

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ HASTALARININ
FİBROBLAST KÜLTÜRLERİNDE MİKROTÜBÜL
STABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pelin ZOBAROĞLU

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2020**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ HASTALARININ
FİBROBLAST KÜLTÜRLERİNDE MİKROTÜBÜL
STABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pelin ZOBAROĞLU

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğretim Üyesi Gamze BORA**

**ANKARA
2020**

ONAY SAYFASI



YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

01 /08/2020



Pelin ZOBAROĞLU

1

¹"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğretim Üyesi Gamze BORA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.


Pelin ZOBAROĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgisi ile bana yol gösteren, cesaret veren ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gamze BORA'ya, her konuda bana fikirleri ile ışık tutan hocam Prof. Dr. Hayat YURTER'e,

Tez çalışmamı okuyarak değerli yorumlarını benimle paylaşan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'na, Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ'a, Doç. Dr. Burcu Balcı HAYTA'ya ve Doç. Dr. Çağdaş Devrim SON'a,

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve tez çalışmam süresince bana katkıda bulunan tüm hocalarıma, sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman bana destek olan, eğitimim için her türlü fedakarlığı gösteren ve bana yardımcı olmak için ellerinden gelen her şeyi yapan canım anneme, babama ve biricik ablama,

Sevgisi ve anlayışıyla benden desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan Uğur ÖZER'e,

En içten duygularla teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2019-18351).

ÖZET

Zobaroğlu, P., Spinal Müsküler Atrofi Hastalarının Fibroblast Kültürlerinde Mikrotübül Stabilitesinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2020. Spinal müsküler atrofi (SMA) motor nöron kaybı ve kas atrofisi ile karakterize olan, çoğunlukla çocukları etkileyen nörodejeneratif bir hastalıktır. SMA, *Survival of motor neuron 1 (SMN1)* genindeki mutasyonlardan dolayı ortaya çıkmakta ve bu genin ürünü olan SMN proteini fonksiyon gösterememektedir. SMN eksikliğinde hücre iskeleti elemanlarından mikrotübüllerin polimerizasyonunda ve mimarisinde değişiklikler gösterilmişse de mekanizması detaylı olarak açıklanmamıştır. Anabilim Dalı'mızda *in-vitro* SMA modeli ile gerçekleştirilen önceki çalışmalarda mikrotübül stabilitesinin azaldığı gösterilmiş, ancak hastalara ait örneklerde çalışılmamıştır. Bu tez çalışmasında, farklı ciddiyetteki SMA hastalarına ait primer fibroblast hücrelerinde mikrotübül stabilitesi ilk kez araştırılmıştır. Bu amaçla stabilite belirteçleri olan α -tübülün post-translasyonel modifikasyonlarından asetilasyon ve detirozinasyon analiz edilmiş, Western blot sonuçları ciddi seyirli tip I hasta hücrelerinde asetil α -tübülün miktarının kontrole göre anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir. İmmüno floresan boyama çalışmaları, asetillenmiş mikrotübüllerin çekirdek etrafında yoğunlaştığını göstermiş, Western blot bulgularını destekler şekilde asetil α -tübülünün floresan şiddetinde de azalma saptanmıştır. Ayrıca, asetillenmiş stabil mikrotübül ağ yapısının tip I hastalarda kontrole göre bozulduğu gösterilmiştir. Saptanan bu değişikliklerin mikrotübüllerin morfolojisine ve fonksiyonlarına etki edebileceği düşünülmüştür. Morfometrik analizler, özellikle tip I hastasına ait hücrelerin en, boy ve alan açısından kontrole göre küçük olduğunu göstermiştir. MTS yöntemi ile gerçekleştirilen proliferasyon analizlerinde, hasta hücrelerin kontrole göre daha hızlı proliferasyon gösterdikleri saptanmıştır. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde özellikle SMA tip I hasta hücrelerinde mikrotübül stabilitesinin azaldığı sonucuna varılmıştır. İlerleyen çalışmalarda, bu kaybın fonksiyonel sonuçlarının araştırılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Spinal müsküler atrofi, SMN, mikrotübül stabilitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2019-18351).

ABSTRACT

Zobaroğlu, P., Investigation of Microtubule Stability in Fibroblast Cultures of Spinal Muscular Atrophy Patients, Hacettepe University Graduate School of Health Science, Master Thesis of Medical Biology Programme, Ankara, 2020.

Spinal muscular atrophy (SMA), which is characterized by motor neuron loss and muscle atrophy, is a neurodegenerative disease primarily in childhood. In SMA, *Survival of motor neuron 1 (SMN1)* gene mutations lead to the absence of functional SMN protein. SMN deficiency causes dysregulations in microtubule cytoskeleton in terms of polymerization and architecture, however, molecular mechanisms have not been clearly described. Previously, we showed reduced microtubule stability in an *in-vitro* SMA model, however, it has not been investigated in SMA patient samples so far. In this thesis, microtubule stability was investigated in fibroblast cells of SMA patients. For this purpose, we analyzed acetylated and detyrosinated α tubulin levels as stability markers in clinically different SMA patients. Western blot studies demonstrated a significant reduction in acetylated α tubulin level in SMA type I cells compared to controls. Similarly, immunofluorescence analysis also showed a reduction in the fluorescence intensity of acetylated α tubulin levels in patient cells. Additionally, the acetylated stable microtubule network has been shown to be impaired in type I patients cells. Considering that these alterations may affect cellular morphology and microtubule functions, detailed morphometric analyses were performed. Our results showed that patient cells, especially type I, were smaller both in width, height and area than controls. Besides, cell proliferation rates of patient cells were found to be increased compared to controls by MTS assay. In the light of all findings, it was concluded that the microtubule stability is reduced, especially in SMA type I patient cells. Functional consequences of reduced microtubule stability in SMA should be addressed in further studies.

Key words: Spinal muscular atrophy, SMN, microtubule stability

This thesis, was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TYL-2019-18351).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre İskeleti	3
2.2. Mikrotübül İskeleti	5
2.2.1. Mikrotübül Yapı ve Organizasyonu	5
2.2.2. Post-translasyonel Modifikasyonları	10
2.2.3. Mikrotübül ile İlişkili Proteinler	14
2.3. Mikrotübül Hataları ve Nörodejeneratif Hastalıklar	15
2.4. Spinal Müsküler Atrofi (SMA)	16
2.4.1. Moleküler Genetik Özellikleri	17
2.4.2. SMN Proteini ve Fonksiyonları	19
2.5. SMA'da Mikrotübül Hataları	21

3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER	24
3.1. GEREÇLER	24
3.1.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	24
3.1.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	25
3.1.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroföresi ve Western Blot	26
3.1.4. İmmünfloresan Boyama ve Kantitatif Mikroskopi	31
3.2. YÖNTEMLER	33
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	33
3.2.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	37
3.2.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroföresi ve Western Blot	39
3.2.4. İmmünfloresan Boyama ve Kantitatif Mikroskopi	41
3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	45
4.BULGULAR	46
4.1. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Primer Fibroblast Hücrelerinde α -Tübülün Proteinlerinin Asetilasyon ve Detirozinasyon Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Analizi	46
4.2. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Primer Fibroblast Hücrelerinde İmmünfloresan Boyama ve Kantitatif Mikroskopi Analizleri	49
4.3. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Primer Fibroblast Hücrelerinde Morfometrik Analizler	53
4.4. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Primer Fibroblast Hücrelerinin Proliferasyon Hızlarının MTS Yöntemi ile Analizi	58
5.TARTIŞMA	60
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
6.1. Sonuçlar	66
6.2. Öneriler	69

7.KAYNAKLAR

71

8.EKLER

EK1- Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul izni

EK2- Tez Orjinallik Raporu

EK3- Dijital Makbuz

9.ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
+TIP	Mikrotübül pozitif uç proteinleri
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µm²	Mikrometre kare
°C	Derece santigrat
AF488	<i>Alexa Fluor 488</i>
APS	Amonyum persülfat
ATCC	<i>American Type Cell Culture Collection</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Sığır serum albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CLASP2	<i>CLIP-associated protein 2</i>
CLIP-170	<i>Cytoplasmic linker protein 170</i>
CO₂	Karbondioksit
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dH₂O	Distile su
dk	Dakika
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i>

DMSO	Dimetil sülfoksit
EB	<i>End Binding Protein</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetikası
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
ESS	<i>Exonic splicing silencer</i>
FBS	Fetal sığır serumu
g	Gram
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HDAC	Histon deasetilaz
HRP	<i>Horseradish</i> peroksidaz
kDa	Kilo dalton
KO	<i>Knockout</i>
MAP	<i>Microtubule associated protein</i>
MAP2	<i>Microtubule associated protein 2</i>
MAP6	<i>Microtubule associated protein 6</i>
MAP1B	<i>Microtubule associated protein 1B</i>
MgCl₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i>
NaCl	Sodyum klorür
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

PFA	Paraformaldehit
RNAi	RNA interferans
SDS	Sodyum dodesil sülfat
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
SMA	Spinal Müsküler Atrofi
SMN	<i>Survival of motor neuron protein</i>
SMN1	<i>Survival of motor neuron 1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween20</i>
TEMED	N,N,N,N' Tetrametilendiamin
TTL	<i>Tubulin tyrosine ligase</i>
WB	Western Blot
α-tübülün	Alfa tübülün
αTAT1	<i>Alpha tubulin acetyltransferase 1</i>
β-tübülün	Beta tübülün
γ-tübülün	Gamma tübülün

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Hücre iskeletini oluşturan filamentlerin ve filament yapılarını oluşturan proteinlerin şematik gösterimi.	4
2.2. Mikrotübül yapısı ve organizasyonu, dinamik kararsızlığın şematik gösterimi.	6
2.3. Mikrotübüllerin fibroblast ve nöron hücrelerindeki yerleşimlerinin şematik gösterimi.	7
2.4. Stabil ve dinamik mikrotübüle bağlanan proteinler.	8
2.5. Tübülün proteinlerinde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlar	10
2.6. Tübülün post-translasyonel modifikasyonlarının nöron ve hücre döngüsünün farklı evrelerindeki fibroblast hücrelerindeki dağılımı.	11
2.7. Tübülün asetilasyonu ve deasetilasyonunda görev alan enzimler.	13
2.8. Tübülün tirozinasyon ve detirozinasyonunda ve görevli enzimler.	14
2.9. <i>SMN1</i> ve <i>SMN2</i> genleri arasındaki farklılık ve <i>SMN2</i> 'deki <i>splicing</i> hatasının şematik gösterimi.	18
2.10. SMN proteini fonksiyonlarının şematik gösterimi.	21
3.1. SMA ve kontrol primer fibroblast hücrelerinde morfolojik analizler için hazırlanan deney planının şematik gösterimi ve ölçüm bölgelerini belirten örnek fotoğraflar.	36
3.2. Floresan şiddet analizleri için belirlenen sabit alana ait örnek fotoğraflar	42
3.3. Sholl analizleri için <i>threshold</i> belirlenmiş ve konsantrik halka çizilmiş hücreye ait örnek fotoğraflar.	43
4.1. SMA ve kontrol primer fibroblast hücrelerinde α -tübülün asetilasyon düzeylerinin analizi.	46
4.2. SMA ve kontrol primer fibroblast hücrelerinde detirozin α -tübülün düzeylerinin analizi.	47

Şekil	Sayfa
4.3. Hasta ve kontrol hücrelerde asetil α -tübülin boyamalarına ait örnek fotoğraflar ve çekirdeğin etrafındaki ağ yapısının yakınlaştırılmış görüntüleri.	49
4.4. Hasta ve kontrol hücrelerin konfokal mikroskop ile çekilmiş görüntüleri.	50
4.5. SMA tip I hasta ve kontrol bireye (kontrol II) ait primer fibroblast hücrelerinde kantitatif mikroskopik analizler.	51
4.6. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinde tüm hücre alanı ölçüm bölgelerini gösteren yakınlaştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları.	54
4.7. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinde gövde alanı ölçüm bölgelerini gösteren yakınlaştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları.	55
4.8. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinin boy uzunluk ölçüm bölgelerini gösteren yakınlaştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları.	55
4.9. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinin en uzunluk ölçüm bölgelerini gösteren yakınlaştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları.	56
4.10. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinde boy/en (<i>axis ratio</i>) ölçüm bölgelerini gösteren yakınlaştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları.	56
4.11. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinin filopod uzunluğu ölçüm bölgelerini gösteren yakınlaştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları.	57
4.12. SMA ve kontrol primer fibroblast hücrelerinin proliferasyon hızlarına ait analiz sonuçları.	59

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Protein miktar tayininde standart eğri çizilmesi için kullanılan BSA konsantrasyonları.	37



1. GİRİŞ

Hücre iskeleti, protein filamentlerinin oluşturduğu ve hücre şeklinin belirlenmesinde, korunmasında, hücre hareketinde, hücre bölünmesinde, organel yerleşimlerinin belirlenmesinde ve hücre içi taşımada görev alan bir ağıdır. Bu ağ yapısal olarak mikrofilamentler, ara filamentler, septinler ve mikrotübüllerden oluşmaktadır. İskeletin en dinamik elemanı olan mikrotübüller, alfa (α) ve beta (β) tübülün proteinlerinin polimerizasyonu ile oluşan içi boş, silindirik ve 25 nm çapında polimerlerdir. Mikrotübüller depolimerizasyon ile kısalmakta polimerizasyon ile uzamaktadır. Hücreler, dinamik kararsızlık (*instabilite*) adı verilen bu mekanizma ile mikrotübüllerini yeniden yapılandırmaktadır. Mikrotübül yapısında, polimerizasyon ve depolimerizasyon olaylarının hızlı gerçekleştiği dinamik kısımlar ile daha yavaş gerçekleştiği stabil kısımlar bulunmaktadır. Mikrotübüllerdeki stabil ve dinamik kısımların oranları hücre tiplerine göre farklılık göstermekte; bölünen hücrelerde dinamik kısımlar fazla iken nöron gibi bölünmesini durdurmuş hücrelerde stabil mikrotübül kısımları fazlalık göstermektedir. Bu hücrelerde stabil yapının devamlılığının sağlanması, özellikle hücre morfolojisinin korunması, akson ve dendritlerdeki veziküler transport ve sinyal iletimi açısından önemlidir. Yapısal veya fonksiyonel olarak ilerleyici nöron kaybı ile karakterize olan nörodejeneratif hastalıklardan, farklı etiyolojilere sahip olan Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Parkinson, Huntington, Alzheimer, Herediter spastik parapleji ve Alt Ekstremitte Baskın 2 ile Spinal Müsküler Atrofi (SMALED2) hastalıklarında mikrotübül stabilitesinin bozulduğu gösterilmiş olup hücre morfolojisi ve aksonal transport hataları ile ilişkilendirilmiştir.

