getirildi. Bu hücre hattına uygun olarak hazırlanan tamamlanmış MEM besiyeri sıcak su banyosunda 10-15 dakika kadar ısıtıldı. Sıvı azot tankı (-196 °C) içerisinde 1 ml'lik dondurma tüplerinde muhafaza edilen hücreler çıkarıldı ve sterilizasyona dikkat edilerek 37 °C olan sıcak su banyosunda eritildi. Kültür kabının içerisine çözülecek olan hücre sayısı kadar 10 cm²'lik petri kabı çıkarıldı. Petri kablarının içlerine 9 ml tamamlanmış MEM besiyeri, besiyerinin üzerine ise 1 ml hacminde olan çözülmüş hücre hattı eklendi. Çözdürülen hücrenin petriye eşit şekilde dağıtılması sağlandı ve dağılımları invert mikroskopta kontrol edildi. Hücreler petri kabına tutunabilmeleri ve konfluent hale gelebilmeleri için 37 °C olan ve %5 CO₂ oranını sağlayan inkübatöre 24 saatlik bir süre için kaldırıldı. Bu süre sonunda daima, hücrelerin ilk kontrollerinde dondurma besiyeri içerisinde yer alan DMSO (Dimetil sülfoksit)'dan arındırılması için tüm besiyeri çekilerek hücreler PBS (Fosfat tamponlu salin) ile yıkandı, üzerlerine 10 ml taze besiyeri eklendi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. Hücreler mikroskopta

kontrol edildiklerinde eğer petri yüzeyinde %70-80 arasında doluluk gösteriyorlarsa 10 cm²'lik petri kablarına pasajlandı.

3.2.1.3. Hücre Besiyerlerinin Değiştirilmesi

Hücreler mikroskopta incelendiğinde tam konfluent halde değilse besiyeri değişimi yapıldı. Besiyeri değişimi yapılırken eski besiyerinin tamamı çekilerek uzaklaştırıldı, yerine önceden 37 °C'lık sıcak su banyosunda ısıtılmış olan 10 ml tamamlanmış MEM besiyeri hücrelerin kalkmamasına dikkat edilerek bırakıldı ve hücreler besiyeri değişiminden sonra tekrar inkübatöre kaldırıldı.

3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre çözme işleminden sonra, her gün mikroskop altında hücreler morfolojileri, sayıları açısından kontrol edildi ve besiyerini çabuk tükettiklerinden her gün besiyeri değişimi yapıldı. Hücreler petri kabındaki yoğunluklarına göre 2-3 günde bir pasajlandı. Hücrelerin yoğunluğu %70-80 oranına geldiğinde pasajlama için steril PBS ve tamamlanmış MEM besiyeri 37 °C olan sıcak su banyosunda ısıtıldı. Pasajlanacak hücrelerin petrileri inkübatörden çıkarılarak kabin içerisine alındı. Hücrelerin üzerinde bulunan eski besiyeri çekilerek uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin-EDTA etkinliğinin azalmasına engel olmak için 5 ml PBS ile yıkandı. PBS de hücreler üzerinden çekilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 1 ml %0.05'lik tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler 2-3 dakikalık bir süre için tekrar inkübatöre kaldırıldı. Tripsin uygulaması ile hücrelerin birbirleriyle ve yüzeyle olan bağlantısı koparıldı ve bu durum mikroskopta kontrol edildi. Yeni iki adet 10 cm²'lik petri kabı kabin içerisine alındı ve içlerine 5'er ml taze tamamlanmış MEM besiyeri eklendi. Hücreler ile birlikte 1 ml tripsin-EDTA bulunan petrinin üzerine 9 ml taze tamamlanmış MEM besiyeri eklendi ve hücreler pipetaj yapılarak toplandı. Pipetaj sonrasında 9 ml besiyeri ve 1 ml tripsin-EDTA bulunan karışım içlerinde 5'er ml tamamlanmış MEM besiyeri bulunan yeni petrilere eşit şekilde paylaştırıldı. Bu işlem sonunda hücreler yeniden inkübatöre kaldırıldı.

3.2.1.5. Dondurma Besiyerinin Hazırlanması

Dondurma besiyeri her hücre dondurma işleminin öncesinde taze olarak hazırlandı. Dondurulacak her bir petri için 1 ml dondurma besiyeri kullanıldı ve dondurulacak petri sayısına göre kullanım öncesinde filtreden geçirileceği sırada kayıp olacağı düşünülerek biraz fazla hazırlandı. Bu besiyerinin %20'si FBS (Fetal Sığır Serum), %10'u DMSO ve %70'i içerisinde FBS, penisilin/streptomisin, L-glutamin ve sodyum pürivat bulunmayan MEM besiyerinden oluşacak şekilde hazırlandı. Besiyeri hazırlandıktan sonra filtreden geçirildi, buz üzerinde kullanım aşamasına kadar bekletildi

3.2.1.6. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler pasajlama sürecinde iken bir kısmı sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere mümkün olduğunca düşük pasaj numaralarında, genetik değişikliğe uğramalarına izin verilmeden dondurularak saklandı.

Hücrelerin dondurulması basamağında öncelikle yukarıda anlatıldığı gibi dondurma besiyeri hazırlandı ve kullanım aşamasına kadar buz üzerine bırakıldı. Dondurulacak olan petrillerdeki hücreler, inkübatörden çıkarılarak mikroskopta canlılık ve yoğunluk açısından incelendi. Daha sonra petrilere kültür kabini içerisine alındı ve üzerlerindeki besiyerinin tamamı çekilerek uzaklaştırıldı. Petriye 5 ml PBS, eklendi. Hücrelerin PBS ile yıkanması ve besiyerinden tamamen kurtulması sağlandıktan sonra, PBS'in tamamı çekilerek uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA solüsyonundan her petriye 1 ml eklendi ve petrilere 2-3 dakika için inkübatörde bekletildi, ardından hücreler mikroskopta kontrol edildi. İçinde 1 ml tripsin-EDTA bulunan petrilere hücreler 7-8 ml besiyeri ile toplandı ve 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkondaki hücreler 4 °C/1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atıldı, pellet kısmı ise 2 dakika kadar buz üzerinde bekletildi. Hazırlanan dondurma besiyeri, pellet üzerine eklendi ve pelletin dondurma besiyerinde homojen olarak dağılması için pipetaj yapıldı. Sonraki aşamada bu hücreler, muhafaza edilecekleri kadar dondurma tüpüne 1 ml hacim içerecek şekilde aktarıldı ve buz içerisine bırakıldı. Buzdan alınan hücreler -20 °C'de 20 dakika, -80 °C'de 3-4 saat ve -196 °C'de kullanılabilecek kadar olacak şekilde kademeli bir sıcaklık kaybına maruz bırakıldı.

3.2.1.7. Hücrelerin Sayılması ve Hücre Canlılığı

Pasajlama esnasında toplanan hücrelerden, hücre kültüründe kullanılmak üzere steril hale getirilmiş olan ependorf tüp içine 50 µl alındı ve üzerine aynı miktarda tripan mavisi boyası eklenerek pipetaj ile karıştırıldı. (Hücre sayım cihazının prosedürüne uygun olacak şekilde 1:1 dilüsyon sağlandı.) Hazırlanan karışımdan 10 µl alınarak hücre sayım cihazına uygun olan lamdaki kuyucuğa yüklendi. Cihaz aracılığıyla 1 ml’de tripan mavisi boyayı alan (ölü), almayan (yaşayan) ve toplam hücre sayısı hesaplandı. Sayım üç kez tekrarlanarak bu tekrarların ortalaması referans alındı.

3.2.1.8. Kainik Asitin Konsantre Edilmesi ve Uygulama İçin Kullanılacak Dozların Hazırlanışı

Kainik asit, toz kristal formda temin edilen toksik bir ajandır. Satın alınan firmadan 25 mg hacminde ve hücre kültüründe kullanıma uygun biçimde temin edildi. Deney modellemesine uygun mol ve molariteler hesaplandıktan sonra 25 mg kainik asit 2 ml ultra saf suda çözülerek ana stok 58,62 mM olarak hazırlandı. Ana stoktan 10 mM ve 500 µM’lik ara stoklar MTT Assay’de kullanılmak için kültür ortamında hazırlandı. 10 mM’lık ara stoğun hazırlanması için ana stoktan 170,6 µl kainik asit alındı ve 829,4 µl ultra saf su ile pipetaj yapılarak homojen bir şekilde ependorf tüpte hazırlandı. 500 µM ara stoğun hazırlanması için ana stoktan 8,6 µl kainik asit alındı ve 991,4 µl ultra saf su ile ependorf tüpte pipetaj yapılarak homojen biçimde hazırlandı.

3.2.1.9. MTT (Metiltiazol difenil tetrazolyum) Assay Testi ve Testte Uygulanacak Kainik Asit Dozlarının Belirlenmesi

MTT testi hücrelerin mitokondriyal aktivitesine dayanan canlılık testi olarak da bilinir. MTT solüsyonunda bulunan tetrazolyum tuzları mitokondriyal aktivitenin gerçekleşmesini sağlayan dehidrojenez enzimi ile formazana dönüştürülerek mor renk vermektedir. Bu test, çalışmada kainik asite maruz kalmayan ve farklı dozlarda kainik asite maruz kalan hücrelerde canlılığın kıyaslanması için kullanıldı.

10 cm²'lik petrilere yetiştirilen N2A hücrelerinin %70-80 yoğunluğa erişmesi için beklenildi. Gerekli yoğunluğa ulaşan hücreler üzerinden tüm besiyeri çekilerek uzaklaştırıldı ve 5 ml PBS ile hücreler yıkandı. PBS çekilerek uzaklaştırıldı ve petri kabındaki hücrelere 1 ml tripsin-EDTA uygulanarak 2-3 dakika boyunca hücreler inkübatörde bekletildi. Durumları mikroskopta kontrol edildi. Petri kabında bulunan hücreler ve 1 ml tripsin-EDTA, 19 ml tamamlanmış MEM besiyeri ile toplamda 20 ml olacak şekilde bir falkon tüpte toplandı. Hücrelerin eşit bir şekilde dağılmasını sağlamak için yavaşça pipetaj yapıldı. Hazırlanan hücre solüsyonundan 50 µl bir ependorf tüp içerisine alındı ve üzerine 50 µl tripan mavisi boyası eklendi ve pipetaj yardımıyla karıştırıldı. (Hücre sayım cihazının prosedürüne uygun 1:1 seyreltme uygulandı.) Karışımdan 10 µl alınarak hücre sayım cihazının lamına yüklendi ve 3 kere hücre sayımı yapıldı. Bu sayımların ortalaması alındı ve cihaz 1 ml'deki hücre canlılığını ölçtüğünden 1 µl'deki değer hesaplandı. 96 well plate'e kuyucuk başına 5000 hücre ekmek istediğimiz için [5000/1 µl'deki değer] formülüyle hücre solüsyonundan alınması gereken değer hesaplandı. Hücre solüsyonundan alınması gereken miktar 100 µl'den çıkarılarak elde edilen miktarda tamamlanmış MEM besiyeri gerekli kuyucuklara koyuldu, üzerlerine hücre solüsyonundan alınması gereken miktar eklenerek hücre ekim aşaması tamamlandı. Hücreler 96 well plate'e ekildikten sonra mikroskopta kontrol edildi ve plate yüzeyine tutunmaları için 24 saatliğine inkübatöre kaldırıldı. 24 saat sonundaki canlılık ve yoğunluk kontrollerinden geçtikten sonra üzerlerindeki tüm besiyeri çekildi. Testte hücrelere uygulanacak olan kainik asit konsantrasyonları sırasıyla 10,50,200,1000 µM olarak seçildi. Kainik asitten her welle ne kadar uygulanacağı hesaplandı ve bu hacim 100 µl'den çıkarılınca geri kalan hacimde complete taze besiyeri, kainik asit uygulanacak kuyucuklara eklendi.