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan ve otozomal resesif kalıtılan proksimal Spinal müsküler atrofi (SMA)'de, omurilikte alfa motor nöron kaybı ve kas atrofisi görülmektedir. SMA hastalarının %90-94'ünde, *Survival of motor neuron 1* (*SMN1*) geninin 7 ve 8. eksonlarında homozigot delesyonlar saptanmakta; hücrelerde çekirdekte ve sitoplazmada yerleşen SMN proteini yıkılarak işlevini yitirmektedir. SMA hastalığı ile yapılan araştırmalarda, SMN proteini eksikliğinde, nöron morfolojisinin, akson dallanmasının ve aksonal transportun bozulduğu gösterilmiş ve bu hatalar hücre iskeleti elemanları ile ilişkilendirilmiştir. SMN eksikliğinde aktin ve nörofilamentlerde görülen hataların yanı sıra *in-vitro* ve *in-vivo*

modeller ile yapılan çalışmalarda mikrotübül mimarisi ve polimerizasyonundaki değişiklikler gösterilmiş, ancak altında yatan moleküler mekanizmalar detaylı olarak açıklanmamıştır.

Anabilim Dalı'mızda SMA hastalığının moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik temel araştırmalar yürütülmektedir. SMA hastalığının *in-vitro* ve *in-vivo* modelleriyle yaptığımız önceki çalışmalarda, SMN eksikliğinde mikrotübül stabilitesini düzenleyen MAP1B, MAP2 ve EB3 proteinlerinin ifade ya da post-translasyonel modifikasyon değişiklikleri saptanmıştır. Ayrıca, α -tübülün asetilasyonu ve detirozinasyonunda da anlamlı değişiklikler saptanarak mikrotübül stabilitesinin azaldığı gösterilmiştir. Önceki çalışmalarımızda SMN eksikliğinde saptanan bu hatalar, *in-vitro* ve *in-vivo* SMA modellerinde gösterilmiş olup hastalara ait örneklerde mikrotübül stabilitesi üzerine bir araştırma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, hastalığı ciddi ve hafif seyreden iki SMA hastasına (tip I ve II) ait primer fibroblast hücrelerinde mikrotübül stabilitesi ilk kez araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre iskeleti

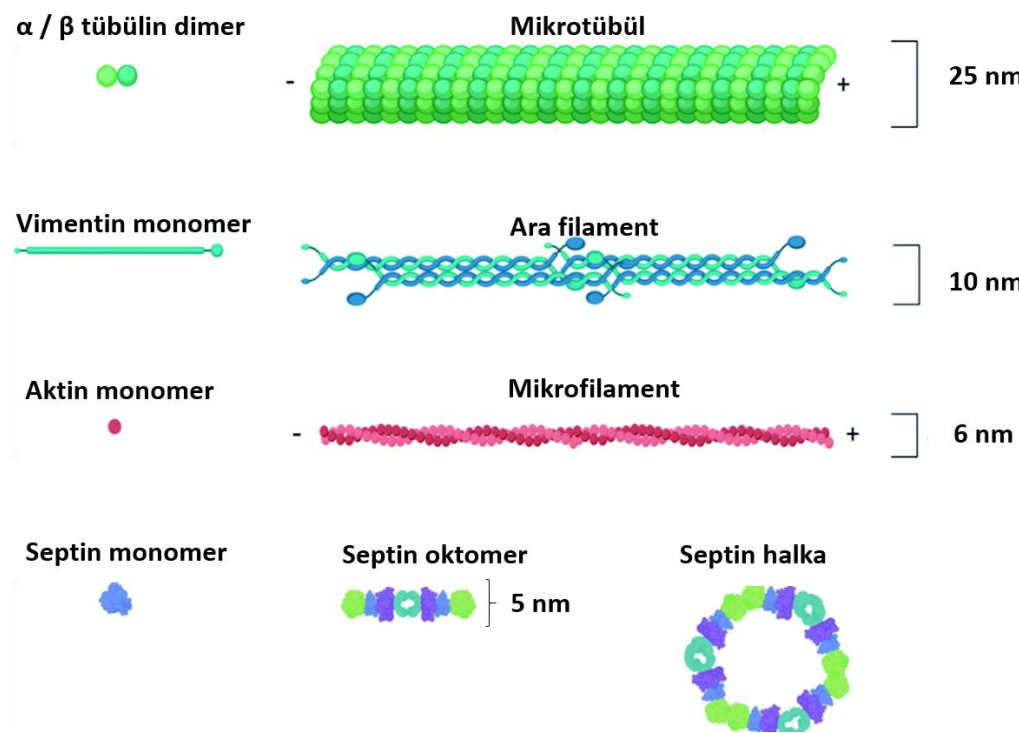
Hücre iskeleti, ökaryotik hücrelere şekil ve destek veren, organellerin yerleşimi ve morfolojilerinin korunmasında, ayrıca vezikül ve biyomoleküllerin hücre içinde taşınmasında görev alarak hücre içi organizasyonu sağlayan ve hücre bölünmesinde görev alan bir protein ağıdır. Bu ağ, yapısal ve işlevsel olarak farklı olan 3 temel filamentten; mikrofilamentler, ara filamentler ve mikrotübüllerden oluşmaktadır (1). Son yıllarda septinler de hücre iskeleti elemanları arasına dahil edilmektedir (Şekil 2.1.) (2). Hücre iskeletini oluşturan bu filamentler birbirinden bağımsız olmayıp, proteinler aracılığıyla birbirlerine bağlanarak hücre içerisinde kesintisiz bir ağ yapısı oluşturmaktadır. Ayrıca ilişkide oldukları proteinler ve sinyal yolları aracılığıyla hem yapıları hem de fonksiyonları düzenlenmektedir.

Mikrofilamentler hücre iskeletinin en ince filamenti olup çapı 5-7 nm arasındadır. Aktin proteinlerinden oluşan mikrofilamentler hücrenin toplam proteinlerinin yaklaşık %5'ini oluşturur. Globüler G aktin monomerlerinin bir araya gelmesiyle filament yapısı oluşmaktadır. Dinamik ve esnek yapıda olan mikrofilamentler oluşturdukları ağ sayesinde, kas kasılmasında, hücrelerin bölünmesinde ve göç etmesinde görev alır (3).

Ara filamentler, en sağlam ve kararlı hücre iskeleti elemanları olup çapı 8-10 nm arasındadır. Farklı hücrelerde ara filamentleri oluşturan 70'den fazla protein bulunmaktadır. Birbirlerine benzer olmayan protein iplik yapılarının birbiri üzerine sarılmasıyla oluşur ve diğer filamentler gibi polariteleri bulunmaz. Sitoplazmik ara filamentler mekanik strese karşı hücrelere destek sağlamakta, ayrıca hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks bağlantılarının kurulmasında görev almaktadır. Çekirdekte yer alan ara filamentler ise çekirdeğe destek sağlayarak kromozomlara tutunma yeri oluşturmaktadır (4).

Septinler, hücrelerde ağısı ve halkasal yapılar oluşturan hetero-oligomerik proteinlerdir. Farklı septin proteinlerinin oluşturduğu kompleksler filament yapısını oluşturmaktadır. Sitokinezde, hücre göçünde ve membran kompartmanlarının oluşturulması gibi hücresel süreçlerde görev aldıkları gösterilmiştir (2).

Mikrotübüller ise hücre iskeletinin en büyük, aynı zamanda en dinamik filamentidir. Alfa (α) ve beta (β) tübülün proteinlerinin polimerizasyonu sonucu oluşan içi boş, silindirik ve 25 nm çapında polimerlerdir. Sitoplazmayı bir ağ gibi saran mikrotübüllerin temel görevleri hücrenin yapısının/morfolojisinin korunması, hücre içinde makromoleküllerin (RNA, protein, vezikül vb) ve organellerin transportunun sağlanması, organellerin yerleşimlerinin belirlenmesi ve hücre bölünmesi sırasında kromozomların hareketinin sağlanmasıdır. Ayrıca hücre göçünde ve farklılaşmasında da görev almaktadırlar. Mikrotübüller hücre döngüsünün evresine, hücre tipine ve farklılaşma aşamasına göre yapısal olarak düzenlenmeler geçirmekte ve hücrenin biyolojik fonksiyonlarını etkilemektedir. Özellikle özelleşmiş morfolojiye sahip olan nöron hücrelerinde mikrotübül iskeleti, akson ve dendritlerde makromolekül, vezikül ve organel transportunun gerçekleşmesi ve sinyal iletiminin sağlanması açısından önemlidir (5, 6).



Şekil.2.1. Hücre iskeletini oluşturan filamentlerin ve filament yapılarını oluşturan proteinlerin şematik gösterimi .

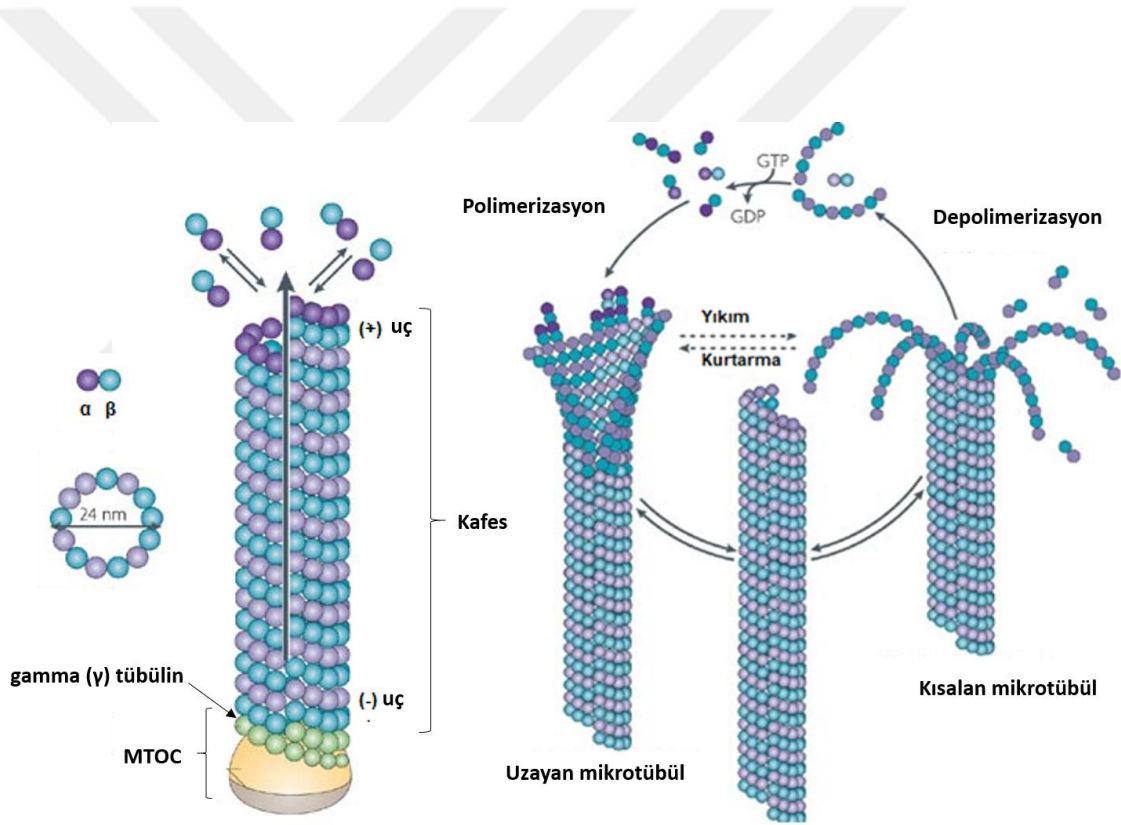
2.2. Mikrotübül iskeleti

2.2.1. Mikrotübül Yapı ve Organizasyonu

Mikrotübüller α ve β tübülün dimerlerinden oluşan polimerlerdir. Memelilerde 9 adet α ve 9 adet β tübülün geni tanımlanmıştır. Bu genlerin kodladığı tübülün proteinleri 55 kDa moleküler ağırlığında olup yüksek oranda korunmuştur. Bu tübülün izotipleri karboksil ucundaki birkaç amino asit açısından farklılık göstermektedirler. Tübülün proteinlerinin ifadeleri hücre ve doku tipine ayrıca gelişimsel döneme özgü olabilmektedir (5).