Bu konsantrasyonlar için kullanılacak kainik asit ana stoğu ve stoktan alınması gereken miktar aşağıdaki denklemle hesaplandı.

$$\frac{(\text{Uygulanmak istenen kainik asit konsantrasyonu}) \times (\text{Kuyucuk başı hacim})}{(\text{Kullanılan ana stok konsantrasyonu})}$$

10 µM'lık uygulama için = [(10 µM x 100 µl)/500 µM] = 2 µl, 500 µM'lık ana stoktan 2 µl kainik asit 98 µl complete besiyeri ile uygulandı.

50 µM'lık uygulama için = [(50 µM x 100 µl)/ 10000 µM (10 mM)] = 0,5 µl, 10 mM'lık ana stoktan 0,5 µl kainik asit 99,5 µl complete besiyeri ile birlikte uygulandı.

200 µM'lık uygulama için = [(200 µM x 100 µl)/ 10000 µM (10 mM)] = 2 µl, 10 mM'lık ana stoktan 2 µl kainik asit 98 µl complete besiyeri ile birlikte uygulandı.

1000 μM 'lık uygulama için = $[(1000 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{l}) / 10000 \mu\text{M} (10 \text{ mM})] = 10 \mu\text{l}$, 10 mM'lık ana stoktan 10 μl kainik asit 90 μl tamamlanmış besiyeri ile birlikte uygulandı.

Kainik asit hesaplanan ve planlanan şekilde gerekli kuyucuklara eklendi ve hafif pipetaj ile eşit dağılması sağlandı. Kontrol hücrelerinde ise uygulanacak kainik asit miktarı kadar saf su kullanıldı. Kainik asit muamelesinden sonra hücreler 24 saat için inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında MTT solüsyonundan 5 μl hücrelere eklenerek hücreler 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. Süre dolduktan sonra kuyucukların dibinde oluşan formazan tuzlarının dağılmamasına dikkat edilerek besiyerleri çekildi. Her kuyucuk üzerine 200 μl DMSO eklendi ve hafif bir şekilde pipetaj yapıldı. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda, referans olarak 630 nm dalga boyu alınarak ölçüm yapıldı. Ölçüm sonrasında kontrol ve belirli dozlarda kainik asit uygulanmış olan gruplar için veri grafiği çizildi. 1000 μM kainik asit dozunda hücre canlılığının azaldığı kuyucuklarda stres ve eksitotoksosite seviyesinin arttığı düşünüldüğünden diğer deneylerde de bu doz referans olarak kullanıldı.

3.2.2. LB Besiyerinin Hazırlanması, Sirt4 Bakteri Plazmidinin Ekilmesi ve Dondurulması

LB besiyeri hazırlamak için; 5 gram NaCl, 2.5 gram maya ekstrakstı (yeast extract), 5 gram tripton tartıldı. 500 ml dH_2O içerisinde çözüldü ve pH NaOH çözeltisi ile 7.5 olarak ayarlandı. Hazırlanan besiyeri şişe ile birlikte otoklavlandıktan sonra buzdolabında 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

40 ml LB besiyerine 40 μl kanamisin ve 10 μl Sirt4 bakteri plazmidi ekledi. Bu karışım falkonlara bölündü ve falkonların kapakları tam olarak kapalı olmayacak şekilde bir gece boyunca 37 $^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış olan çalkalamalı inkübatörde bakteri büyümesi ve çoğalması için bırakıldı. İkinci ekimde 12 ml LB besiyerine 12 μl kanamisin ve 20 μl Sirt4 plazmidi eklendi.

Falkonlarda bulunan LB besiyerinin bulanıklığı bakteri çoğalmasının takibi için kontrol edildi ve besiyerinde büyüyen bakteriler birkaç ependorf tüpe bölündü. Tüpler 5 dakika boyunca en yüksek rpm'de santrifüjlendi, santrifüj sonrasında süpernatant kısımları atıldı.

Pelletler üzerine tekrar eşit miktarlarda bakterili besiyeri eklenerek, bir önceki işlem tekrarlanarak bakterili besiyerinin tamamı tüketildi ve böylece pelletlerin miktarı arttırıldı. Elde edilen pelletler plazmid izolasyonu yapılmaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

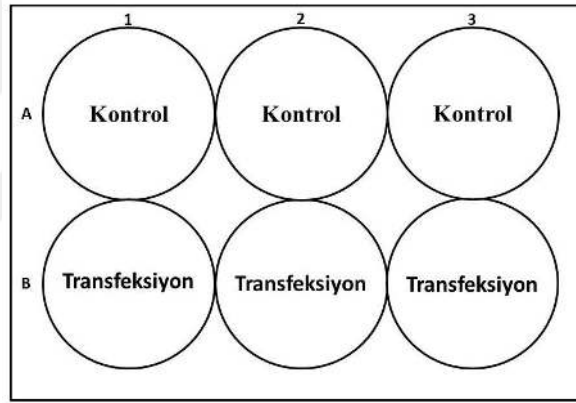
3.2.3. Sirt4 Plazmid İzolasyonu

Bu basamakta bakteri pelletlerinde bulunan Sirt4 plazmidinin izole edilmesi ve bu plazmidin sonraki basamaklarda kullanıma uygun hale getirilmesi hedeflendi. Plazmid izolasyonu için Wiz PrepTM DNA mini kiti kullanıldı.

Kiti ilk defa kullandığımızda kitin içinde yer alan wash buffera 64 ml %100 etanol sadece bir kere olmak üzere eklendi. RNase toz halinde geldiği için ilk kullanımda içine RNase free su eklendi ve iyice çözümleri sağlandı. PDI buffera hazırlanan RNase eklendi ve bundan sonraki bütün kullanımlar için 4 °C’ye kaldırıldı. Ependorf tüplerde -80 °C’de muhafaza edilen bakteri pelletlerin üzerine 200’er µl PD1 buffer eklendi ve tüpler vortekslendi. Bu aşama da pelletler yeniden süspanse hale getirilmiş oldu. Lizis basamağı için ependorf tüplere 200 µl PD2 buffer eklendi ve genomik DNA’nın parçalanmaması için vorteks yapılmadı, 10 kez alt üst edilerek kibarca karıştırıldı. Bu işlem sonrasında tüpler 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Nötralizasyon basamağı için tüplerin içerisine 300 µl PD3 buffer eklendi ve 10 kere alt üst edilerek karıştırılmaları sağlandı, sonrasında tüpler 13000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Bağlanma basamağının sağlanması için ependorf tüp sayısı kadar, kit içerisindeki kolonlardan çıkarıldı ve altlarına toplama tüpleri yerleştirildi. Santrifüj sonrasında elde edilen supernantlar kolona aktarıldı ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüplerine gelenler atıldı. Yıkama basamağı için kolonlara 600’er µl wash buffer eklendi ve 13000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj edildi ve toplama tüplerine gelenler yeniden atıldı. Kolonların kurutulması için kolonlar boş biçimde 2 dakika boyunca 13000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolonların tam ortalarına, fazla dokunmamaya dikkat ederek 30 µl elüsyon buffer eklendi ve 10 dakika beklenildi. Bekleme süresi sona erdikten sonra 1 dakika boyunca 13000 rpm’de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki miktar yeni ependorflara alınarak -20 °C’de muhafaza edildi. Elde edilen Sirt4 plazmidi nanodropta 772,6 ng/µl olarak ölçüldü.

3.2.4. N2A Hücrelerinin Sirt4 Plazmidi ile Tranfeksiyonu

10 cm²'lik petri kaplarında yetiştirilen N2A hücreleri %70-80'lik yoğunluğa ulaştıklarında petride bulunan hücreler üzerinden besiyerinin tamamı çekilerek uzaklaştırıldı. Hücreler 5 ml PBS ile yıkandı ve PBS de hücreler üzerinden çekilerek uzaklaştırıldı. Yıkama işleminden sonra hücrelerin üzerine 1 ml tripsin-EDTA eklendi ve hücreler 2-3 dakika inkübatörde bekletildi. Hücreler 6 well plate'e kaldırılacaklarından petri içerisine 12 ml tamamlanmış MEM besiyeri eklendi ve tripsin-EDTA ile 13 ml'ye ulaşan hacim pipetaj yapılarak bir falkonda toplandı. Elde edilen hücre solüsyonundaki hücreler kültür ortamında 6 well plate'in her kuyucuğuna 2 ml hacimde ekildi. Ekim işleminden sonraki gün hücreler mikroskopta kontrol edildi. Hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında transfeksiyon işlemine geçildi. Transfeksiyon için hücre grupları Şekil 14'te olduğu gibi hazırlandı.



Şekil 14: Transfeksiyon yapılan 6 well platedeki hücre grupları.

Öncelikle, serumsuz (içinde FBS, sodyum piruvat, L-glutamin ve penisilin/streptomisin bulunmayan) MEM besiyeri oda sıcaklığına çıkarıldı. 6 well plate'in üç kuyucuğuna Sirt4 transfeksiyonu yapılacağı için transfeksiyon yapılacak her kuyucuk için ikişer tane yani toplamda altı adet steril ependorf tüpü hücre kültürü kabine çıkarıldı. Ependorf tüplerin üçünün içine Lipofectamine[®] 2000 Reagent, diğer üçünün içine Sirt4 plazmidi koyulacak şekilde kapakları işaretlendi. Transfeksiyon için Sirt4 plazmidinden 500 ng kullanıldı.

Kullanılacak plazmid DNA miktarının hesaplanması için plazmid izolasyonu sonrasında nanodroptan çıkan ng/μl cinsindeki değer 500 ng'a bölündü ve çıkan sonuçtaki miktar kadar Sirt4 plazmidi kullanıldı. Bu miktar 250 μl'den çıkarıldı ve geri kalan miktardaki serumsuz

MEM besiyeri, DNA koymak için işaretlenen ependorf tüplere aktarıldı. Lipofektamin için ayrılan tüplere ise 245'şer µl serumsuz MEM besiyeri koyuldu. Hesaplanan miktarda Sirt4 plazmidi ilgili tüplere koyuldu, lipofektamin için ayrılan tüplere ise 5'er µl lipofektamin eklendi ve tüplere hafifçe birkaç kez vurularak lipofektamin ve plazmidin besiyerlerinde dağılmaları sağlandı. Hazırlanan tüpler 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre tamamlandığında içerisinde lipofektamin olan tüplerden her birinin içine sırasıyla bir tane Sirt4 plazmid DNA'sı olan besiyeri içeriği aktarıldı. Toplamda 500 µl hacime sahip olan, MEM besiyeri, lipofektamin ajanı ve Sirt4 plazmid DNA'sı bulunduran üç ependorf tüp 20 dakika boyunca, oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu basamakta, lipofektamin lipozom yapısında olan bir ajan olduğu için içerisine Sirt4 plazmidini alması hedeflendi. Deneyin ilerleyen basamaklarında içerisinde Sirt4 plazmidi yer alan lipofektamin ajanının lipit yapısında olan N2A hücre membranından geçerek bu hücreleri Sirt4 ile transfekte edeceği düşünüldü. 20 dakikalık inkübasyonun bitmesine yakın bir sürede 6 well plate'de bulunan hücreler inkübatörden çıkarılarak kabin içerisine alındı. Hücreler üzerindeki tüm besiyeri çekildi ve Şekil 14'te gösterilen kontrol gruplarına 1000 µl, transfeksiyon gruplarına ise 500 µl serumsuz MEM besiyeri verildi. 20 dk boyunca inkübe edilmiş olan besiyeri, lipofektamin ve Sirt4 plazmidi içeriğinin her biri transfeksiyon grubu için ayrılan kuyucuklardaki hücrelere damla damla ilave edildi ve hücreler 5 saatlik bir süre için 37 °C'lik inkübatöre kaldırıldı. 5 saat sonra iki grubunda üzerinden tüm besiyeri dikkatlice çekildi ve iki grupta da yer alan hücrelere 2 ml tamamlanmış MEM besiyeri eklendi. Transfeksiyon sonrası elde edilen hücre grupları için deney düzeneklerine uygun olan çalışmalar her zaman transfeksiyon üzerinden 24 saat geçtikten sonra gerçekleştirildi.