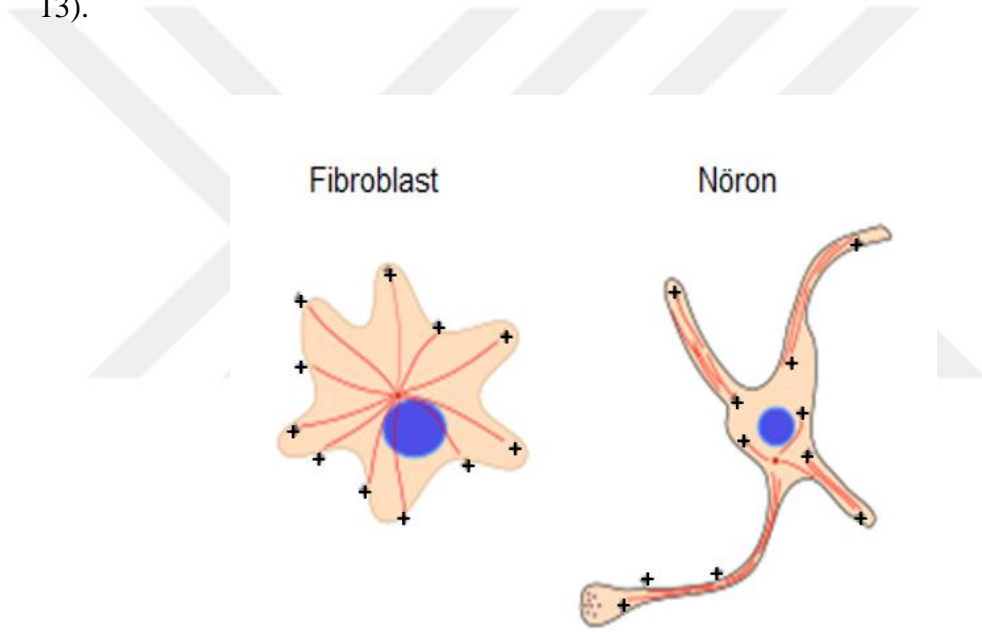
α ve β tübülün heterodimerleri belli bir yönde birbirleri ardına eklenerek protofilamentleri; 13 adet protofilament ise lateral etkileşerek mikrotübül yapısını meydana getirmektedir. Tübülün proteinlerinin birbiri ardına eklenmeleri mikrotübüllere polar özellik kazandırmakta, bir uçları negatif diğer uçları ise pozitif uç olarak adlandırılmaktadır. Mikrotübülde α -tübülün proteinleri negatif uç yönünde, β -tübülün proteinleri ise pozitif uç yönünde bulunmaktadır (Şekil 2.2.). Mikrotübüllerin negatif uçları, pozitif uçlara göre daha stabildir ve çeşitli hücre sel yapılarla bağlantılıdır. Ayrıca, mikrotübül organizasyon merkezine (MTOC) bağlı bulunmaktadır. MTOC, temel protein olarak gamma (γ) tübülün içeren protein kompleksleri tarafından kurulur ve mikrotübüllerin negatif uçlarını stabil hale getirerek mikrotübüllerin sayısını, polaritesini, miktarını, yönünü ve yerleşimini belirler. Birbirlerine üçerli bağlanmış dokuz adet mikrotübülün birleşmesi ile halkasal biçimde sıralanmış yapıya sentriyol adı verilmekte; bir çift sentriyolun birbirlerine dik olarak konumlanması ile sentrozom oluşmaktadır. MTOC gelişimi, sentriyollerin varlığı ile doğrudan bağlantılı olup hücre içerisinde sentriyoller kaybolduğunda, MTOC kaybolmakta ve mikrotübül oluşumu büyük oranda bozulmaktadır. Fibroblast hücreleri gibi bölünen hücrelerde çoğunlukla sentrozom MTOC olarak fonksiyon görmekle birlikte, mikrotübüllerin negatif uçlarının çekirdek zarına veya Golgi cisimciğine de bağlanarak MTOC görevi görebildiği bilinmektedir (7, 8, 9).

Tübülün heterodimerlerinin mikrotübüle eklenmesi ile polimerizasyon, ayrılması ile depolimerizasyon gerçekleşmektedir. Polimerize olan mikrotübüllerin depolimerize olması yıkım (*catastroph*), depolimerize olan mikrotübüllerin tekrar polimerize olması kurtarma (*rescue*) olarak adlandırılmaktadır. Dinamik kararsızlık (*instabilite*) olarak adlandırılan bu döngüsel düzenlenmede α ve β tübülün proteinlerinin birbirleriyle etkileşimleri ve GTP hidrolizi önemli rol oynamaktadır. GTP bağlı β tübülün (GTP- β tübülün) içeren heterodimerler, mikrotübülün uzayan ucuna bağlanıp mikrotübülün polimerizasyonunu sağlarken, hidroliz sonucu oluşan GDP bağlı β tübülün (GDP- β tübülün) kararsız olması nedeniyle depolimerizasyon ile mikrotübülden ayrılmaktadır (Şekil 2.2.) (10, 12).



Şekil.2.2. Mikrotübül yapısı ve organizasyonu, dinamik kararsızlığın şematik gösterimi (12'den uyarlanmıştır).

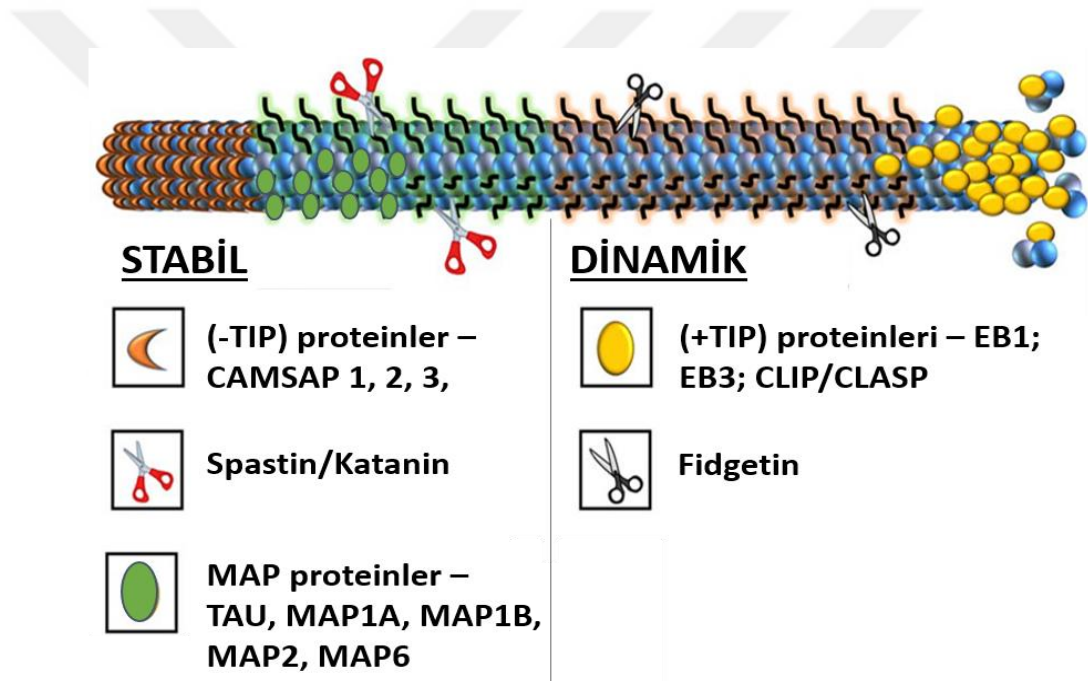
Mikrotübüllerin yerleşimleri hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Fibroblast gibi bölünen hücrelerde genel olarak radyal yerleşim göstermekte, negatif uçları sentrozoma bağlı bulunmaktadır. Nöron gibi bölünmesini durdurmuş hücrelerde ise mikrotübüller paralel veya antiparalel yerleşim gösterirler (11). Nöronlardaki mikrotübüller, hücre gövdesinde bulunan sentrozomdan çekirdeklenmekte (nükleasyon), daha sonra sentrozomdan serbest bırakılarak motor proteinler aracılığıyla akson ve dendritlere taşınmaktadır. Aksonal mikrotübüller, negatif uçları hücre gövdesine, pozitif uçları ise büyüme bölgesine doğru olacak şekilde yerleşim gösterir. Dendritlerde ise mikrotübüller çok yönlü bir organizasyona sahiptir, negatif ve pozitif uçları dağınık şekilde yerleşim gösterir (Şekil 2.3.) (11, 12, 13).



Şekil.2.3. Mikrotübüllerin fibroblast ve nöron hücrelerindeki yerleşimlerinin şematik gösterimi (11).

Mikrotübüllerin yapısal olarak stabil, dinamik ve soğukta stabil (*cold-stable*) kısımları bulunmakta olup oranları hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Fibroblastlarda bulunan mikrotübüllerin dinamik yapılarından dolayı *turnover* hızları fazladır ve hızlı bir şekilde polimerize/depolimerize olabilmektedir. Nöronlarda hücrelerinde ise, mikrotübüllerin stabil yapılarından dolayı *turnover* hızları yavaştır

ve daha uzun süre hücre içerisinde kalabilmektedirler. Dinamik mikrotübüllerin yarı ömürleri 5-10 dakika, stabil mikrotübüllerin ise 1-6,5 saat arasında olabilmektedir (9). Mikrotübüller, üzerlerine bağlanan proteinlerin yardımıyla stabil/dinamik yapılarını düzenlemektedir. Stabilitiyi arttıran düzenleyici proteinlerden bazıları; mikrotübül-asosiyasyon (MAP) proteinler (örneğin; TAU, MAP2, MAP1B), negatif uç stabilizasyonu sağlayarak depolimerizasyonu engelleyen negatif uç proteinler (-TIP) (örneğin; CAMSAP 1, 2, 3) ve yıkıcı proteinler (örneğin; katanin, spastin) olarak gruplandırılabilir. Dinamik yapıyı arttıran düzenleyici proteinlerden bazıları ise; pozitif uç proteinler (+TIP) (örneğin; EB1, 2, 3 ve CLIP170) ve yıkıcı proteinlerdir (örneğin; fidgetin) (Şekil 2.4.) (13, 14).



Şekil.2.4. Stabil ve dinamik mikrotübüle bağlanan proteinler (13'den uyarlanmıştır).

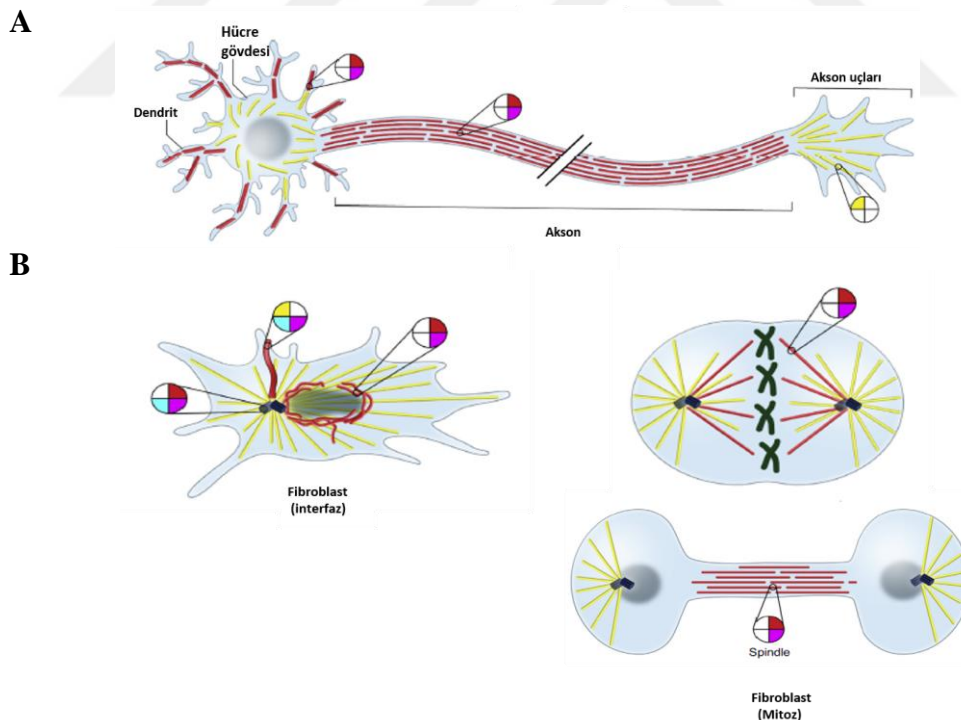
Mikrotübüllerin stabilitesi hücre tipine, hücre döngüsü evresine ve ayrıca hücredeki yerleşim yerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin fibroblastlarda bulunan mikrotübüller, nöronal mikrotübüllerden daha dinamik yapıdadır (9). Mitotik mikrotübüller ise, interfaz mikrotübüllerine göre 10-100 kat daha dinamiktir. Hücre bölünmesi esnasında kromozomların karşıt kutuplara doğru çekilmesinde

görev alan 3 farklı mitotik mikrotübül vardır. Bunlar astral, kinetokor ve interpolar mikrotübüller olarak adlandırılmaktadır. Kinetokor mikrotübüller, sentriyollerden merkeze doğru uzanıp kromozomlara tutunurlar ve mitotik kromozomları metafaz plağına doğru hareket ettirirler. Kromozom hareketini kolaylaştıran interpolar mikrotübüller birbirleriyle hücrenin ortasında etkileşerek sentrozomların pozisyonlarını belirler. Astral mikrotübüller ise sentrozomdan hücre zarına doğru uzanarak zar ile olan mesafeyi belirlerler. Fibroblast hücrelerinde, kinetokor mikrotübüller diğer mikrotübüllerden daha stabil yapıda olup sentrozom ve Golgi cisimciğine yakın bölgelerde yoğunlaşmakta, dinamik mikrotübüllerin aksine hücre periferinde nadiren yerleşim göstermektedir (8, 15). Nöronlarda ise aksonal mikrotübüller, hücre gövdesi ve büyüme bölgesindeki mikrotübüllerden daha stabil yapıdadır (16).

Mikrotübüllerin soğukta kararlı yapılarını koruyan soğuk-stabil (*cold-stabil*) kısımları bulunmaktadır. Düşük sıcaklık, memelilerde hücre tipine ve hücre içerisindeki mikrotübül popülasyonuna bağlı olarak farklı derecelerde mikrotübül depolimerizasyonuna neden olmaktadır. Bazı mikrotübüllerin soğukta kararlı olmasını sağlayan proteinler MAP6 (STOP) ve mikrotübül negatif/pozitif ucuna bağlanarak destabilize olmasını engelleyen +/- TIP proteinleridir. Nöronlarda, gliya hücrelerinde ve fibroblastlarda soğuğa karşı dayanıklı stabil mikrotübül ağ havuzları tanımlanmıştır. Bu hücrelerdeki stabilitenin kaynağının temel olarak MAP proteinlerinden biri olan MAP6 (STOP) proteini olduğu düşünülmektedir (17, 18 ,19, 20).

Mikrotübüllerin stabilitesinin korunmasında görevli proteinlerin mikrotübül ile interaksiyonlarında, tübülün proteinlerinde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlar etkili olmaktadır.

Nöronlarda mikrotübüllerin yerleşimleri, boyları ve stabiliteleri değişkenlik göstermektedir. Nöronal mikrotübüllerde poliaminasyon, poliglutamilasyon tipi modifikasyonların yanı sıra mikrotübül stabilitesi açısından önemli olan asetilasyon, detirozinasyon, delta2-tübülün modifikasyonları da sık görülmektedir. Bu modifikasyonların düzeyleri hem nöronal farklılaşma sırasında hem de nöron hücresinin farklı kısımlarında değişkenlik gösterir. Nöronların akson ve dendritlerinde asetilasyon ve detirozinasyon tipi modifikasyonların düzeyleri fazla iken, akson uçlarındaki büyüme bölgelerindeki mikrotübüller daha dinamik olup tirozinlenmiştir. Nöronlarda mikrotübül stabilitesi; akson ve dendrit morfolojilerinin oluşması, aksonal transport ve sinyal iletimi fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için gereklidir (24, 25). Fibroblast gibi bölünen hücrelerde interfazda sentriyol mikrotübülleri daha stabil iken hücre periferine doğru mikrotübüller daha dinamik olup tirozinlenmiştir. Hücre bölünmesi sırasında ise, stabil kinetokor ve interpoler mikrotübüller detirozinlenmiş ve asetilenmiş iken, hücre periferine doğru dinamik olan astral mikrotübüller tirozinlenmiştir (Şekil 2.6.) (26,46).



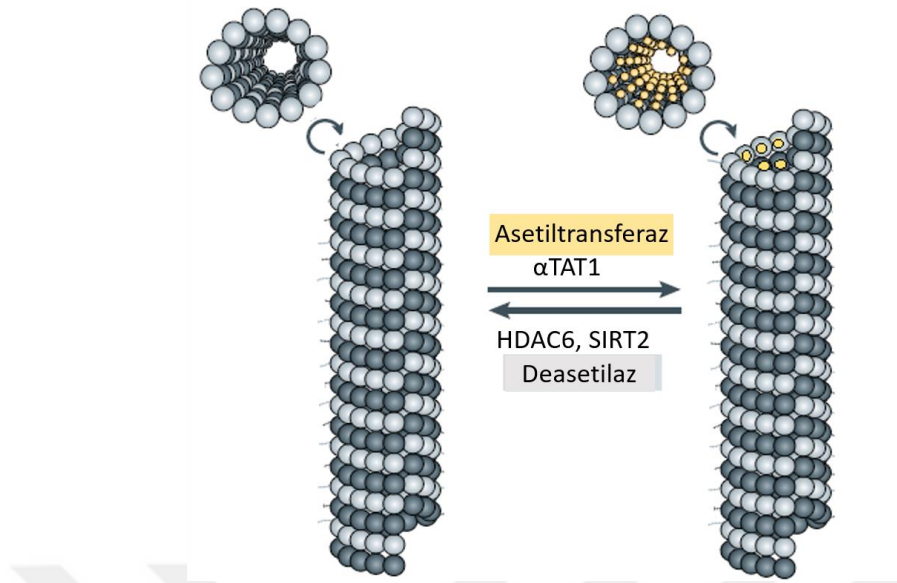
Şekil.2.6. Tübülün post-translasyonel modifikasyonlarının (A) nöron ve (B) hücre döngüsünün farklı evrelerindeki fibroblast hücrelerindeki dağılımı. Dinamik mikrotübüller sarı, stabil mikrotübüller kırmızı ile gösterilmiştir. Sarı; tirozinasyon, kırmızı; detirozinasyon, pembe; asetilasyon, mavi; glisilasyon (26).

Tübülün post-translasyonel modifikasyonları arasında üzerinde en çok çalışılanları α -tübülün asetilasyonu ve detirozinasyonudur. Bu modifikasyonların stabil ve uzun ömürlü mikrotübüllerde sık görüldüğü bildirilmiştir ve stabilite belirteçleri olarak kullanılmaktadır (22, 23, 27).

Tübülün asetilasyonu;

Tübülün asetilasyonu, α ve β tübülün proteinleri üzerinde gerçekleşen, evrimsel olarak korunmuş bir modifikasyon tipidir. Özellikle α -tübülün asetilasyonu mikrotübül yapısının düzenlenmesiyle ilgili olarak çok çalışılmaktadır. Mikrotübülün lümeninde, α -tübülün proteinin amino ucundaki 40. lizin (K40) amino asitinden gerçekleşen asetilasyon, α -tübülün asetil transferaz (α TAT1) enzimi tarafından katalizlenmektedir. α TAT1 hücrelerdeki temel tübülün transferaz olmakla birlikte lizin asetil transferazlardan bazılarının (örneğin; ELP3 ve ARD1) da bu aktiviteye sahip olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir (28). *In-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda, α TAT1 enziminin, mikrotübülün açık uçlarından veya mikrotübül kafesindeki kırılmaya bağlı oluşan iç boşluklardan girerek asetilasyonu katalizlediği gösterilmiştir (29). Tübülün asetilasyonu geri dönüşümlü bir modifikasyondur. Tübülün deasetilasyonunda histon deasetilaz enzimlerinden olan HDAC6, HDAC5 ve sirtuin 2 proteinleri görev almaktadır (Şekil 2.7.). Deasetilasyondan sorumlu temel enzim HDAC6 olmakla birlikte HDAC5'in periferal nöron hasarı durumunda, sirtuin 2'nin ise sadece perinükleer alanda yerleşen mikrotübüllerin deasetilasyonunu katalizlediği bildirilmiştir (30, 31).

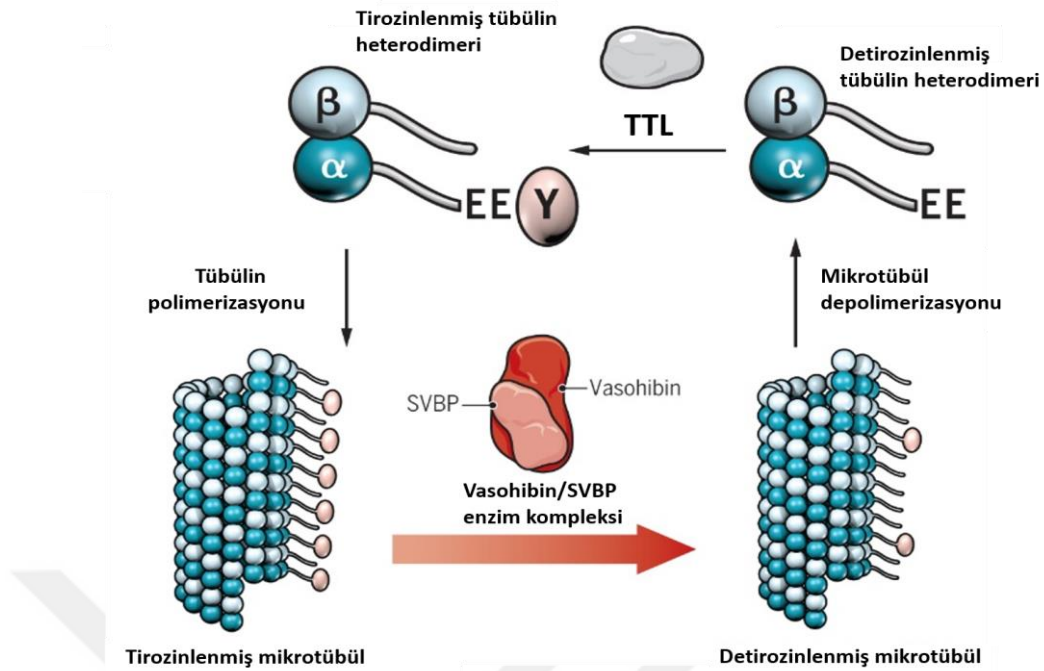
Asetilasyonun mikrotübülün fonksiyonları üzerine etkileri son yıllarda anlaşılmaya başlanmıştır. Stabil mikrotübüllerin asetilasyon düzeyleri dinamik mikrotübüllere oranla daha fazladır. Uzun ömürlü olan stabil mikrotübüllerde gerçekleşen mekanik strese bağlı kırılmaların α TAT1 enziminin mikrotübül lümenine girmesini kolaylaştırdığı ve bu nedenle asetilasyonun fazla görüldüğü bildirilmiştir (32). Bu nedenle asetilasyonun yapısal olarak mikrotübüllerin esnekliğini arttırarak hasara karşı koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca hücrelerde α tübülün asetilasyon düzeyindeki değişikliklerin hücre göçü, otofaji, hücre adhezyonu ve hücre içi transportu etkilediği bildirilmiştir (47).



Şekil.2.7. Tübülün asetilasyonu ve deasetilasyonunda görev alan enzimler (21).

Tübülün detirozinasyonu;

α -tübülün proteinlerinin (TUBA8 ve TUBA4A hariç) karboksil uçlarındaki tirozin amino asiti, polimerizasyon sonrasında Vasohibin/SVBP enzimleri tarafından kesilerek çıkartılmaktadır. Detirozinasyon adı verilen bu olay da asetilasyon gibi geri dönüşümlü olarak katalizlenmektedir. Mikrotübül depolimerizasyonu sonrasında tübülün tirozin ligaz (TTL) enzimi α -tübülün proteinlerine tekrar tirozin amino asitini eklemektedir. TTL enziminin α -tübülünü tirozinlediği bilinmekle birlikte β -tübülün ile de etkileşimi gösterilmiştir (Şekil 2.8.) (33, 34). Asetillenmiş α -tübüline benzer olarak; uzun ömürlü ve stabil mikrotübüllerde detirozinlenmiş α -tübülün, dinamik mikrotübüllerde ise tirozinlenmiş α -tübülün miktarının arttığı gösterilmiştir. Detirozinlenmiş mikrotübüllerin yarı ömrü tirozinlenmiş mikrotübüllerden daha fazladır (25, 26).



Şekil.2.8. Tübülün tirozinasyon ve detirozinasyonunda ve görevli enzimler (33).

2.2.3. Mikrotübül ile İlişkili Proteinler

Mikrotübül ile ilişkili proteinler, serbest tübüline ya da mikrotübüle bağlanarak mikrotübüllerin dinamik/stabil yapısını düzenlemekte, ayrıca farklı proteinler birbirlerinin mikrotübül ile etkileşimlerini kontrol etmektedir. Mikrotübüllerin yapısını, dolayısıyla fonksiyonunu düzenleyen proteinler; pozitif uç proteinleri (+TIP proteinleri, örneğin; EB1-3, CLASP, XMAP215, CLIP-170), negatif uç proteinleri (-TIP proteinleri, örneğin; BICD1, DSP), klasik mikrotübül asosiyasyon proteinleri (MAP proteinleri örneğin; TAU, MAP1B, MAP2, MAP6), mikrotübül motor proteinleri (örneğin; kinesin 1, dinein), yıkıcı proteinler (örneğin; spastin, katanin) ve mikrotübülü destabilize eden proteinler (örneğin; spastin, kinesin 8, 13) olarak gruplandırılmaktadır (8,12). Mikrotübül ile ilişkili proteinlerin ifadeleri hücre tipine ve gelişimsel döneme göre farklılık göstermektedir. Ayrıca, hücre içerisindeki yerleşimleri de farklı olabilmektedir. Örneğin, MAP protein ailesinden olan MAP1B sinir sisteminde ifade olmakta ancak fibroblast hücrelerinde ifadesi bulunmamaktadır. Nöronlarda ifade olan TAU proteini aksonlarda, MAP2 proteini

ise dendritlerde yerleşim göstermektedir (35, 36). Mikrotübül stabilitesinin korunmasında görevli MAP6, mikrotübül yapım-yıkım döngüsünün uzun olduğu nöronlarda mikrotübüllerle devamlı etkileşim içerisindeyken, döngünün kısa olduğu fibroblastlarda soğuk ortamda mikrotübüle bağlanarak stabilitenin korunmasını sağlamaktadır (19, 20). Ayrıca, poliglutamilasyon ve asetilasyon tipi post-translasyonel modifikasyona sahip mikrotübüllerin soğuğa karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir (48).