3.2.5. Sirt4 Transfeksiyonu Sonrasında N2A Hücre Hattına Yapılan MTT Canlılık Testi

N2A hücreleri transfeksiyon yönteminde anlatıldığı gibi Sirt4 ile tranfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre sayımı yapılarak 96 well plate'in ilk kuyucuğuna tamamlanmış MEM besiyeri eklendi. Diğer kuyucuklara üçer tekrarla kontrol, transfeksiyon grubu hücrelerinden 5000 tane hücre sayılarak aynı sırayla iki kere ekildi. Ekimden 24 saat sonra hücreler mikroskopta kontrol edildi. Kontrolenden sonra, hücreler üzerindeki tüm besiyeri çekilerek uzaklaştırıldı. İlk ekilen üçer tekrarlı kontrol ve transfeksiyon grubu hücrelerinin besiyerleri tamamlanmış MEM besiyeri ile değiştirildi. Önceden yapılan MTT testinin değerlendirilmesinde 1000 µM'lık kainik asit konsantrasyonu kullanılmasına karar

verildiğinden son ekilen kontrol ve transfeksiyon grubu hücrelerinin olduğu kuyucuklara önce besiyerleri sonra da 1000 μM 'lık kainik asit konsantrasyon uygulaması için uygun miktarda 10 mM'lık kainik asit alınarak eklendi. Hafif pipetaj yapılarak eşit miktarda dağıtılmaları sağlandı. Kainik asit muamelesi sonrasında hücreler 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında MTT solüsyonundan 5 μl hücrelere eklendi, hücreler 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sona erdiğinde kuyucukların dibinde oluşan formazan tuzlarının dağılmamasına dikkat edilerek besiyerleri çekildi. Her kuyucuğa 200 μl DMSO eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda, referans olarak 630 nm dalga boyu alınarak ölçüm alındı. Ölçüm sonrasında kontrol, kontrol+kainik asit, transfeksiyon, transfeksiyon+kainik asit grupları için veri grafiği çizildi.

3.2.6. RIPA Lizis Tamponu Kullanılarak Protein İzolasyonu

Hücrelerden protein izole edilmeden önce hücrelerin morfolojik durumları ve yoğunlukları mikroskopta incelendi. Kontrolde geçen hücreler tekrar inkübatöre kaldırılarak protein izolasyonu için gereken hazırlıklar yapıldı. Öncelikle örnek grupları için gereken miktarlarda RIPA lizis tamponu her örnek grubu için 150 μl hacimde, %1 proteaz inhibitörü, %1 fosfataz inhibitörü içerecek şekilde pipetaj kaybı da göz önüne alınarak hazırlandı. RIPA lizis tamponu hazırlandıktan sonra vortekslenerek 4 °C'de kullanım aşamasına kadar saklandı. Hazırlıklar tamamlandıktan sonra, hücre kültürü kabine protein izolasyonu yapılacak olan 6 well plate'deki hücreler çıkarıldı. Her kuyucuktan eski besiyeri çekilerek uzaklaştırıldı. Her kuyucukta bulunan hücreler 2 ml PBS ile yıkandı, yıkamadan sonra PBS'in tamamı hücreler üzerinden çekilerek uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 250 μl tripsin-EDTA eklendi ve plate 2-3 dakika boyunca inkübatör içerisinde bekletildi. Protein izolasyonu, transfeksiyon sonrasında kontrol ve transfeksiyon grupları için yapıldığından her grubun ilk kuyucuğuna 500 μl PBS eklendi. Kontrol grubunda ilk kuyucuktaki 250 μl 'lık tripsin hacmine, 500 μl PBS hacmi de eklendiğinde 750 μl 'ye ulaşan miktarda karışım elde edildi ve bu karışımla ilk kuyucuktaki hücreler toplandı. Toplanan hacim bir yan kuyucuğa aktarıldı ve burada elde edilen 1000 μl hacimle ikinci kuyucuktaki hücreler toplandı. Elde edilen bu karışım son kuyucuk olan üçüncü kuyucuğa aktararak 1250 μl 'lık hücre solüsyonu elde edildi ve steril bir ependorf tüpe alındı. Bu işlemler aynı şekilde transfeksiyon grubundaki hücrelerin toplanması için de gerçekleştirildi. Ependorf tüplere toplanan hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve supernatant kısımları atıldı. Pelletler 1 ml PBS ile kaldırılarak yıkandı ve bu aşamada

tripsinden tamamen arındırılmaları amaçlandı. Yıkama sonrasında tüpler yeniden 2000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüjlendi ve supernatant kısımları atıldı. İki grubun da pelletleri üzerine önceden hazırlanan RIPA lizis tamponundan 150’şer µl eklendi, 10-15 kez pipetaj yapıldı ve örnekler 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi. Bu aşamadan sonra örnekler -80 °C’de 20 dakika donduruldu, buz üzerinde çözündürülerek 10-15 kez pipetaj yapıldı ve dondur-çöz basamamağı dört kez tekrar edildi. Bu basamaktan sonra tüpler 14000 rpm/ 4 °C’de 25 dakika boyunca santrifüj edildi, supernatant kısımları yeni ependorf tüplere alınarak pellet kısımları çöpe atıldı. Supernatant kısımlarının olduğu tüpler -20 °C’de bradford assay ve western blot çalışmaları için saklandı.

3.2.7. Bradford Assay İle Protein Miktarının Tayin Edilmesi

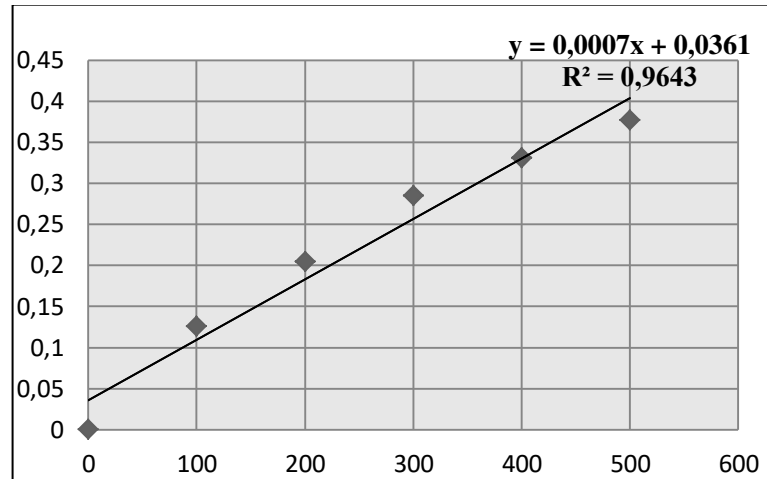
Bradford assay kolorimetrik protein tayin yöntemlerinden biridir. Prensibin temeli coomassie boyasının tahlil edilecek olan proteine bağlanarak mavi renk vermesine ve 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm alınmasına dayanır.

Transfeksiyon tamamlandıktan 24 saat sonra kontrol ve transfeksiyon grubu hücrelerinden protein izolasyon metodunda anlatıldığı gibi protein örnekleri izole edildi. Tayini yapılacak olan proteinlerin konsantrasyonlarının kıyaslanabilmesi için öncelikle protein standartları Tablo 6’ya uygun bir şekilde buz üzerinde hazırlandı. Protein örnekleri ise 1:5 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlandı ve buz üzerine kaldırıldı.

Tablo 6: Bradford assay için kullanılacak standartların hazırlanış tablosu. Abcam Bradford Assay Kiti (ab102535)’nden modifiye edilmiştir.

STANDART (µl)	H ₂ O (µl)	KONSANTRASYON (µg/µl)
0	50	0
5	45	100
10	40	200
15	35	300
20	30	400
25	25	500

Standartlar ve örnekler hazırlandıktan sonra 96 well plate’de kullanılacak olan kuyucuk başına 100 µl çalışma solüsyonu pipetaj kaybı da göz önüne alınarak 1:5 oranında dH₂O ile seyreltilerek hazırlandı, vortekslenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Hazırlanan standart ve örnekler vorteklendi ve ardından hızlı bir santrifüjle bir araya toplandı. Standartlar 0, 5, 10, 15, 20, 25 olmak üzere sırasıyla 96 well plate’in ilk sırasına 10’ar µl, çift tekrarlarla yüklendi. Protein numuneleri ise bir alt sıraya kontrol ve transfeksiyon sırasına göre 10’ar µl çift tekrarlarla yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra kullanılan her kuyucuğa çalışma solüsyonundan 100 µl eklenerek kuyucuk içinde pipetaj yapıldı. 5 dakika beklendi. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda hazırlanan plate’de ölçüm işlemi gerçekleştirildi ve bradford assay için hesaplama aşamasına geçildi. Standartlar ve örnekler ikişer kez yüklendiği için öncelikle standartların ortalamaları alındı. Daha sonra standartların her birinden blank olarak kullanılan suyun ortalaması çıkarıldı. Standart değerleri ve temsil ettikleri konsantrasyonlar için Şekil 15’teki dağılım grafiği çizildi. Grafiğe eğilim çizgisi eklendi ve üzerinde denklem ve R² değeri gösterildi ($y=0,0007x+0,0361$) ($R^2=0,9643$). Örneklerin de ortalamaları alındı, blank değeri bu ortalamalardan çıkarıldı. Denklem üzerinde y değeri yerine bu değerler yazılarak x değerleri her bir örnek için hesaplandı. Örnekler 1:5 oranında seyreltildiği için her değer 5 ile çarpılarak örnek konsantrasyonları hesaplandı. Hesaplanan değer 1000’e bölünmesiyle proteinlerin konsantrasyonları µg cinsine çevrildi. N2A kontrol grubu hücrelerinin protein konsantrasyonu 2.8 µg/µl, transfeksiyon grubu hücrelerinin protein konsantrasyonları ise 2.4 µg/µl olarak belirlendi.



Şekil 15: N2A hücre hattında transfeksiyon sonrası kontrol ve transfeksiyon gruplarından izole edilen protein örnekleri için bradford assay çalışması sonrası çizilen absorbans/standart grafiği.

3.2.8. Western Blot

Western blot, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış olan protein fragmanlarının özgül olarak belirlenmelerini sağlayan blotlama tekniğidir. Bu teknikte bir ekstraktan elde edilen protein makro moleküllerinin elektriksel ortamda birbirlerinden ayrılmaları ardından da membrana transferleri gerçekleştirilir. Daha sonra komplementeri bir antikor sayesinde bu membranda aranan proteinin var olup olmadığı, varsa miktarının ne kadar olduğu belirlenir.

Protein izolasyon yöntemi ile elde edilen ve miktar tayini yapılan proteinler bu yöntemde sırasıyla denatüre edildi, poliakrilamid jel elektroforeziyle moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı, jel üzerinden nitrosellüloz membran üzerine transfer edildi. Daha sonra membran üzerinde spesifik olmayan yerlere antikor bağlanmasını engellemek için bloklama işlemi yapıldı, bu işlemin ardından aranılan proteine uygun olan primer ve sekonder antikor uygulaması yapıldı ve bu antikorlar görüntülenerek aranılan protein olan Sirt4'ün ekspresyon seviyesine bakıldı.

3.2.8.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

TBS (Tris-Buffered Salline-1 lt) için; 6.05 gr Tris-HCl ve 8.76 gr NaCl tartıldı, üzerine 800 ml'ye yakın otoklavlanmış dH₂O eklenerek çözümleri sağlandı. Elde edilen çözeltinin pH'si, pH metre ile ölçüldü, asidikse NaOH, bazikse HCl eklenerek son pH 7.6 olarak ayarlandı ve son olarak dH₂O ile çözelti 1 litreye tamamladı.

Yıkama Tamponu (Wash Buffer-TBS+%0,1 Tween20) için; Her 100 ml çözeltinin hazırlanabilmesi için 100 ml TBS çözeltisine 100 µl Tween20 eklenerek karıştırıldı.

%10'luk SDS çözeltisi için; 10 gr SDS tartıldı, toplam hacim 100 ml olacak şekilde dH₂O ile çözdürülerek hazırlandı.

Transfer Tamponu (Transfer Buffer-1 lt) için; 3,03 gram Tris-Base, 14,4 gr glisin tartıldı, üzerine 200 ml metanol ve 2 ml %10 SDS eklenerek yaklaşık 800 ml'ye kadar dH₂O ile tamamlandı, karışımın çözünmesi sağlandı, çözüldükten sonraki hacim 1 lt'ye tamamlandı.

10X Yürütme Tamponu (10X Running Buffer-1 lt) için; 30,3 gr Tris-Base, 144 gr glisin ve 10 gr SDS tartılarak son hacim 1 lt olacak şekilde dH₂O'da çözündürüldü.

1X Yürütme Tamponu (1X Running Buffer-1 lt) için; 100 ml 10X yürütme tamponunun üzerine 900 ml dH₂O eklenerek hazırlandı.

Bloklama Solüsyonu (Blocking Solution-%5 Skim Milk (Süt tozu)+TBS) için; gerekli miktarda bloklama solüsyonu her seferinde %5 süt tozu içerecek şekilde TBS ile hazırlandı.

Strip Tamponu (Stripping Buffer- %2 SDS, 62.5 mM Tris (pH 6.7), 100 mM β -merkaptoethanol) için; 200 ml %10 SDS, 62,5 ml 1M Tris (pH: 6.7) (β -merkaptoethanolsüz) dH₂O ile 1 lt tampon hazırlanır. Her strip aşamasından önce 50 ml strip tamponu içerisine 350 μ l β -merkaptoethanol taze olarak eklenerek kullanıldı.

Ponceau S çözeltisi (%5 asetik asitte %0.1 w/v Ponceau-100 ml) için: 0,1 ponceau S tartılarak 5 ml asetik asit ve dH₂O ile çözündürüldü.

3.2.8.2. Örneklerin Hazırlanması, Jele Yüklenmesi, Jel Elektroforezi

Örneklerin hazırlanması; yükleme için kuyucuk hacmi maksimum 30 μ l olduğundan loading dye (5X-6 μ l) hacmi çıkarılınca geri kalan hacime örnekler yükleneceği için hesaplamada bu durum dikkate alındı. Bradford'da çıkan protein konsantrasyonuna göre kaç μ g protein yüklenebileceğine karar verildi. Yüklenecek istenen protein miktarı Bradford'da çıkan örnek konsantrasyonlarına bölünerek hangi örnekten ne kadar alınacağı hesaplandı. Örnekler ependorf tüplere alınmadan önce her örnek için tüplere 6 μ l loading dye (yükleme boyası) eklendi, belirlenen miktarlarda örnekler yükleme boyası koyulan tüplere eklendi ve birbirlerine karışmaları için kısa süreli santrifüj edildi. Örnekler, ısı bloğunda 96 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edildi, ardından tüpler buharlaşan miktarın tekrar dibe çöktürülmesi için yeniden kısa süreli santrifüj edildi.

Örneklerin jele yüklenmesi; jel alınarak yürütme tankına koyuldu, tanka ve jel içindeki bölmeye yeterli miktarda yürütme tamponu eklendi ve jelin tarakları çıkarıldı. Yükleme planına uygun bir şekilde marker ve örnekler jele yüklendi.

Örneklerin Jel Elektroforezi; yükleme işlemi tamamlandıktan sonra örnekler 1-2 saat boyunca 100V'da yürütüldü.

3.2.8.3. Jelden membrana transfer, bloklama, blotlama ve görüntüleme

Transfer öncesinde watman kağıtları ve membran kesildi, buz blokları çıkarıldı. Transfer tankı çıkarıldı ve transfer kasetine watman kağıdı, jel, membran Şekil 16' daki gibi yerleştirilerek transfer sandviçi hazırlandı.



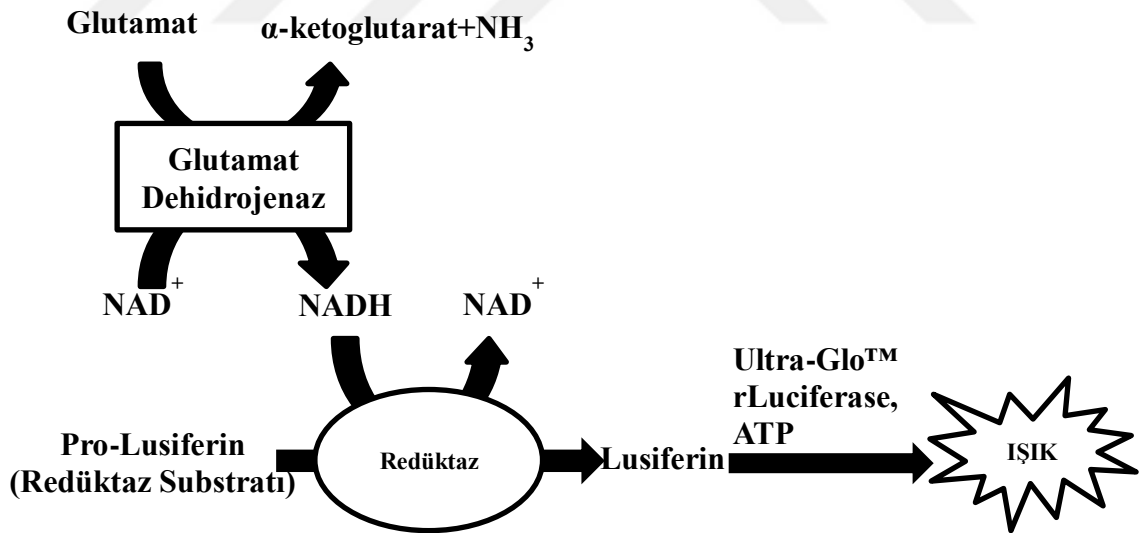
Şekil 16: Western blot transfer sandviçinin hazırlanış sırası.

Transfer tankına hazırlanan sandviç ve buz blokları yerleştirildikten sonra transfer işlemi 4 °C'de (soğuk odada), 2 saat boyunca 70V'da eksi (siyah) kısımdan artı (kırmızı) kısma doğru gerçekleştirildi. Transfer tamamlandıktan sonra membrana markerın geçip geçmediği kontrol edildi ve örneklerin konumlarına dikkat edilerek membran kesildi. Membran temiz bir kutuya alındı ve üzerine yeterli miktarda bloklama solüsyonu eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıcıda sallandı. Bloklama sonrasında bloklama solüsyonuna primer antibody (Sirt4 Poliklonal Rabbit Antibody) 1:1000 oranında koyularak 4 °C'de 16 saat boyunca karıştırıcıda sallandı. 16 saat geçtikten sonra membran 3 kez 5'er dakika yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Membran üzerine bloklama solüsyonu ve içerisine sekonder antikor (Anti-Rabbit IgG-HRP) 1:5000 oranında eklendi. 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıcıda sallandı ve sürenin sonunda membran 3 kez 10'ar dakika yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama sonunda membran üzerine HRP substratı olan ECL solüsyonu 500 µl uygulandı, 5 dakika kadar karanlıkta bekletildi ve UV görüntüleme cihazında görüntüleme işlemi tamamlandı. Görüntüleme sonrasında α-tubulin antikoruna ile blotlamaya hazırlık ve primer ve sekonder antikorlarından arındırılması için

membran üzerini örtecek kadar strip tamponu ile, 1.5 saat boyunca, oda sıcaklığında karıştırıcıda sallandı. Membran 3 kez 5'er dakika yıkama tamponu ile yıkandı ardından da 1 saat boyunca bloklama solüsyonu ile karıştırıcıda sallandı. Bloklama sonunda, bloklama tamponuna α -tubulin 1:5000 oranında eklenerek 4 °C'de, bir gece boyunca yani 16 saat karıştırıcıda sallandı. Ertesi gün membran yıkama tamponu ile 3 kez 5'er dakika boyunca yıkandı ve sonrasında bloklama tamponuna 1:5000 oranında sekonder antikor (Anti-Rabbit IgG-HRP) eklenerek membran 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda çalkalandı. İnkübasyon sonrası membran 3 kez 10'ar dakika yıkama tamponuyla yıkandı, 500 μ l ECL solüsyonu membran üzerine eklendi. ECL inkübasyonu için yaklaşık 5 dakika kadar beklenildi ve sonrasında UV görüntüleme cihazında görüntü alındı.

3.2.9. Glutamat Assay

Glutamat testi biyolojik numunelerde glutamatın hızlı, seçici ve hassas bir biçimde algılanması için kullanılan biyoluminesans testir.



Şekil 17: Glutamat assay çalışma prensibinin gösterimi. Promega Ultra-Glo™ glutamat assay kitinden modifiye edilmiştir.

Glutamat dehidrojenaz, glutamatı α -ketoglutarata çevirirken NAD^+ NADH 'a çevrilir, test bu aşamada salınan NADH 'ın tespitine dayanır. NADH varlığında, bir pro-lusiferin redüktaz substratı, redüktaz tarafından lusiferine dönüştürülür, ortaya çıkan lusiferin Şekil

17'de gösterildiği gibi Ultra-Glo™ Rekombinant Lusiferaz tarafından ışık üretmek için kullanılmaktadır. Açığa çıkan lüminesans sinyal numunedeki glutamat miktarıyla orantılıdır ve tüm glutamat tüketilene kadar sabit bir lüminesans sinyal elde edilir. Bu sinyalin ölçümüyle numunelerdeki glutamat miktarı tayin edilmektedir.

Hücre Ekimi; bu deneye başlanmadan önce 10 cm²'lik petri kabında yetiştirilen N2A hücreleri 6 well plate içerisine kaldırıldı, hücreler plate'e tutunduktan sonra transfeksiyon bölümünde anlatıldığı gibi gruplara ayrılarak SIRT4 plazmidi ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra, plate'de A sırasındaki ilk dört kuyucuğa, tamamlanmış MEM besiyeri koyuldu. B ve C sırasındaki ilk dört kuyucuğa, kontrol grubu hücrelerinden, D ve E sırasındaki ilk dört kuyucuğa ise transfeksiyon grubu hücrelerinden 5000'er hücre ekildi. 0 saat, 12 saat, 24 saat ve 48 saat için tüm deney boyunca her kuyucuktan besiyeri toplanacağından ve toplam 20 kuyucuk olduğundan 80 tane ependorf tüp hücre gruplarına göre isimlendirildi, içlerine ayrı ayrı 98 µl steril PBS, hücre kültürü kabini içerisinde koyulup 4°C'ye kaldırıldı.