Mikrotübül ile ilişkili proteinlerin mikrotübül ile etkileşimleri post-translasyonel modifikasyonlarla düzenlenmekte olup bu etkileşimler mikrotübüllerin stabilitesinin kontrolünü açısından önemlidir. Örneğin; MAP1B'nin, GSK3 β kinaz tarafından fosforile edilmesiyle stabil olmayan mikrotübül miktarında artış saptanmıştır (37). Proteinlerin mikrotübüllerle etkileşimi, tübülün proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonları ile de düzenlenmektedir. Örneğin, nöronlarda aksonal mikrotübüllerin asetilasyonunun ve detirozinasyonunun, veziküllerin taşınmasını sağlayan kinezin 1 motor proteinlerinin mikrotübüle bağlanması için gerekli olduğu gösterilmiştir (39). Benzer şekilde kinezin 7 motor proteininin detirozinlenmiş mikrotübüllerle, kinezin 5 ve 13'ün ise tirozinlenmiş mikrotübüllerle etkileşiminin fazla olduğu bildirilmiştir (40).

2.3. Mikrotübül Hataları ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Mikrotübülün yapısı; tübülün proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlardan, mikrotübül ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan, ilişkili proteinlerdeki ifade/post-translasyonel modifikasyon değişikliklerinden veya tübülün proteinlerindeki post-translasyonel modifikasyon değişikliklerinden dolayı bozulabilmektedir.

Mikrotübül hataları, nöronlarda ilerleyici kayıp ve yapısal bozulma ile karakterize olan nörodejeneratif hastalıklarda gösterilmiştir. Farklı etiyojilere sahip olmakla birlikte Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında, Amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve Spinal müsküler atrofi (SMA)'de mikrotübül yapı ve fonksiyonlarında değişiklikler bildirilmiştir (14). Alzheimer hastalığında saptanan TAU

hiperfosforilasyonu nedeniyle TAU proteinlerinin mikrotübüle olan ilgisinin azaldığı, dolayısıyla mikrotübülün stabil yapısını koruyamadığı bildirilmiştir (38). Ailesel Parkinson hastalığına neden olan genlerden biri olan *PRKN*'deki mutasyonlar sonucu, hasta fibroblast hücrelerinde α -tübülün tirozinasyonunun arttığı ve mikrotübüllerin stabilitesinin azalıp dinamiklerinin arttığı gösterilmiştir (41, 42). ALS hastalığında ise sorumlu genlerden biri olan *RAPGEF2*'deki mutasyonlar sonucu sporadik hastalarının fibroblast hücrelerinde mikrotübül stabilitesinin azaldığı, mitokondri dağılımının hatalı gerçekleştirildiği saptanmıştır (43). Spinal müsküler atrofi tiplerinden biri olan SMALED2 (*lower extremity-predominant 2*, spinal müsküler atrofi) hastalığı, *BICD2* genindeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkmakta olup hasta fibroblast hücrelerinde asetil α -tübülünün miktarında artış saptanmış, mikrotübül stabilitesinin arttığı bildirilmiştir. Fare motor nöron kültüründe mutant protein aşırı ifade ettirildiğinde aksonlarda hatalı şekilde uzama ve dallanma artışı saptanmıştır (44). Mikrotübül hataları, *SMN1* geni mutasyonlarından kaynaklanan proksimal SMA hastalığına ait modellerde de saptanmıştır.

2.4. Spinal Müsküler Atrofi (SMA)

SMA omurilikte alfa motor nöron kaybı ve proksimal kas atrofisi ile karakterize olan, çoğunlukla yenidoğan ve çocukları etkileyen, otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. Nörodejeneratif ve nöromüsküler hastalık grupları içerisinde değerlendirilen SMA'nın taşıyıcı sıklığı 1/54, insidansı ise 1/6000-11000 canlı doğum olarak bildirilmiştir. Çocukluk çağı nöromüsküler hastalıklarından Duchenne Müsküler Distrofi (DMD)'den sonra ikinci sıklıkta görülmektedir (49)

SMA hastaları, çoğunlukla aynı tip mutasyonu taşımalarına rağmen, hastalık klinik olarak farklı ciddiyette seyretmektedir. SMA, Uluslararası SMA Konsorsiyumu kriterlerine göre, başlangıç yaşı ve motor fonksiyonlar dikkate alınarak 4 tip altında gruplandırılmaktadır (Tip I-IV). Hastalığın en ciddi formunda (SMA tip I), hastalık ilk 6 ayda belirtilerini göstermekte ve çocukluk çağında görülmektedir. Hastalar, genellikle solunum yetmezliği ve yutma güçlüğü nedeniyle doğumu takiben 2 yıl içerisinde kaybedilmektedir. Hastalığın ara formu olan tip II SMA'da bulgular 6-18 ay içerisinde ortaya çıkmakta, hastalar desteksiz

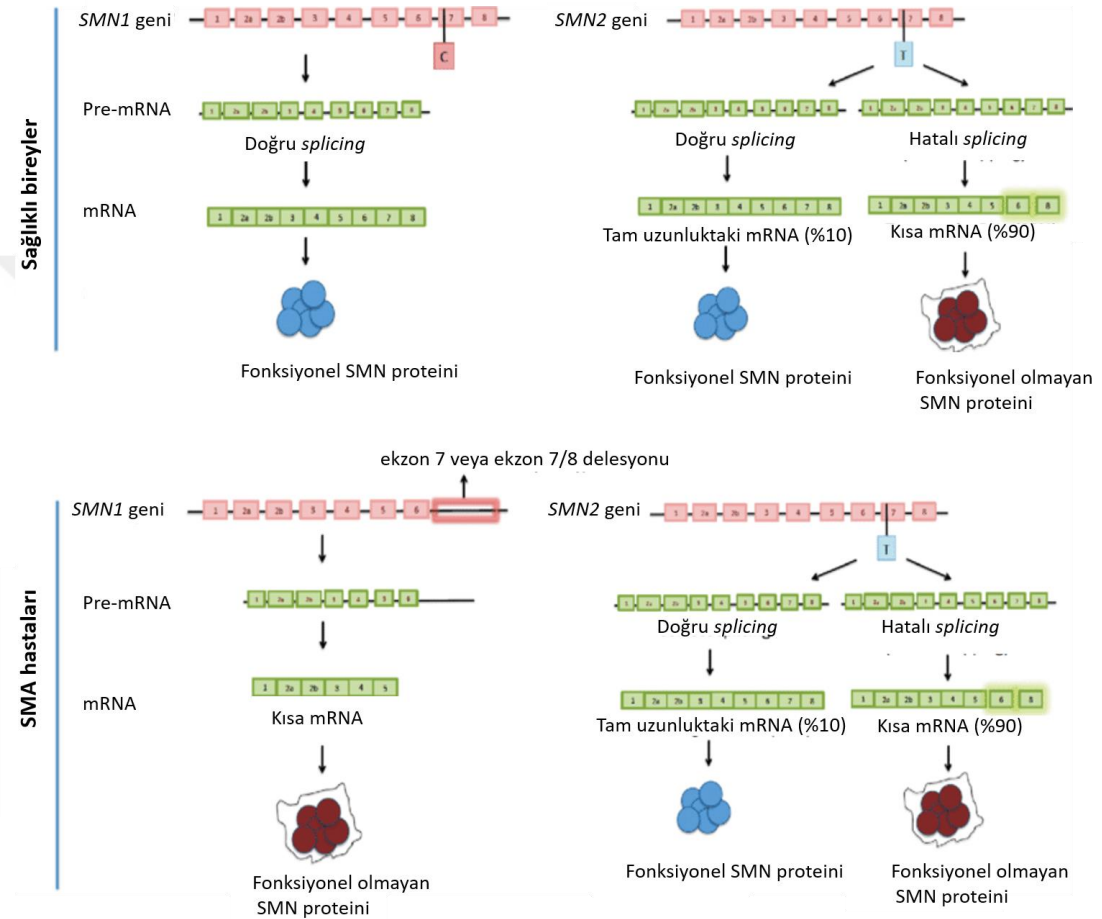
oturabilmekte ancak yürüyememektedir. 18 aydan sonra bulgu vermeye başlayan, hastalığın hafif formlarından biri tip III SMA' dır. Hastalar destek almadan yürüyebilmekte ancak ilerleyen dönemlerde tekerlekli sandalyeye bağlı kalmaktadır. Hastalığın en hafif formu olan tip IV, en az görülen tipi olup semptomlar erişkin dönemde, genellikle otuzlu yaşlarda görülmeye başlamakta ve hastalık yavaş ilerlemektedir (50, 51).

2.4.1. Moleküler Genetik Özellikleri

SMA, 5q11.2-13.3 kromozom bölgesinde yer alan *SMN1* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (52). Hastalarda çoğunlukla (%90-94) *SMN1* geninin 7. ve 8. eksonlarında homozigot delesyonlar görülmektedir. İnsan genomunda, 27 kb uzunlukta ve 9 eksondan (1, 2a, 2b, 3-8) oluşan *SMN1* geninin, *SMN2* olarak adlandırılan homolog bir kopyası bulunmaktadır. Kopyalar %99 oranında benzer olmakla birlikte 7. eksonun 6. pozisyonunda meydana gelen sitozin (C) timin (T) transisyonundan (C→T) dolayı, *SMN2* geninde kodlanan amino asit değişmemekte fakat transisyon bu bölgede *splicing*'in doğruluğunu kontrol eden ve bulunduğu eksonun olgun mRNA içinde yer almasını sağlayan *exonic splice enhancer* (ESE) dizisini bozarak *exonic splicing silencer* (ESS) dizisinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, ESE dizilerine bağlanması gereken serin (S) ve arjinin (R) amino asitlerince zengin SR protein ailesinin bağlantısı bozulmakta ve yeni oluşan ESS dizilerine heteronükleer ribonükleoprotein (hnRNP) ailesi bağlanmaktadır. Dolayısıyla, transisyon nedeniyle post-transkripsiyonel bir mekanizma olan RNA *splicing* sırasında hata oluşmaktadır. Sonuçta *SMN2* geni tarafından kodlanan transkriptlerin %90'ında 7. ekson atlanmakta ($\Delta 7$ -SMN), kısa, oligomerize olamayan ve kararsız bir SMN proteini sentezine neden olmaktadır (53, 54). Ekson 7 içeren *SMN2* transkriptleri tarafından yaklaşık %10 oranında doğru uzunlukta protein sentezlenebilmesine karşın bu miktar motor nöron kaybını önleyememektedir (Şekil 2.9.).

SMN2 geninin farklı sayıda kopyaları bulunmakta olup bu kopyaların sayılarına paralel olarak doğru uzunluktaki SMN protein miktarının arttığı bilinmektedir. *SMN2* gen kopyaları fazla olan kişilerin hastalıklarının hafif

seyretmesi nedeniyle, *SMN2* geni hastalığı modifiye edici gen olarak kabul edilmektedir. *SMN2* gen kopya sayısı tip I SMA hastalarında 1-2; tip II SMA hastalarında 2-3; tip III SMA hastalarında 3-6 arasında değişiklik göstermektedir.(55, 56).



Şekil. 2.9. *SMN1* ve *SMN2* genleri arasındaki farklılık ve *SMN2*'deki *splicing* hatasının şematik gösterimi (98).

2.4.2. SMN Proteini ve Fonksiyonları

SMN genlerinin ürünü, 294 amino asit uzunluğunda ve 38 kDa ağırlığındaki SMN proteini, sitoplazmada ve çekirdekte bulunan *nuclear body* (Gem and Cajal body) adı verilen küresel yapıların içinde yerleşim göstermektedir (57). SMN proteininin yerleşimi hücre tipine göre farklılık gösterebilmektedir. Nöronlarda hücre gövdesi, akson ve dendritlerde, ayrıca bu uzantıların dallanma noktalarında ve uç kısımlarındaki büyüme bölgelerinde, kalp ve iskelet kası hücrelerinde ise sarkomerik z-disklerde SMN proteininin yoğunlaştığı gösterilmiştir (58). Gelişim aşamasına ve dokuya özgü ifade edilen SMN proteini omurgalılarda böbrek, karaciğer, omurilik ve beyinde yüksek; iskelet ve kalp kasında orta, lenfosit ve fibroblastlarda düşük düzeyde ifade edilmektedir. Ayrıca, omurgasız canlılarda (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*) ve tek hücreli ökaryotlarda da SMN proteinin varlığı gösterilmiştir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda SMN proteini eksikliğinin embriyonik dönemde ölüme neden olduğu dolayısıyla organizma için hayati bir öneme sahip gösterilmiştir (59, 60).

SMN proteini yapısal olarak, N terminalinde Tudor domaini ve nükleik asit bağlanma domaini, C terminalinde ise proline zengin poli-prolin domaini, sitoplazmik stabiliteyi sağlayan domain ve oligomerizasyonu sağlayan Y/G kutusu içermektedir. SMN proteini, Gemin proteinleri (Gemin 2-8) ile bir araya gelerek kararlı yapıda bir multi-protein kompleksi oluşturur ve RNA metabolizmasında görev alır. SMN proteininin RNA *splicing*, transkripsiyon, translasyon, DNA tamiri, endositoz ve otofaji gibi farklı biyolojik mekanizmalarda görevli çok sayıda protein ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.10.) (61, 62, 63).