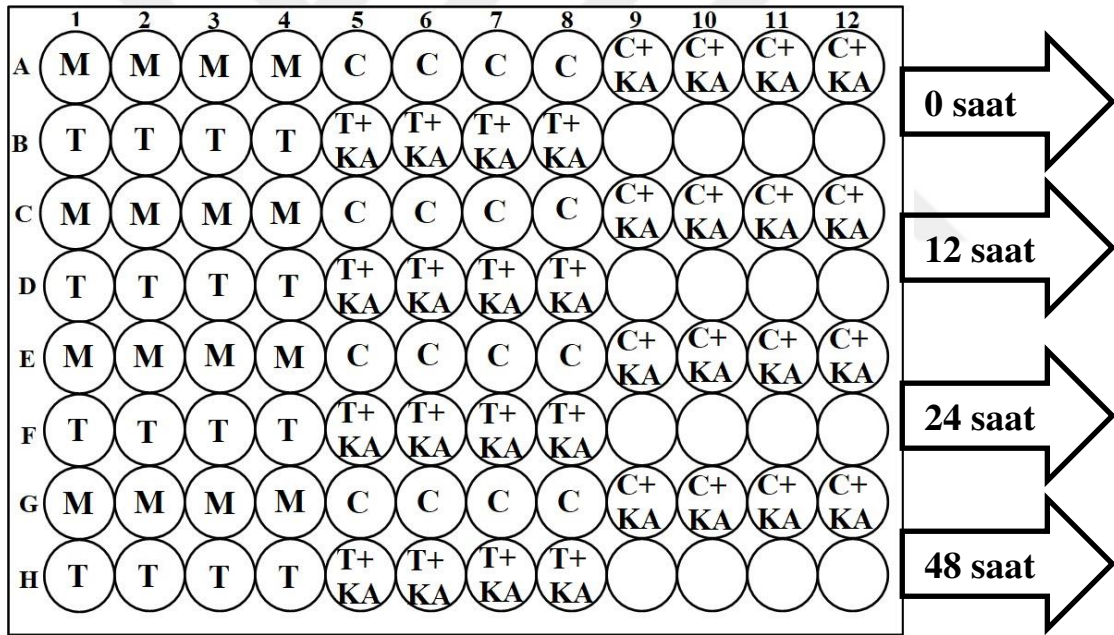
Besiyeri Değiştirme; hücreler canlılık ve yoğunlukları için mikroskopta kontrol edildi. Besiyeri değiştirmeye geçilmeden önce kainik asit eritildi. Toplam 8 kuyucuğun besiyeri kainik asitli besiyeri ile değiştirileceğinden her kuyucuk için 1,7 µl kainik asit ve 98.3 µl tamamlanmış MEM besiyeri kullanılarak kainik asitli besiyeri ependorf tüp içerisine hazırlandı. (Kainik asit Hesaplaması 1000 µM için; $[100 \mu\text{l} \times 1000 \mu\text{M}] / [58.600 \mu\text{M}] = 1.7 \mu\text{l}$ kainik asit) Hücreler inkübatörden çıkarıldı ve kültür ortamında tüm grupların besiyerleri çekilerek uzaklaştırıldı. A sırasındaki besiyeri grubunun, B sırasındaki kontrol grubunun ve D sırasındaki transfeksiyon grubunun besiyeri 100'er µl tamamlanmış MEM besiyeri ile değiştirildi. C sırasındaki kontrol grubunun ve E sırasındaki transfeksiyon grubunun besiyeri 100'er µl kainik asitli besiyeri ile değiştirildi. Yani sırasıyla kontrol, kontrol+kainik asit, transfeksiyon, transfeksiyon+kainik asit grupları dört tekrarlı oluşturulmuş oldu.

Besiyeri Toplama; besiyerileri değiştirilir değiştirilmez 0 saat için her kuyucuktan 2 µl besiyeri alınarak önceden hazırlanmış olan 98 µl PBS içeren tüplere toplandı ve tüpler -20 °C'ye kaldırıldı. Besiyeri değişiminin üzerinden 12 saat, 24 saat ve 48 saat geçtiğinde besiyeri toplama işlemi 0 saat için olduğu gibi tekrar edildi ve besiyeri içeren PBS'li tüpler -20 °C'ye kaldırıldı.

Test Aşaması; Glutamat testinde yer alan bileşenler Tablo 7'ye uygun şekilde plate'de kullanılacak olan 81 kuyucuk için hazırlandı.

Tablo 7: Glutamat testinde yer alan bileşenler ve kuyucuk başına kullanım miktarları. Promega glutamat assay kitinden modifiye edilmiştir.

Bileşen	Kuyucuk başına kullanılan miktar
Lusiferin tespit etme solüsyonu	50 µl
Redüktaz	0.25 µl
Redüktaz substratı	0.25 µl
Glutamat dehidrojenaz	1.0 µl
NAD	1.0 µl



Şekil 18: Glutamat testi için toplanan besiyerlerinin yükleme sırası.

-20 °C'de saklanan PBS ve besiyeri içeren numunelerin çözünmeleri sağlandı, numuneler Şekil 18'de yer alan plana göre beyaz plate içerisine kuyucuk başına 50 µl olacak şekilde yüklendi. Plate'e yüklemek için test içerisinde gelen 10 mM, 50 µl glutamattan 50 µM glutamat hazırlandı. ($[50 \mu\text{l} \times 50 \mu\text{M}] / 10000 = 0,25 \mu\text{l}$ hesaplamasından çıkan miktar ependorf tüpte son hacim 50 µl olacak şekilde ayarlandı.) Bu glutamat yalnızca tek bir kuyucuğa kontrol olarak koyuldu. Ardından hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 50 µl eklendi. Plate

ışksız ortamda, 1 saat boyunca, oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sona erdiğinde lüminometre ile ölçüm alındı.

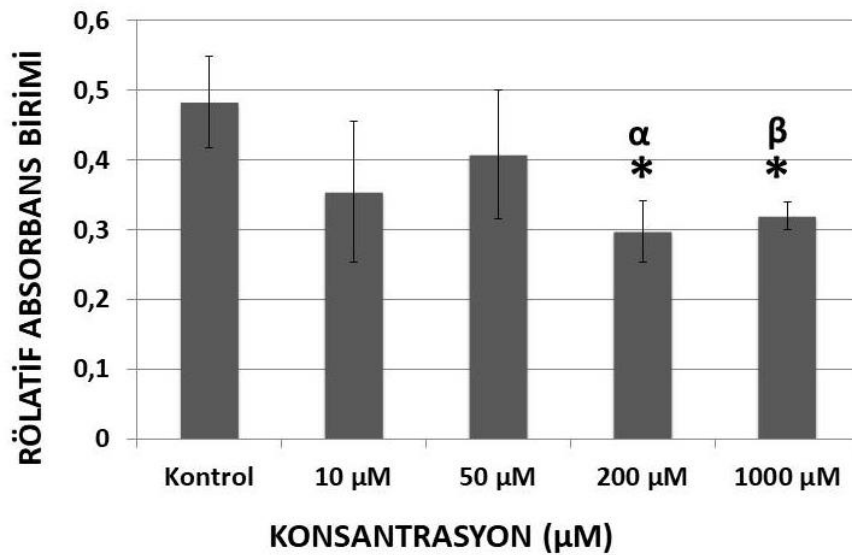
3.3 İstatistik

İstatistiksel analizler Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) kullanılarak yapıldı. MTT assayleri için, eşleşmemiş, tek kuyuklu, eşit varyans, iki örnekli t-test kullanıldı. Glutamat assay için istatistiksel analizler, Two-Way ANOVA testi kullanılarak elde edildi. $p < 0,05$ değerleri anlamlı farklılıklar olarak gösterildi. Figürlerde yer alan hata çubukları ortalamanın standart hatasını (SEM) göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1.Kainik Asit Uygulanan N2A Hücrelerinde MTT Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

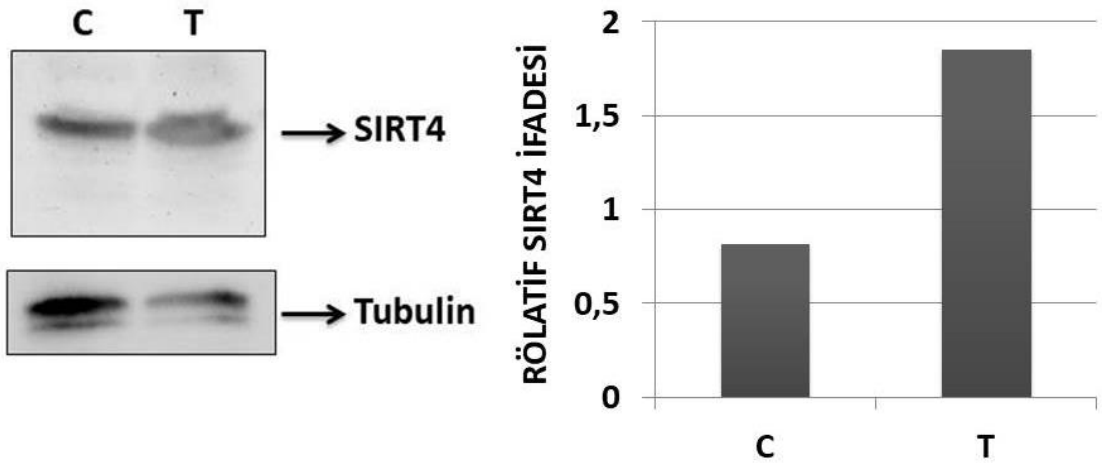
N2A hücreleri 10 μ M, 50 μ M, 200 μ M ve 1000 μ M'lık kainik asit konsantrasyonlarıyla muamele edildi. Hücrelerin canlılık durumları MTT testi ile değerlendirilmiş olup kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş için p değerleri T-Test ile 200 μ M'lık konsantrasyonda $*p^{\alpha}=0,028318<0,05$ ve 1000 μ M'lık konsantrasyonda $*p^{\beta}=0,026861<0,05$ olarak hesaplanmıştır. MTT testi sonrasında elde edilen Şekil 19'daki sonuçlara göre N2A hücre hattında yapılacak olan sonraki deneylerde 1000 μ M konsantrasyon kullanılmasına karar verildi.



Şekil 19: N2A hücre hattında 24 saat kainik asit inkübasyonu sonrası yapılan MTT canlılık testi grafiği. ($*p^{\alpha}=0,028318<0,05$, $*p^{\beta}=0,026861<0,05$)

4.2. Transfeksiyonun Teyit Edilmesi İçin Sirt4 Protein İfadesinin Western Blot İle Tespiti

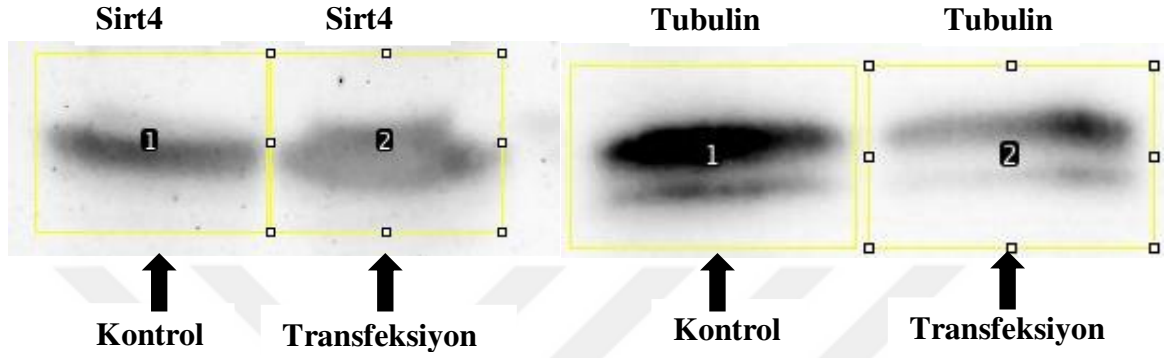
Sirt4 transfeksiyonu yapıldıktan sonra kontrol N2A (C) ve transfeksiyon yapılmış N2A hücrelerinden (T) elde edilen proteinlerden 100 µg yüklemek istediğimiz için, bradfordda çıkan konsantrasyonlar 100'e bölünerek hangi örnekten kaç µl alınacağı hesaplandı. Örneklerle yükleme boyasının eklenmesi ve örneklerin denatüre edilmesinin ardından örnekler jele önce kontrol sonra transfeksiyon grubu olacak şekilde yüklendi. SIRT4 antikoru 1:1000 oranında kullanıldı. Görüntüleme işleminin ardından membran strip edilerek 1:5000 oranında alfa-tubulin antikoru ile muamele edildi. Alfa-tubulin antikoru için de görüntü alındıktan sonra Image J programı kullanılarak miktar tayini yapıldı. Şekil 20'de yer alan grafik, Sirt4 için belirlenen bant değerinin tubulin için belirlenen bant değerine bölünmesiyle çizildi ve Sirt4 ve tubulin bantlarının western blot görüntülerinin yanında gösterildi. Bu bulgu, transfeksiyondan sonra, Sirt4 protein ifadesi arttığı için, başarılı bir şekilde Sirt4 transfeksiyonu yapıldığını göstermektedir.



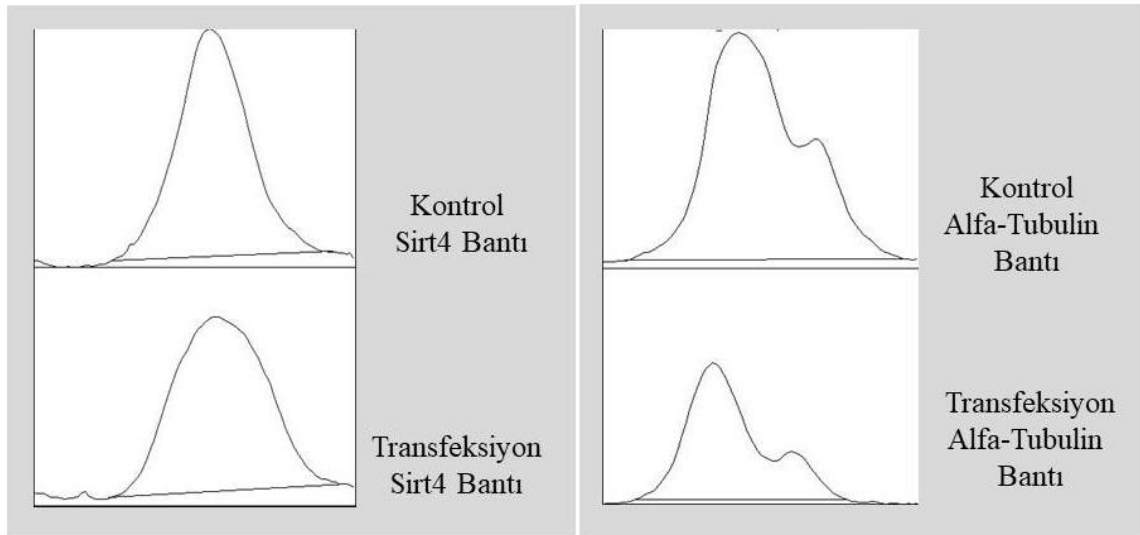
Şekil 20: Kontrol ve transfeksiyon grubu hücreleri için western blot görüntüsü ve rölatif Sirt4 ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği. (C:Kontrol T:Transfeksiyon)

4.2.1. Western Blot Deneyinde Görüntülenen Bantların Image J Programı Kullanılarak Hesaplanması

NIH (Ulusal Sağlık Enstitüsü – National Institute of Health)’in web sitesinden Image J programı ücretsiz olarak indirildi ve miktar tayini, program içeriğinde anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 21: N2A hücre hattında kontrol ve transfeksiyon grubu için sırasıyla Sirt4 bantının ve Alfa-Tubulin bantının Image J programı ile analizi sırasında çerçeve içine alınması.



Şekil 22: N2A hücre hattında yapılan western blot sonrasında kontrol ve transfeksiyon grubu örneklerinden elde edilen Sirt4 ve Alfa-Tubulin bantları için Image J programı ile tepe noktası grafiğinin çizilmesi

Öncelikle, Sirt4 bantları Şekil 21’de olduğu gibi dikdörtgen bir çerçeve içerisine alındı ve bantların yoğunluklarına göre programda tepe noktası grafiği Şekil 22’deki gibi çizildi. Tepe noktası grafiğinin alt kısmı çizgiyle işaretlendi, grafiğin altında kalan alan hesaplandı ve bantlara denk gelen değerler gösterildi. Aynı yöntemle alfa-tubulin bantlarına karşılık gelen değerler belirlendi. Bu değerler Tablo 8’de gösterilmiştir ve Sirt4/Alfa-Tubulin değerleri göz önüne alındığında transfeksiyon grubunda Sirt4 ifadesinin arttığı gösterilmiştir.

Tablo 8: Sirt4 ve Alfa-Tubulin bantları için çizilen tepe grafiği altında kalan alanlara karşılık gelen değerler ve Sirt4/Alfa-Tubulin değerleri.

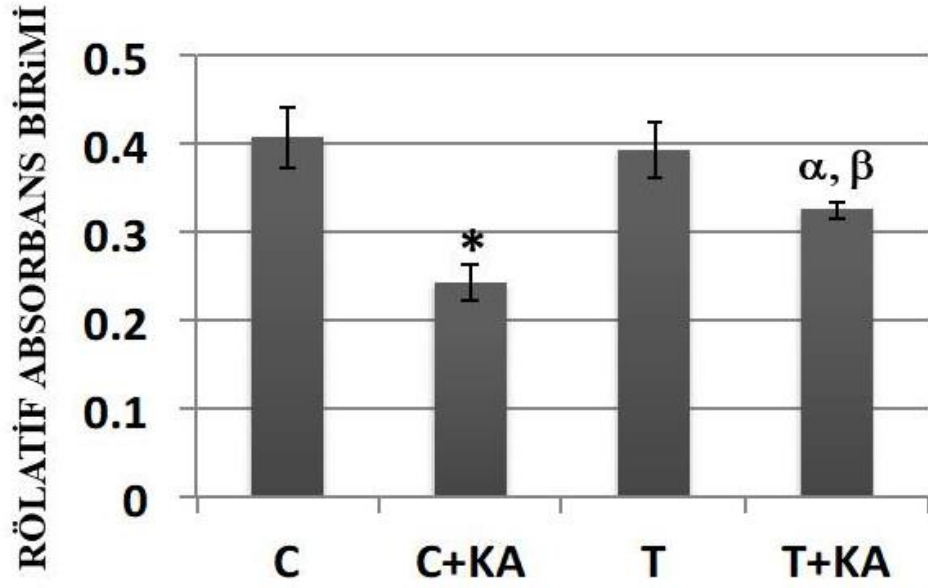
	Sirt4	Alfa-Tubulin	Sirt4/Alfa-Tubulin
Kontrol	23387,392	28653,342	0,81621865
Transfeksiyon	23603,099	12760,693	1,84967219

4.3. Sirt4 Transfeksiyonu Sonrasında N2A Hücre Hattında Yapılan MTT Canlılık Testinin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sirt4 plazmidi ile N2A hücre hattı transfekte edildikten sonra kontrol ve transfeksiyon grubu hücrelerine uygulanan 1000 μ M kainik asit muamelesinden sonra kontrol, transfeksiyon, kontrol+kainik asit ve transfeksiyon+kainik asit olmak üzere dört farklı deney grubu ortaya çıkarıldı ve Tablo 9’da gösterilen bu hücre gruplarındaki hücrelerin canlılığı MTT testi ile değerlendirildi

Tablo 9: Deneyde yer alan hücre gruplarının açıklanması.

Hücre Grubu	Grup Açıklaması
Kontrol (C)	Sirt4ifadesi arttırılmamış N2A hücresi
Kontrol+Kainik asit (C+KA)	Sirt4 ifadesi arttırılmamış ve kainik asit muamelesi yapılmış N2A hücresi
Transfeksiyon (T)	Sirt4 ifadesi arttırılmış N2A hücresi
Transfeksiyon+Kainik asit (T+KA)	Sirt4 ifadesi arttırılmış ve kainik asit muamelesi yapılmış N2A hücresi

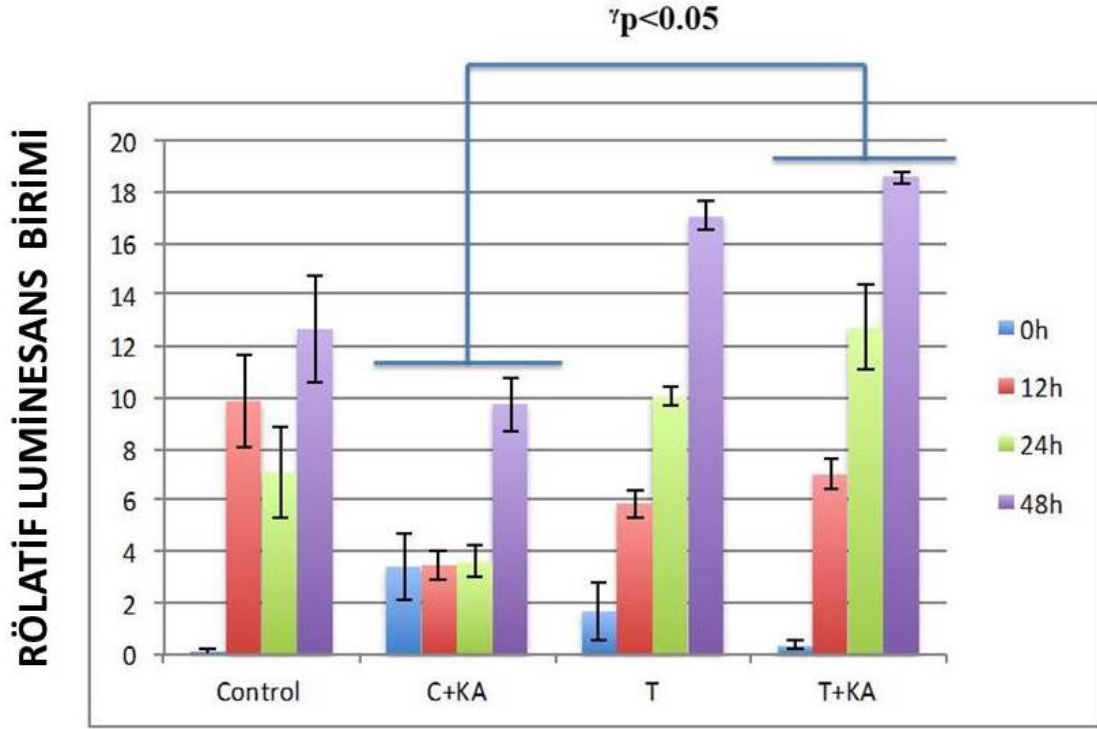


Şekil 23: N2A hücre hattında transfeksiyon ve takiben kainik asit muamelesinin yapılmasının ardından yapılan MTT canlılık testi sonucunda elde edilen hücre canlılık grafiği. (* $p=C$ ile $C+KA$, $^{\alpha}p=T$ ile $T+KA$, $^{\beta}p=C+KA$ ile $T+KA$) (* $p=0.003<0.05$, $^{\alpha}p=0.045<0.05$, $^{\beta}p=0.004<0.05$)

Şekil 23’de gösterilen, kontrol (C) ve kainik asit ile muamele edilmiş kontrol grubu hücrelerinin (C+KA) sağkalımı kıyaslandığında T-Test ile * $p=0.003<0.05$ değeri belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Sirt4 ile transfeksiyon yapılmış hücreler (T) ile kainik asit ile muamele edilmiş ve Sirt4 ile transfekte edilmiş hücrelerin (T+KA) sağkalımı kıyaslandığında T-Test ile $^{\alpha}p=0.045<0.05$ şeklinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Kainik asit ile muamele edilmiş kontrol grubu hücreleri (C+KA) ile kainik asit uygulanmış ve Sirt4 ile transfekte edilmiş hücrelerin sağkalımı kıyaslandığında T-Test ile $^{\beta}p=0.004<0.05$ olarak istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Bu bulgu, Sirt4 protein ifadesi artışının, kainik asitin yol açtığı eksitotoksisite sonucu oluşan hücre ölümünü azalttığını göstermektedir.