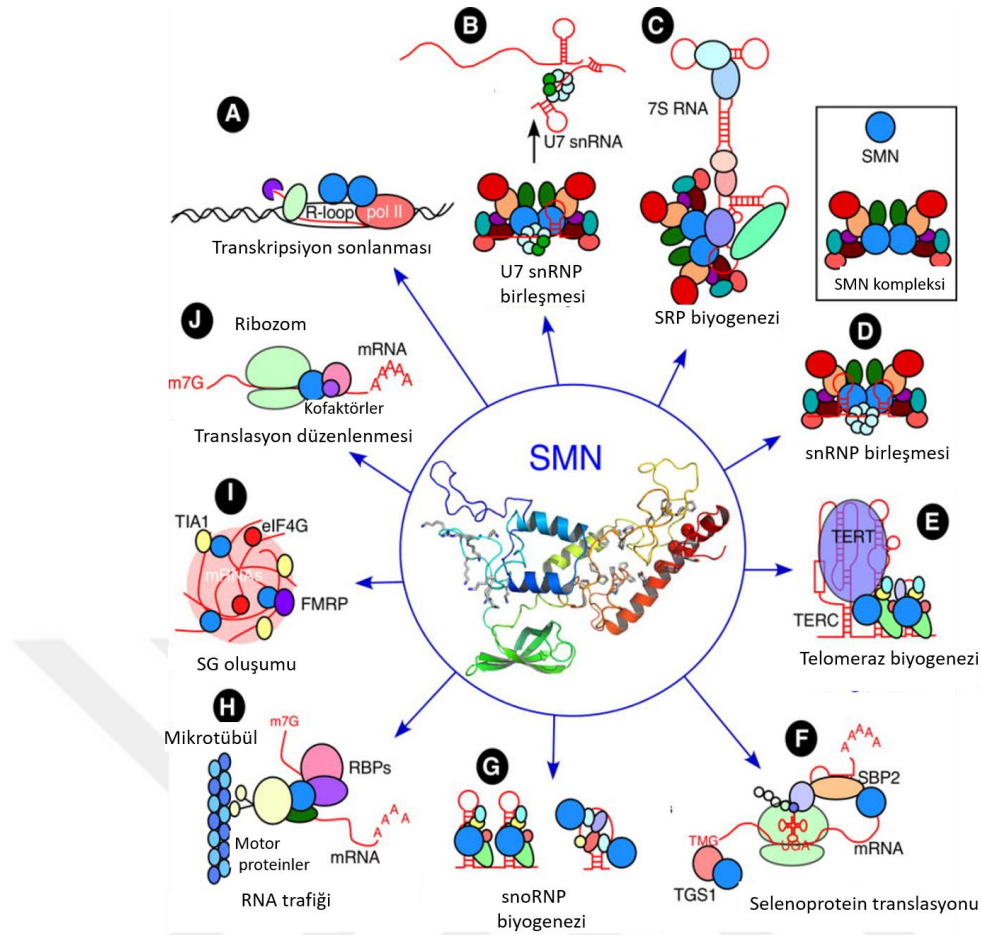
SMN proteini, RNA *splicing*'deki fonksiyonu nedeniyle *housekeeping* bir protein olmasına rağmen kaybı en fazla motor nöronları etkilemektedir. SMA'lı hayvan modellerinden kurulan primer nöron kültürleri, SMA hastalarına ait indüklenmiş pluripotent hücreler ve nöron-benzeri hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, SMN eksikliğinde akson boyunun kısaldığı ve dallanmasının arttığı, ayrıca uzantıların yerleşiminin değiştiği ve aksonal transportun hatalı gerçekleştiği gösterilmiştir. Nöron morfolojisinde ve fonksiyonunda görülen bu hatalar hücre iskeleti elemanlarının yapısal ve fonksiyonel bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir (64-

68). SMN proteininin hücre iskeleti elemanları ve düzenleyici sinyal yollarında görevli proteinlerle de ilişkisi saptanmış; SMN eksikliğinin hücre iskeleti dinamiklerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (67, 70).

SMN eksikliğinin aktin iskeleti üzerine etkilerine yönelik yapılan çalışmalarda, F-aktin proteininin miktarının değiştiği ve hücre içerisinde hatalı yerleştiği bildirilmiştir (67). Aktin proteinine bağlanarak filament yapısının düzenlenmesinde görev alan proteinlerden olan plastin 3 ve profilin IIa'nın SMN eksikliğinde ifadelerinin arttığı gösterilmiştir (67, 69). Profilin IIa'daki ifade değişikliğinin aktin dinamiğini kontrol eden ROCK kinaz ile etkileşiminin artmasına neden olduğu, ROCK ile birlikte AKT ve ERK sinyal yollarındaki proteinlerin fosforilasyonlarının değiştiği saptanmıştır (67, 71, 72).

SMN eksikliğinde ara filamentlerde de hatalar gösterilmiştir. SMA'lı fare modelinde, nöromusküler kavşakta yer alan aksonların terminalinde fosforile nörofilament ağır zincir (pNF-H) birikimi saptanmıştır (79). Ayrıca, başka bir SMA'lı fare modeli ile yapılan çalışmada; nöromusküler kavşakta yer alan motor nöronlardaki fosforile nörofilament birikimi nedeniyle sinaptik vezikül yoğunluğunun ve nörotransmitter salınımının azaldığı gösterilmiş, nöromusküler bağlantı bölgelerinde fonksiyon bozukluğu saptanmıştır (76-78).

SMN eksikliğinde aktin ve nörofilamentlerde görülen hataların yanı sıra mikrotübül iskeletinde de değişiklikler saptanmıştır.



Şekil 2.10. SMN proteini fonksiyonlarının şematik gösterimi (63).

2.5. SMA'da Mikrotübül Hataları

In-vitro ve *in-vivo* SMA modelleri ile yapılan çalışmalarda, SMN eksikliğinde mikrotübüllerin mimarisi ve polimerizasyonundaki değişiklikler gösterilmiş ancak altında yatan moleküler mekanizmalar detaylı olarak açıklanmamıştır.

SMN ifadesi baskılanan NSC34 fare motor nöron benzeri hücreleri ve SMA'nın ciddi formunu yansıtan bir fare modelinin omurilik dokularında yapılan bir çalışmada, mikrotübül depolimerizasyonunu sağlayan statmin proteininin ifadesi yüksek bulunmuş, tübülün polimerizasyonunda azalma saptanmış ve aksonlarda mitokondri transportunun hatalı gerçekleştiği gösterilmiştir. Ancak statmin ifadesi azaltıldığında farelerin ömür uzunluğunda bir artış saptanmamıştır (70).

SMN proteini eksikliğinde mikrotübül stabilizasyonunda görevli asosiye proteinlerden biri olan TAU proteininde fosforilasyon değişiklikleri saptanmıştır. SMA'nın ciddi formuna ait bir fare modeline ait motor nöronlarda ve hasta omurilik dokularında TAU'nun serin 202 (S202) and treonin 205 (T205) amino asitlerindeki fosforilasyonunun, Cdk5 aktivitesindeki değişiklikler nedeniyle arttığı gösterilmiştir. Fare modelinde TAU *knock-out* edildiğinde ise nöromusküler kavşak denervasyonu ve motor nöron dejenerasyonu düzeltilebilmiş, ancak hiperfosforile TAU'nun mikrotübül stabilitesi üzerine etkileri araştırılmamıştır (73). SMA hastalarına ait indüklenmiş pluripotent kök hücre kökenli motor nöronlarda yapılan çalışmada ise, β III-tübülün'in ekspresyonunun ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (80,81).

SMA ile ilgili olarak Anabilim Dalı'mızda tez çalışması öncesinde yapılan araştırmalarda, mikrotübül stabilitesinin sağlanmasında görevli MAP1B, MAP2 ve EB3 proteinlerinin ifadesinde değişiklikler saptanmıştır. *SMN* gen ifadesi siRNA ile baskılanan fare motor nöron benzeri NSC34 hücrelerinde ve hastalığın en ciddi formunu yansıtan SMA tip I Taiwanese fare modelinin pre-septomatik döneme ait omurilik dokularında, MAP1B proteininin düzeyinde artış saptanmıştır (hakem değerlendirmesinde). Ayrıca, MAP1B'nin etkileşimde olduğu mikrotübül pozitif uç proteinlerinden olan EB3 proteininin miktarında da azalma saptanmıştır (82). Biyoinformatik analizlerimiz sonucunda, SMA tip I hastasına ait indüklenmiş pluripotent kök hücre kökenli motor nöron hücrelerinde ve SMA tip I Taiwanese fare modeline ait omurilik dokularında MAP2 gen ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Bu artış SMN ifadesi baskılanan hücrelerde ve SMA tip I Taiwanese fare modelinin farklı gelişimsel dönemlerine ait omurilik ve beyin dokularında deneysel olarak gösterilmiştir (75). Mikrotübül ile ilişkili proteinlerin yanı sıra çalışmalarımız, SMN eksikliğinde α -tübülün post-translasyonel modifikasyonlarında da hatalar olduğunu göstermiş; SMN ifadesi baskılanan NSC34 hücrelerinde tübülün detirozinasyonun, SMA tip I fare modelinde ise tübülün asetilasyonun azaldığı saptanmıştır (yayınlanmamış veri). Tüm bu sonuçlar, *in-vitro* ve *in-vivo* SMA modellerinde mikrotübül stabilitesinin azaldığına işaret etmiştir. Ancak hastalara ait örneklerde mikrotübül yapısındaki değişiklikler araştırılmamıştır.

Daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalardan elde ettiğimiz bu bulgular doğrultusunda, SMA hastalarına ait hücrelerde de mikrotübül stabilitesinin azaldığı hipotezi kurulmuş ve bu tez çalışmasında SMA hastalarının primer fibroblast kültürlerinde mikrotübül stabilitesi araştırılmıştır.



3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Hücre kültürü çalışmaları

Tez kapsamında, ticari olarak daha önce temin edilmiş olan ve klinik olarak farklı ciddiyette seyreden 2 SMA hastasına ve 2 sağlıklı kontrol bireye ait primer fibroblast hücreleri kullanılmıştır. *SMN1* geni 7 ve 8. eksonlarında homozigot delesyon ve 3 kopya *SMN2* geni bulunan SMA hasta hücreleri (tip I: GM09677 ve tip II: GM03813) ile bir sağlıklı kontrol fibroblast hücresi (kontrol II: GM08333) *Coriell Cell Repository*'den, diğer sağlıklı kontrol fibroblast hücresi ise (kontrol I: PCS-201-012) *American Type Cell Culture Collection*'dan (ATCC) temin edilmiştir. Tez çalışması kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'na yapmış olduğumuz başvurumuzda (Tarih: 02.07.2019 Karar No: 19/722) çalışmanın etik kurul kapsamı dışında olduğu bildirilmiştir (Bkz. Ek-1)

Hücre Çoğaltma Ortamı:

DMEM 4,5 g/l D-glukoz (Biological Industries)	: 94 ml
Fetal dana serumu (%5, Biowest)	: 5 ml
Penisilin/streptomisin (%1, Biowest)	: 1 ml
L-glutamin (%1, Biochrom)	: 1 ml

Hücre Pasajlama Ortamı:

Tripsin/EDTA (Biowest)	: 5 ml
1XPBS (Medicago)	: 5 ml

Hücre Dondurma Ortamı:

Fetal dana serumu (%90)	: 900 µl
Dimetil sülfoksit (%10, DMSO, Sigma)	: 100 µl

Hücre Sayımı:

Tripan mavisi (ThermoFisher, %0,4)
Cedex XS Hücre Analizi Cihazı (Roche)

Morfometrik Analizler:

Leica DMIL floresan ataçmanlı *inverted* mikroskop

Hücre Proliferasyon Hızı Analizi:

MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)- 2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum) analiz kiti (Abcam)
SpectraMax M2 spektrofotometre (Molecular Devices)

3.1.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

RIPA Tamponu:

Tris- HCL (pH: 7.5, 20 mM, Sigma)	: 6 ml (1 M stok solüsyon)
NaCl (137 mM, Sigma)	: 2,4 gr
B-glucofosfat (25 mM, Sigma)	: 1,62 gr
EDTA (2 mM, Sigma)	:1200µl (0.5 M stok sol.)
Sodyum ortovanadat (1 mM, Sigma)	:1500 µl (200 mM stok sol.)
TritonX-100 (%1, Sigma)	: 30 ml (%10 stok solüsyon)
Deoksikolat (%1, Sigma)	: 3 gr

Proteaz inhibitör tablet (Roche) : 1:50

Fosfataz inhibitör tablet (Roche) : 1:20

240 ml dH₂O eklenir.

Soğutmalı santrifüj (Boeco)

Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)

Protein Konsantrasyon Tayini:

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

Spektrofotometre (SpectraMax M2)

3.1.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Western Blot

%12 Ayırıcı Jel Hazırlama Tamponu (pH:8,8):

Tris baz (Sigma) : 13 g

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma) : 0,3 g

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

%5 Toplayıcı Jel Hazırlama Tamponu (pH:6,8):

Tris baz (Sigma) : 4,54 g

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma) : 0,6 g

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

%40 Akrilamid-Bisakrilamid:

Akrilamid (Sigma) : 19,56 g

Bisakrilamid (Sigma) : 0,54 g

dH₂O ile 50 ml'ye tamamlanır.

%10 Amonyum Persülfat (APS):

Amonyum Persülfat (Sigma) : 0,1 g

dH₂O ile 1 ml'ye tamamlanır.