4.4. Sirt4 ile Transfekte edilen N2A Hücre Hattının Kainik Asit Muamelesini Takiben Yapılan Glutamat Assay Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Glutamat assay deneyi tamamlandıktan sonra lüminometre ile ölçülen değerler Two-way ANOVA programı kullanılarak değerlendirildi ve Şekil 24'te yer alan grafik çizildi.



Şekil 24: Sirt4 ile transfecte edilen N2A hücre hattına kainik asit muamelesinin ardından yapılan glutamat assay sonuçlarının değerlendirilmesi. (C:Kontrol, T:Transfeksiyon, KA:Kainik asit, h: hour (saat)) (*p:=T ile T+KA, ^ap=C ile T, ^bp=C ile C+KA, ^cp=C+KA ile T+KA) (*p=0.1237>0,05, ^ap=0,2934>0,05, ^bp=0,0729>0,05, ^cp=0,0019<0,05)

Yalnızca Sirt4 ile transfecte edilmiş hücreler (T) ile Sirt4 ile transfecte edilmiş ve kainik asit muamelesi yapılmış hücrelerdeki (T+KA) glutamat salınımı kıyaslandığında *p=0.1237>0,05 olarak hesaplandı. Kontrol (C) ve transfeksiyon grubu hücrelerindeki (T) glutamat salınımı istatistiksel olarak kıyaslandığında ^ap=0,2934>0,05 olarak hesaplandı. Kontrol hücreleri (C) ve kainik asit muamelesi yapılmış hücrelerdeki (C+KA) glutamat salınımı istatistiksel olarak kıyaslandığında ^bp=0,0729>0,05 olarak hesaplandı. Kainik asit muamelesi yapılan hücreler (C+KA) ile Sirt4 ile transfecte edilmiş ve kainik asit muamelesi

yapılmış olan hücrelerdeki (T+KA) glutamat salınımı istatistiksel olarak kıyaslandığında $p=0,0019<0,05$ olarak hesaplandı ve anlamlı bir sonuç olarak kaydedildi.



5. TARTIŞMA

Öncelikle, çalışmadaki bulgular ile 1 mM kainik asit konsantrasyonu çalışma konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Ayrıca, N2A hücreleri Sirt4 ile başarılı bir şekilde transfekte edilmiştir. Sonuçlarımız, Sirt4 ifadesi arttırıldığında, kainik asit ile muamele sonucu oluşan hücre ölümünün azaldığını gösterdi. Bu bulgu Sirt4'ün potansiyel olarak eksitotoksisiteyi azaltabileceğini göstermiştir.

Glutamat assay çalışmasında, kontrol ve kainik asit ile muamele edilmiş olan N2A hücrelerinin grafiksel verileri kıyaslandığında, kullanılan doz ve süre ile yapılan kainik asit muamelesiyle hücreler öldüğü için, glutamat salınımının azaldığı düşünüldü. Bu sonuç, kainik asitin eksitotoksikite yoluyla hücreleri öldürdüğünü göstermiştir ve hücrelerin ölümü ile paralel olarak glutamat salınımında azalma gözlenmektedir.

Kontrol hücreleri (C) ile Sirt4 ile transfekte edilmiş hücreler (T) kıyaslandığında anlamlı bir sonuç bulunmadı. 48 saat sonundaki ölçümde, Sirt4 ile transfekte edilmiş grupta glutamat salınımında bir artış gözlemlendi; bu artışın sebebinin, Sirt4 ifade artışı nedeniyle süre sonunda yaşamayı başaran hücre sayısının fazla olmasından kaynaklı olabileceği düşünüldü. Ancak, ifade artışı olsa da, sirtuinlerin bir stres sonucu aktive olan “stress response” (stres cevabı) ya da “survival” (yaşamı destekleyici) genler oldukları bilinmektedir. Bu nedenle, kainik asit muamelesi olmayınca, kontrol ve transfeksiyon grubu arasında anlamlı bir değişiklik olmadığını düşünmekteyiz.

Sirt4 ile transfekte edilmiş ve kainik asit ile muamele edilmiş (T+KA) hücre grubu ile yalnızca Sirt4 ile transfekte edilmiş grup (T) kıyaslandığında, önemli bir fark görülmedi. Bunun nedeni, zaten Sirt4 ifadesi arttırılarak strese karşı güçlendirilmiş hücrelerde (pro-survival) yapılan kainik asit muamelesinin, yaşayan hücre sayısını önemli ölçüde azaltıp glutamat salınımını azaltacak kadar yeterli olmaması olabilir. Daha uzun süre ve daha yüksek dozda muamele gerektiği düşünülmektedir.

Normal şartlarda zaman ile (48 saat boyunca besiyeri değişmediği için) glutamat birikimi olmaktadır ve besiyerinde biriken glutamat miktarı artmaktadır. Kainik asit

eklendiğinde de zaman geçtikçe glutamat salınım miktarının doğal olarak artmasını beklemekteyiz. Ancak bizim uyguladığımız dozda ve sürelerde, hücrelerde gerçekleşen ölümden dolayı glutamat salınımında düşüş gözlenmiştir (C ve C+KA grubu kıyaslandığında). 12 saat sonunda hücre ölümü 1000 μ M kainik asit dozu ile gerçekleşmiştir. Ancak 6 saat sonra ölçülmüş olsaydı, glutamat miktarı artışı gözlenebilirdi diye düşünülmektedir. Fakat kullanılan kitteki protokol uyguladığı için, orada önerilen sürelerde ölçüm yapılmıştır. Ayrıca, 1000 μ M'dan daha az bir doz kullanılırsa da ölüm azalacağı için hücre ölümü olmadan önceki glutamat salınımı yakalanabilir.

Glutamat assayde elde edilen en önemli sonuç, kainik asit ile muamele edilmiş olan N2A hücreleri (C+KA) ve kainik asit ile muamele edilmiş olan transfeksiyon grubu (T+KA) hücrelerinin kıyaslanmasıyla elde edilmiştir. Bu sonuç Two-Way ANOVA testine göre de anlamlı olarak belirlenmiştir. Özetle, Sirt4 ifadesini transfeksiyon yöntemiyle arttırdığımız hücrelerde, Sirt4 glutamat metabolizmasını düzenleyerek ve potansiyel koruyucu etki göstererek hücre ölümünü azalttığı için daha fazla glutamat salınımı gözlenmiştir. Bu bulgu da, Sirt4'ün, eksitotoksitenin moleküler mekanizmasını düzenleyerek engellediğini göstermiş oldu.

Çalışmamızda, Sirt4'ün glutamata bağlı eksitotoksositeye karşı potansiyel koruyucu etkisi olabileceği doğrulandı. Bu sonuç, gelecekte Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, fronto temporal demanslar ve ALS gibi sinir hücrelerinde ilerleyen kayıp ve bu kayıba bağlı olarak sinir sistemi fonksiyonlarının yitirilmesinin görüldüğü birçok nörodejeneratif hastalığın tedavi edilmesine yönelik bir strateji sağlayabilir ve gelecekte yapılacak çalışmalarla bu hastalıkların yan etkileri olmayan tedavi arayışlarına ışık tutabilir. Sirtuinler küçük moleküller ile aktive edilebilen enzimler oldukları için Sirt4'ü aktive eden küçük moleküller dizayn edilerek gelecek çalışmalar ilaç hedefi geliştirmek için planlanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ortalama yaşam süresinin artışıyla birlikte Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığı artmıştır. Bütün nörodejeneratif hastalıkların temelinde sinir hücrelerinde ilerleyen kayıp ve bu kaybı takiben, sinir sistemi fonksiyonlarının yitilmesi yer almaktadır. Nöronal birçok işlevi bulunan eksitator amino asit glutamatın sinaptik boşlukta fazla miktarda bulunması nöronal ölüm ve yaralanmaya neden olur ve bu nörodejeneratif hastalıkların temelinde yatan nedenlerden biridir. Bu nedenle hücre dışından glutamatın geri toplanması nörodejeneratif hastalık riskinin azalması için kritik bir noktada yer alır. Bu çalışmada, fare nöroblastoma hücrelerinde Sirt4'ün eksitotoksisteye karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. İlk olarak N2A hücre hattı, eksitotoksiste oluşturacak olan farklı konsantrasyonlarda kainik asite maruz bırakılmış ve hücre canlılık testine tabi tutulmuştur. Testin sonucunda hücre canlılığı, 200 μ M ve 1000 μ M'lık konsantrasyon için anlamlı ($p<0.05$) bir düşüş sergilemiştir. 1000 μ M, çalışma konsantrasyonu olarak seçilmiştir. N2A hücrelerinde Sirt4 ifadesi transfeksiyon ile artırılarak, ifade artışı western blot tekniği ile doğrulanmıştır. Kontrol N2A hücreleri ile Sirt4 ifadesi artırılmış N2A hücreleri, 1000 μ M konsantrasyonda kainik asit ile muamele edilerek dört grup hücre oluşturulmuş (kontrol N2A, SIRT4 ile transfekte edilmiş N2A, kainik asit ile muamele edilmiş N2A, SIRT4 ile transfekte edilmiş ve kainik asit muamelesi yapılmış N2A) ve canlılık testi yapılmıştır. Test sonucunda elde edilen verilerde, kontrol hücreleri ile kainik asit uygulanmış hücre grubu kıyaslandığında $*p=0.003<0.05$ şeklinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir. Sirt4 ile transfekte edilmiş hücreler ile kainik asit uygulanmış transfeksiyon grubu kıyaslandığında $^ap=0.045<0.05$ şeklinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Kainik asit uygulanmış hücreler ile kainik asit uygulanmış transfeksiyon grubu kıyaslandığında ise $^bp=0.004<0.005$ şeklinde anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ve Sirt4 ifade artışının kainik asit sonucu oluşan hücre ölümünü azalttığı gözlenmiştir.

Yukarıdaki dört grup hücrede glutamat salınımı ölçülmüştür. Sirt4 ifadesi artırılmış N2A hücreleri ile Sirt4 ile transfekte edilmiş ve kainik asit ile muamele edilmiş N2A hücreleri kıyaslandığında istatistiksel sonuç $*p=0.1237>0,05$, kontrol ve Sirt4 ile transfekte edilmiş N2A hücreleri istatistiksel olarak kıyaslandığında istatistiksel sonuç $^ap=0,2934>0,05$, ve kontrol ile yalnızca kainik asit muamelesi yapılmış N2A hücreleri istatistiksel olarak kıyaslandığında $^bp=0,0729>0,05$ verileri elde edildi. Kainik asit muamelesi yapılan kontrol hücreleriyle Sirt4

ile transfekte edilmiş ve kainik asit muamelesi yapılmış hücrelerin glutamat salınımı kıyaslandığında ise $p=0,0019<0,05$ anlamlı bir sonuç olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, Sirt4'ün glutamata bağlı eksitotoksisteye karşı koruyucu olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Glutamat salınımını hücreler ölmeden kaydebilmek için, kainik asit muamelesi başladıktan 6 saat sonra ölçüm yapılabilir ya da 1000 μM 'dan daha az bir kainik asit konsantrasyonuyla muamele ederek glutamat assay yapılabilceğini önermekteyiz.