SDS – Poliakrilamid jel içerikleri:

%5 Poliakrilamid jel (Toplayıcı jel)

dH₂O : 4,25 ml

Toplayıcı Jel Hazırlama Tamponu : 1 ml

%40 Akrilamid/Bisakrilamid : 750 µl

TEMED (Sigma) : 10 µl

APS : 60 µl

%12 Poliakrilamid jel (Ayırıcı jel)

dH₂O : 6,35 ml

Ayırıcı Jel Hazırlama Tamponu : 6 ml

%40 Akrilamid/Bisakrilamid : 5,65 ml

TEMED (Sigma) : 10 µl

APS : 100 µl

Yükleme Tamponu (5X *Laemmli*):

1M Tris Baz, pH 8 (Merck)	: 5 ml
Gliserol (Merck)	: 5 ml
Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)	: 1,5 g
Brom Fenol Mavisı	: 5 mg
2-Merkaptoetanol (Sigma)	: 2,5 ml

Western Blot

- Protein moleküler ağırlık belirleyicisi, ColorBurst™ Electrophoresis Marker (Sigma)
- Nitroselüloz Membran (BioRad)
- *Coomassie Brilliant* Mavisı (Sigma)
- Ponceau-S (Sigma)
- SuperSignal™ West Femto Kemilüminesans Substrat Kiti (ThermoFisher)
- Mini protean elektroforez sistemi ve güç kaynağı (Biorad)
- GeneGnome5 Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı (Syngene)

5X Yürütme (Elektroforez) Tamponu:

Tris Baz, pH: 8	: 15,15 g
Glisin (Sigma)	: 72 g
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	: 5 g

1X için 200 ml stoktan alınır, dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

5X Transfer Tamponu:

Tris Baz, pH: 8	: 15,15 g
Glisin (Sigma)	: 72 g
Metanol	: %20

1X için 200 ml stoktan alınır, 200 ml metanol taze olarak eklenir ve üstü dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

10X TBS, (pH;7.6):

Tris Baz (Sigma)	: 24,4 g
NaCl (Sigma)	: 80 g
dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.	

Yıkama Tamponu (1X TBS-T) (pH:7.4):

10X TBS	: 200 ml
Tween20 (Sigma)	: 1 ml
dH ₂ O ile 1 litreye tamamlanır.	

%5 Bloklama Solüsyonu:

Süt tozu	: 1 g
TBS-T, %0,1	: 20 ml

%20 SDS, (pH : 7.2):

SDS	: 20 g
dH ₂ O	: 100 ml

Coomassie Blue çözeltisi:

<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	: %0,025
Metanol	: %40
Glasiyal asetik asit	: %7

Primer Antikorlar:

- Anti-Asetil α -tübülin (Fare monoklonal, Sigma) (1:1000)
- Anti-Detirozin α -tübülin (Tavşan poliklonal, Millipore) (1:500)
- Anti- α tübülin, (Fare monoklonal, Sigma) (1:1000)
- Anti-GAPDH (Fare monoklonal, Ambion) (1:5000)

Sekonder Antikorlar:

- Anti-tavşan *horseradish* peroksidaz-konjuge (HRP), Amersham (1:4000)
- Anti-fare *horseradish* peroksidaz-konjuge (HRP), Sigma (1:8000)

Stripping Solüsyonu:

Tris HCl	: 312 μ l
2-Merkaptoetanol	: 37,5 μ l
%20 SDS pH:7.2	: 500 μ l
dH ₂ O	: 4,15 ml

65 °C hibridasyon fırınında 30 dakika bekletilerek bağlanan antikorlar uzaklaştırılır.

3.2.4. İmmünfloresan Boyama ve Kantitatif Mikroskopi

- Konfokal mikroskop (Zeiss LSM 510, Lazer Taramalı)
- Floresan ataçmanlı *upright* mikroskop (Carl-Zeiss 2)
- Prolong Anti-Fade Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific)

Fiksasyon:

%4 PFA :100 ml

%20 BSA:

BSA : 1 g

TBS-T : 5 ml

%1 hazırlamak için %20 BSA'dan 50 µl kullanılır.

Triton™ X-100 (%10):

Triton™ X-100 (Thermo Scientific) : 2 ml

PBS : 18 ml

1X Yıkama Solüsyonu:

dH₂O : 1 g

PBS Tablet (Medicago) : 1 adet

920 µl PBS alınarak, bloklama çözeltisi 1 litre'ye tamamlanır.

Bloklama Tamponu :

Triton™ X-100 (%10)	: 30 µl
Sığır serum albumin (%20 BSA)	:50 µl
Keçi serumu (Sigma)	: 50 µl
PBS	: 870 µl

Antikorlar:

- Anti-Asetil α -tübülün primer antikor (Fare monoklonal, Sigma), (1:100)
- Anti-fare Alexa flour 488 sekonder antikor (Invitrogen) (1:500)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında ticari olarak daha önce temin edilmiş olan ve klinik olarak farklı ciddiyette seyreden 2 SMA hastasına (tip I ve II) ve 2 sağlıklı kontrole, ait primer fibroblast hücrelerinin aşağıda belirtildiği şekilde kültürü yapılmıştır.

Fibroblast hücrelerinin açılması ve pasajlanması

- Sıvı azotta (-196 °C) dondurulmuş olan hasta ve kontrol primer fibroblast hücreleri 37°C su banyosunda hızlıca çözüldükten sonra hücre kültürü kabini içerisinde çoğaltma ortamı içeren 15 ml falkon tüpler içerisine alındı.
- Hücreler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pelet 3 ml çoğaltma ortamı ile resüspanse edildi ve 75 cm²'lik kültür kaplarına aktararak 37°C, %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı.
- Hücrelerin yaklaşık %80 yoğunluğa ulaşmasının ardından, kültür ortamı uzaklaştırıldı ve kültür ortamı 5 ml 1XPBS ile yıkanarak ölü hücreler uzaklaştırıldı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 5 ml Tripsin/EDTA eklendi ve hücreler 2 dakika 37 °C, %5 CO₂ içeren etüve kaldırıldı. Böylece hücrelerin kültür kabından kaldırılması sağlandı.
- Tripsinin inaktivasyonu amacıyla 6 ml çoğaltma ortamı koyularak hücreler resüspande edildi. Hücreler 15 ml tüpe toplandıktan sonra 2000 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi.
- Süpernatant atıldı ve pelet 3 ml çoğaltma ortamı ile resüspanse edilerek 1:5 oranı korunacak şekilde yeni kültür kabına aktarıldı.
- Kültür kaplarındaki hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında Cedex XS cihazı ile sayıldı ve deneysel çalışmalar için aşağıda belirtilen şekilde kültür kaplarına aktarıldı.
 - Western blot çalışmaları için: 100 mm kültür kaplarına 1.500.000 hücre
 - Morfometrik analizler için: 6 kuyucuklu kültür kaplarına 70.000 hücre

- Proliferasyon hızı analizi için: 96 kuyucuklu mikrolakalara 4000 hücre
- İmmünfloresan boyama çalışmaları için: 6 kuyucuklu kültür kaplarına 70.000 hücre
- Tüm çalışmalarda 15. pasajdan erken pasaj sayısına sahip hücreler kullanılmış olup deneyler ardışık pasajlarda olmak üzere 2-3 kez tekrarlanmıştır.

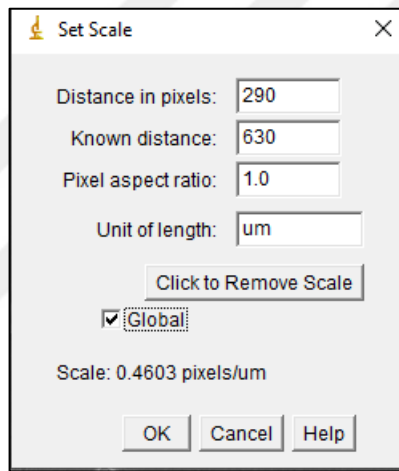
Fibroblast hücrelerinin dondurulması

- Hücreleri dondurmak için %10 DMSO ve %90 çoğaltma besiyeri içeren dondurma ortamı hazırlandı.
- Hücreler 1:1 oranında dondurma ortamında resüspande edildikten sonra *cryo* tüplere aktarıldı.
- Tüpler önce -80°C derin dondurucuya sonra da sıvı azota (-196°C) alınarak kademeli olarak donduruldu.

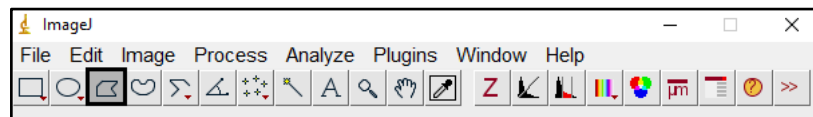
1. Morfometrik Analizler

- Morfolojik analizler için hücre kültüründe çoğaltılan hücreler 6 kuyucuklu kültür kabına 70.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde triplike olarak dağıtıldı.
- 1 gece 37 °C, %5 CO₂ içeren etüve kaldırılarak hücrelerin yapışması sağlandı.
- İnkübasyon süresinin ardından hücreler ışık mikroskopunda 10X objektif kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı.
- Hücre morfolojilerinin analizi için her kuyucuktan 3 farklı alanın fotoğrafı çekildi.
- Her fotoğrafta hücrenin sınırlarının net olarak belirlenebileceği 5 hücrenin toplam alanı, gövde alanı, boyu, eni, boy/en oranları (*axis ratio*), ve filapod uzunlukları ImageJ programı kullanılarak ölçüldü (toplam 45 hücre/deney) (Şekil 3.1).

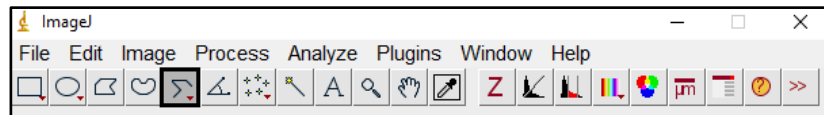
- Analizlere başka bir hücreyle çakışmayan ve sınırları tam olarak görülebilen hücreler dahil edildi. Fotoğraf alanının kenarında kalan ve sınırları tam belli olmayan hücreler analiz dışında bırakıldı.
- Morfometrik analizler 3 ardışık pasajda tekrar edildi. Böylece her bir şart için toplam 135 hücre, kör (*blinded*) olarak analiz edildi. Hasta hücrelerin morfolojileri sağlıklı kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.
- Morfolojik ölçümler Image J programı ile aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.
 - “*Set settings*” kısmından, “*set scale*” seçilerek kullanılan objektif bilgileri aşağıda gösterildiği gibi girildi:



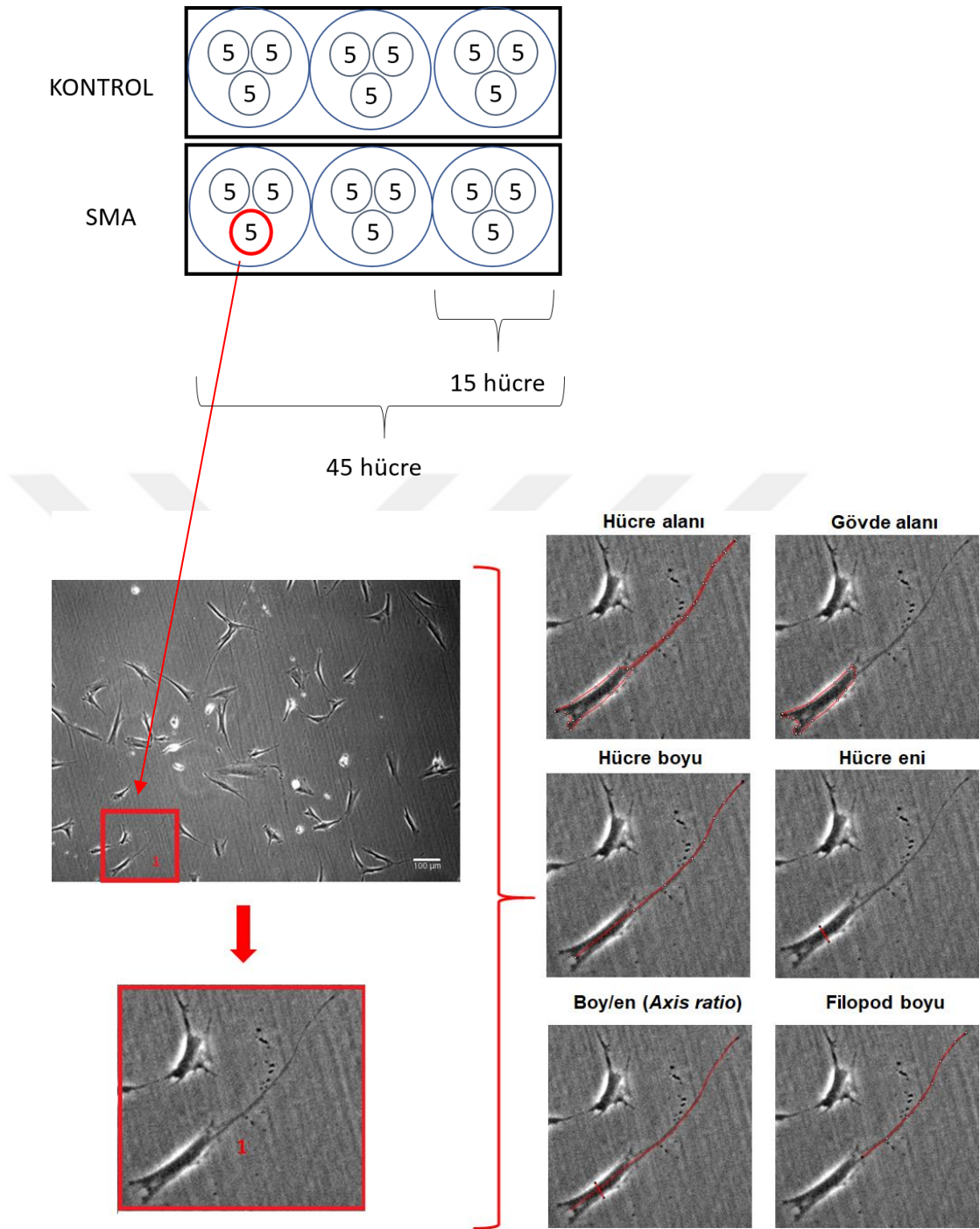
- Hücre ve gövde alan ölçümleri için “*Polygon selections*” seçildi.



- Hücre boyu, eni, filopod uzunluk ölçümleri için “*Straight*” ardından “*Segmented Line*” seçildi



- Ölçüm alanları, yukarıdaki şekilde belirlendikten sonra ‘*Analyze*’ kısmından ‘*measure*’ seçilerek, ölçümlere dair sayısal değerler elde edildi.