Bu çalışmadaki bulgular ile, eksitotoksisteye karşı Sirt4'ün koruyucu olduğu sonucunu destekleyen ve alternatif çalışmalarla eksitotoksisteye karşı Sirt4 aktivitesini arttıran terapötik yaklaşımlar geliştirilebileceğini düşünmekte ve eksitotoksiste mekanizması daha iyi anlaşılabilceğini öngörmekteyiz.



KAYNAKLAR

- Amar AP, Levy ML.** Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1999, 44, 1027-1039.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG.** Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of National Academy Sciences of the USA* 1997, 94, 4155-4160.
- Beart PM, O'Shea RD.** Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *British Journal of Pharmacology* 2007, 150, 5-17.
- Bell EL, Guarente L.** The SirT3 divining rod points to oxidative stress. *Molecular cell* 2011, 42, 561-568.
- Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R.** Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: Metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1981, 6, 1361-1391.
- Ben-Ari Y.** Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985, 375-403.
- Bruce AJ, Baudry M.** Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radical Biology and Medicine* 1995, 993-1002.
- Chen Z, Duan R-S, Quezada HC.** Increased microglial activation and astrogliosis after intranasal administration of kainic acid in C57BL/6 mice. *Journal of Neurobiology* 2005, 207-218.
- Cherian A, Thomas SV.** Status epilepticus. *Annals of Indian Academy of Neurology* 2009, 12(3), 140-153.
- Colton CK, Kong Q, Lai L.** Identification of translational activators of glial glutamate transporter EAAT2 through cell-based high-throughput screening: an approach to prevent excitotoxicity. *Journal of Biomolecular Screening* 2010, 15(6), 653-662.
- Coulter DA, Eid T.** Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 2012, 60, 1215-1226
- Danbolt NC.** Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 2001, 65, 1-105.

- Dang W.** The controversial world of sirtuins. *Drug Discovery Today Technology* 2014, Haziran (12), 9-17.
- Davidoff AM.** Neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery* 2012, 21(1), 2-14.
- DeLorenzo RJ, Towne AR, Pellock JM, Ko D.** Status epilepticus in children, adults, and the elderly. *Epilepsia* 1992, 33, 15-25.
- Dong X-x, Wang Y, Qin Z-h.** Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica* 2009, 30, 379-387.
- Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC.** Adult epilepsy. *Lancet* 2006, 367, 1087-1100.
- Ezza H, Khadrawy Y.** Glutamate Excitotoxicity and Neurodegeneration. *Molecular and Genetic Medicine* 2014, 8, 4.
- Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R.** The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 1989, 244, 798-800.
- Farooqui T, Farooqui AA.** Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mechanisms of Ageing Development* 2009, 130, 203-15.
- Fernandez-Marcos PJ, Serrano M.** Sirt4: The Glutamine Gatekeeper. *Cancer Cell* 2013, 23(4), 427-428.
- Figiel M, Maucher T, Rozyczka J, Bayatti N, Engele J.** Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Experimental Neurology* 2003, 183(1), 124-135.
- Friedman LK.** Calcium: a role for neuroprotection and sustained adaptation. *Molecular Interventions* 2006, 6, 315-29.
- Gözen O.** Glutamat Taşıyıcısı EAAT2'nin Transkripsiyonu ve Regülasyonunun Kontrolü, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2008, 103.
- Greenamyre JT, Porter RHP.** Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 1984, 44 (8), 7-13.
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM.** SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells. *Cell* 2006, 941-954.
- Heath PR, Shaw PJ.** Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2002, 26, 438-458.
- Ho L, Titus AS, Banerjee KK.** SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging* 2013, 5(11).
- Jacobs MP, Leblanc GG, Brooks-Kayal A, Jensen FE, Lowenstein DH, Noebels JL, Spencer DD, Swann JW.** Curing epilepsy: Progress and future directions. *Epilepsy Behavior* 2009, 14, 438-445.

Jeong SM, Xiao C, Finley LWS, Lahusen T. SIRT4 has tumor suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell* 2013, 23(4), 450-463.

Jing E, Emanuelli B, Hirschey MD, Boucher J, Lee KY, Lombard D, Verdin EM, Kahn CR. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108, 14608-13.

José M, Alcain V, Alcaín FJ. Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors* 2012, 38(5), 349-359.

Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Developments* 1999, 13, 2570-2580.

Kanai Y, Hediger MA. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *European Journal of Pharmacology* 2003, 479, 237-247.

Kembhavi SA, Shah S, Rangarajan V, Qureshi S, Popat P, Kurkure P. Imaging in neuroblastoma: An update. *Indian Journal and Radiology Imaging* 2015, 25(2), 129-136.

Kim K, Lee SG, Kegelman TP, ZZ Su, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB. Role of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT2) and Glutamate in Neurodegeneration: Opportunities for Developing Novel Therapeutics. *Journal of Cellular Physiology* 2011, 2484-2493.

Knake, S, Hamer HM, Rosenow F. Status epilepticus: A critical review. *Epilepsy Behavior* 2009, 15, 10-14.

Kouzarides T: Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO* 2000, 19, 1176-1179.

Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. Researching glutamat-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective/analysis/study. *Frontiers in cellular neuroscience* 2015, 9, 91.

Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97, 5807-5811.

Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archive European Journal of Physiology* 2010, 460, 525-542.

- Laurent G, de Boer VCJ, Finley LWS.** SIRT4 Represses Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Activity To Suppress Hepatic Fat Oxidation. *Molecular and Cellular Biology* 2013, 33(22), 4552-4561 (a)
- Laurent G, German NJ, Saha AK.** SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Molecular Cell* 2013, 50(5), 686-698.(b)
- Lévesque M, Avoli M.** The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2013, 37(10), 2887-2899.
- Lewerenz J, Maher P.** Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases: What is the evidence?. *Frontiers in Neuroscience* 2015, 9, 469.
- Lin C-LG, Kong Q, Cuny GD, Glicksman MA.** Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Future Medicinal Chemistry* 2012, 4(13), 1689-1700.
- Lipton SA, Rosenberg PA.** Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine* 1994, 330, 613-622.
- Lu M-O, Zhang X-M, Mix E.** TNF- α receptor 1 deficiency enhances kainic acid-induced hippocampal injury in mice. *Journal of Neuroscience Research* 2008, 1608-1614.
- Maguire J.** Epileptogenesis: More Than Just the Latent Period. *Epilepsy Currents* 2016, 16(1), 31-33.
- McGuinness D, McGuinness DH, McCaul JA, Shiels PG.** Sirtuins, Bioageing, and Cancer. *Journal of Aging Research* 2011.
- Michan S, Sinclair D.** Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochemical Journal* 2007, 404(1), 1-13.
- Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG.** Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxidants Redox Signal* 2007, 9, 1471-84.
- Murakami S, Takemoto T, Shimizu S.** Studies on the effective principles of *Diogenea simplex* Aq. I Separation of the effective fraction by liquid chromatography. *The Pharmaceutical Society of Japan* 1953, 73, 1026-1028.
- North BJ, Verdin E.** Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases, *Genome Biology* 2004, 5-224.
- Ottersen OP, Laake JH, Reichelt W, Haug FM, Torp R.** Ischemic disruption of glutamate homeostasis in brain: quantitative immunocytochemical analyses. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 1996, 12, 1-14.

Rao MS, Hattiangady B, Reddy DS, Shetty AK. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Research* 2006, 83, 1088-1105.

Reddy DS, Kuruba R. Experimental Models of Status Epilepticus and Neuronal Injury for Evaluation of Therapeutic Interventions. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14, 18284-18318.

Rothstein JD, Patel S, Regan MR. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2005, 433(7021), 73-77.

Sairazi NSM, Sirajudeen KNS, Asari MA, Muzaimi M, Mummedy S, Sulaiman SA. Kainic Acid-Induced Excitotoxicity Experimental Model: Protective Merits of Natural Products and Plant Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015.

Salinska E, Danysz W, Lazarewicz JW. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathology* 2005, 43(4), 322-339

Schousboe A, Hertz L. Role of astroglial cells in glutamate homeostasis. *Advances in biochemical psychopharmacology* 1981, 27, 103-113.

Sheldon AL, Robinson MB. The Role of Glutamate Transporters in Neurodegenerative Diseases and Potential Opportunities for Intervention. *Neurochemistry International* 2007, 51(6-7), 333-355.

Spooren W, Lesage A, Lavreysen H, Gasparini F, Steckler T. Metabotropic glutamate receptors: their therapeutic potential in anxiety. *Current Topics in Behavioural Neurosciences* 2010, 2, 391-413.

Storm-Mathisen J, Danbolt NC, Rothe F. Ultrastructural immunocytochemical observations on the localization, metabolism and transport of glutamate in normal and ischemic brain tissue. *Progress in Brain Research* 1992, 94, 225-241.

Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y. Persistent CREB phosphorylation with protection of hippocampal CA1 pyramidal neurons following temporary occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Experimental Neurology* 2000, 161, 462-471.

Tian G, Lai L, Guo H, Lin Y, Butchmach MH, Chang Y, Lin CL. Translational control of glial glutamate transporter EAAT2 expression. *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282(3), 1727-1737.

Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 2009, 158(1), 309-323.

WEB_1.(2019). Public Health England. <https://www.phe-culturecollections.org.uk>. (29.11.2019)

Wong PC, Cai H, Borchelt DR, Price DL. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience* 2002, 5, 633-9.

Xing X, Chang LC, Kong Q. Structure-activity relationship study of pyridazine derivatives as glutamate transporter EAAT2 activators. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2011, 21(19), 5774-5777.

Yalcin G. Sirtuins and Neurodegeneration. *Neurology Neuromed* 2018, 3(1), 13-20

Yıldırım A. Deneysel sipinal kord travmasında glukojen sentez kinaz inhibitörü3 inhibitörü AR-A014418' in nöroprotektif etkilerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul 2009, 103.

Zeleniaia O, Schlag BD, Gochenauer GE. Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Molecular Pharmacology* 2000, 57(4), 667-678.

Zhang X-M, Duan R-S, Chen Z. IL-18 deficiency aggravates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in C57BL/6 mice due to an overcompensation by IL-12. *Experimental Neurology* 2007, 64-73.

Zhang X-M, Zhu J. Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines. *Current Neuropharmacology* 2011, 9, 388-398

Zheng X-y, Zhang H-L, Luo Q, Zhu J. Kainic Acid-Induced Neurodegenerative Model: Potentials and Limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 24.

Zhu Y, Yan Y, Principe DR, Zou X, Vassilopoulos A, Gius D. SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial tumor suppressor proteins that connect mitochondrial metabolism and carcinogenesis. *Cancer & Metabolism* 2014, 2-15.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ÇOLAK Merve
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Ankara / 20.11.1993
E-mail : mervecolakmerve@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	2020
Lisans	Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2016

BURSLAR ve ÖDÜLLER

“Hücrel Eksitotoksisite Modelinde SIRT4’ün Korucuyu Etkisinin Araştırılması” adlı ve 118S780 numaralı TÜBİTAK projesi için bursiyer olundu.

AKADEMİK YAYINLAR

1. PROJELER

“Hücrel Eksitotoksisite Modelinde SIRT4’ün Korucuyu Etkisinin Araştırılması” adlı ve 118S780 numaralı TÜBİTAK projesinde bursiyer olarak çalışıldı.