Şekil 3.1. SMA ve kontrol primer fibroblast hücrelerinde morfolojik analizler için hazırlanan deney planının şematik gösterimi ve ölçüm bölgelerini belirten örnek fotoğraflar.

2. Hücre Proliferasyon Hızı Analizi

SMA hastaları (tip I ve tip II) ve sağlıklı kontrollere ait hücrelerin belirli zaman aralığındaki proliferasyon hızları eş zamanlı olarak MTS yöntemi ile analiz edilmiştir. MTS yöntemi, canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından artan NAD(P)H bağımlı dehidrogenaz enzim aktivitesi ile MTS tetrazolyum bileşiğinin indirgenmesi ve formazan oluşumu prensibine dayanmaktadır. Proliferasyon analizleri aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

- MTS analizi için hücreler otomatik sayım cihazı (CedeXs) cihazı ile sayıldıktan sonra beş adet 96 kuyucuklu mikropalakaya 4000 hücre/kuyucuk olacak şekilde triplike olarak dağıtıldı.
- Mikropalakalardan biri, başlangıçta sayılarak kültür kaplarına dağıtılan 4000 hücrenin absorbans değerinin belirlenmesi amacıyla 2 saat, diğerleri 24, 48, 72 ve 96 saat 37°C, %5 CO₂ etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyon süreleri bitiminde kuyucuklara 20 µm MTS uygulandı. Hücreler 2 saat 37°C, %5 CO₂ etüvde inkübe edildi ve oluşan formazan 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Spectramax M2, Molecular Devices) olarak ölçüldü.
- Hasta hücrelerin proliferasyon hızları sağlıklı hücrelerle karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

3.2.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

- Protein izolasyonu amacıyla, 2 adet 100 mm kültür kabına 1.5 milyon hücre/kap olacak şekilde dağıtıldı ve hücrelerin yapışması için kültür kapları 1 gece 37°C, %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı.
- Ertesi gün soğuk ile mikrotübül depolimerizasyonunun indüklenmesi amacıyla kültür kaplarından biri 4°C'de 1 saat, diğer kültür kabı ise 37°C'de 1 saat inkübatörde tutuldu.
- İnkübasyon süresinin sonunda hücreler proteaz ve fosfataz içeren RIPA lizis tamponu içerisine toplandı.
- Örnekler protein izolasyonu amacıyla buz üzerinde 15 dakika sonike edildi.

- Sonikasyondan sonra örnekler 14.000 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant temiz 1,5 ml tüpe aktarıldı ve izole edilen proteinler miktar tayini yapılabildiği kadar -80 °C'de saklandı.

BCA Protein Assay kiti kullanılarak, izole edilmiş protein miktarları belirlendi. %1 SDS içerisinde farklı BSA konsantrasyonlarına sahip standartlar kullanılarak standart eğri çizildi.

Tablo 3.1. Protein miktar tayininde standart eğri çizilmesi için kullanılan BSA konsantrasyonları.

Standart Numaraları	Kullanılan %1 SDS Miktarı (µl)	Kullanılan BSA miktarı (µl)	Konsantrasyon (µg/µl)
0	50	0	0
1	47,5	2,5	0,1
2	40	10	0,4
3	30	20	0,8
4	20	30	1,2

- Protein örnekleri %1 SDS ile 10 kat seyreltildi. 50A:1B oranında hazırlanmış olan çalışma çözeltisi (*working reagent*) 1 ml olacak şekilde eklendikten sonra örnekler 37°C'deki inkübatör içerisinde 30 dakika bekletildi.

- Örneklerin 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri, triplike olacak şekilde spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart eğri yardımıyla proteinlerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blot

Mikrotübül stabilite belirteçleri olan asetil ve detirozin α -tübülün miktarları Western blot yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmalar aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiş olup ardışık pasajlardan toplanan hücrelerle 3 kez tekrar edilmiştir.

- Camlar etanol ile temizlenip aparata takıldıktan sonra iki cam arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildi.
- SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için ayırıcı jel (%5) taraktan yaklaşık 1 cm aşağısına kadar döküldü.
- Jel polimerizasyonunu takiben toplayıcı jel (%12) camlar arasına döküldü ve taraklar yerleştirildi.
- Polimerleşen jelden taraklar çıkartılıp jel *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad) tankına yerleştirildi.
- Örnekler 30 ug olacak şekilde 1:5 oranında 2-merkaptetanol içeren 5X laemli tamponu ile karıştırıldı ve proteinlerin denatüre olması amacıyla 95 °C de 7 dakika kaynatılarak buz içerisine alındı.
- Jele 10 μ l protein moleküler ağırlık belirleyicisi ve örnekler yüklendi.

Örnekler elektroforezde 120 V'da 2 saat yürütülerek proteinlerin molekül büyüklüklerine göre ayrımı gerçekleştirildi.

Islak Transfer

- 9/6 cm boy/en oranında olacak şekilde kesilen 1 adet nitroselüloz membran, 4 adet *Whatmann* kağıdı ve süngerler transfer tamponunun içinde 5 dakika bekletildi.
- Elektroforez sonrasında toplayıcı jel kesilip atılarak ayırıcı jel tamponunun içine alındı.
- Islak transfer için kasetin siyah kapağından başlayarak sırasıyla sünger, 2 adet *Whatmann* kağıdı, jel, membran, 2 adet *Whatmann* kağıdı, sünger konularak sandviç hazırlandı.

- Transfer tamponu içeren tanka kasetler ve buz kalıbı yerleştirilerek 150 V'da 1,5 saat proteinlerin jelden nitroselüloz membrana transferi sağlandı.
- Transfer sonrasında jel Coomassie Brilliant Mavisi ile, membran ise Ponceau S ile boyanarak transfer kontrol edildi.

Bloklama ve Antikor İnkübasyonları

- Transfer işlemi sonrasında özgül olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla membran %5 süt tozu içeren bloklama solüsyonu içerisinde çalkalayıcıda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

Primer antikorlar, bloklama solüsyonu içerisinde, gereçler kısmında belirtilen oranlarda seyreltilerek +4 °C'de 16 saat süre çalkalayıcıda inkübe edildi.

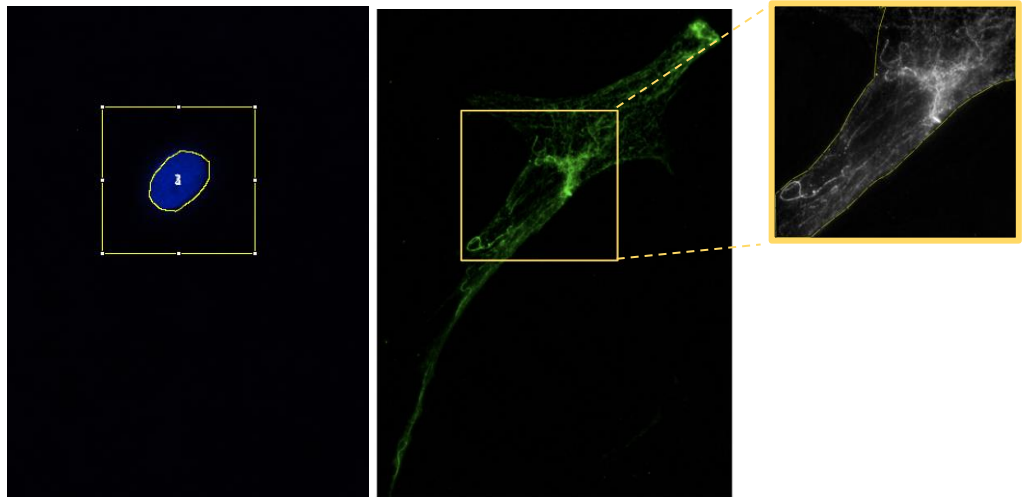
- Ertesi gün bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması amacıyla yıkama tamponu ile 3 defa 10 dakika aralıklarla yıkamalar gerçekleştirildi.
- Membran, 1:4000 ya da 1:8000 oranında seyreltilmiş olan *horseradish peroksidaz* (HRP) işaretli uygun sekonder antikorlar ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
- Sekonder antikor inkübasyonu sonrasında membran yıkama tamponu ile 4 defa 10 dakika aralıklarla yıkandı.
- Protein bantlarının görüntülenmesi amacıyla, West Femto Supersignal kemilüminesans kit solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı ve görüntüleme karışımı hazırlandı. Membran görüntüleme karışımı ile 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. GeneGnome görüntüleme cihazına yerleştirildi ve CCD kamera ile görüntülendi.
- Normalizasyon amacıyla ifadesi değişmeyen *housekeeping* protein olarak GAPDH ve α -tübülün kullanılmış ve bu proteinleri görüntülemek için önceden membran üzerine uygulanan antikorlar *stripping* işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Bu işlemde membran hibridizasyon fırınının içinde 65 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. Ardından üç kez hızlı, ardından üç kez 10'ar dakika %0,1 TBS-T ile yıkanmış, bloklama ve antikor uygulamaları sonrasında protein bantları görüntülenmiştir.

- Protein bantları dansitometrik olarak ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir. Asetil ve detirozin tübülün proteinlerine ait bantlar, önce α -tübülün, ardından GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Hasta hücrelerin asetil ve detirozin α -tübülün miktarları, kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. İmmünfloresan Boyama ve Kantitatif Mikroskopi

- İmmünfloresan boyama çalışmaları için hücre kültüründe çoğaltılan hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına 70.000 hücre olacak şekilde triplike olarak dağıtıldı.
- 1 gece 37 °C, %5 CO₂ içeren etüve kaldırılarak hücrelerin yapışması sağlandı.
- Hücreler immünfloresan boyama çalışmaları için %4 PFA ile 10 dakika fikse edildi.
- PFA'nın uzaklaştırılması amacıyla hücreler 1XPBS ile 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- %1 BSA, %5 keçi serumu ve %10 Triton-X 100 içeren solüsyon içerisinde 1 saat oda sıcaklığında bloklandı.
- Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 1:100 oranında seyreltilmiş asetil α -tübülün primer antikoru ile hücreler 4°C'de 1 gece nemli ortamda inkübe edildi.
- Primer antikor uzaklaştırıldı ve hücreler 1XPBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- Hücrelere 1:500 oranında sekonder antikor uygulanarak 1 saat oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi.
- Sekonder antikor uzaklaştırılarak hücreler 1XPBS ile 4 kez 5'er dakika yıkandı.
- Lam ve lamel, DAPI içeren *prolong anti-fade* solüsyonu ile kapatıldı.
- Hücreler florasan ataçmanlı *upright* mikroskop (Carl-Zeiss 2) ile 100X objektif kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflandı.

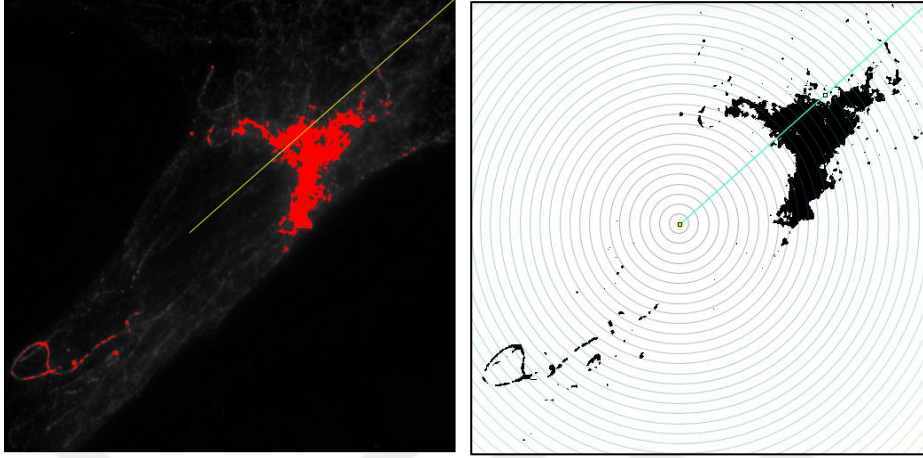
- Hasta ve kontrole ait hücrelerin fotoğrafları, ışık ayarı sabit olacak şekilde çekildi.
- Asetil α -tübülün proteinine ait floresan şiddet analizi ile ağ yapısı analizi Image J programı ile aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.
 - Set settings” kısmından, “set scale” seçilerek, 100X objektif için kameranın piksel değerleri 11.23 piksel/ μm olacak şekilde ayarlandı.
 - DAPI görüntülerinden yararlanılarak çekirdeğin etrafı “free hand tool” ile çevrelendi; çap uzunlukları ve çekirdeğin merkezi belirlendi.
 - Tüm hücre analizleri için hücrelerin etrafı “free hand tool” ile çevrelendi.
 - Çekirdeğin etrafındaki alanın analizi için, çekirdek merkezinin etrafına 50 μm x 50 μm ebatlarında kare çizilerek analizlerde kullanılacak sabit bir alan belirlendi. Bu alan içerisinde, hücrelerin kapladığı alan belirlendi.
 - Tüm fotoğraflardan *background* sinyal (*Rolling ball radius*: 280 piksel) eşit şekilde çıkartıldı.
 - Hücrelerin tamamında ve çekirdeğin etrafındaki alanda ölçümler gerçekleştirilerek 1 μm^2 'lik birim alandan gelen floresan sinyalin şiddeti analiz edildi. (Şekil 3.2.).
 - Tüm hücre analizlerinde hasta ve kontrol'e ait 5'er hücre, çekirdek etrafındaki alanda yapılan analizlerde ise 10'ar hücre analize dahil edildi ve deneyler 2 kez tekrarlandı.



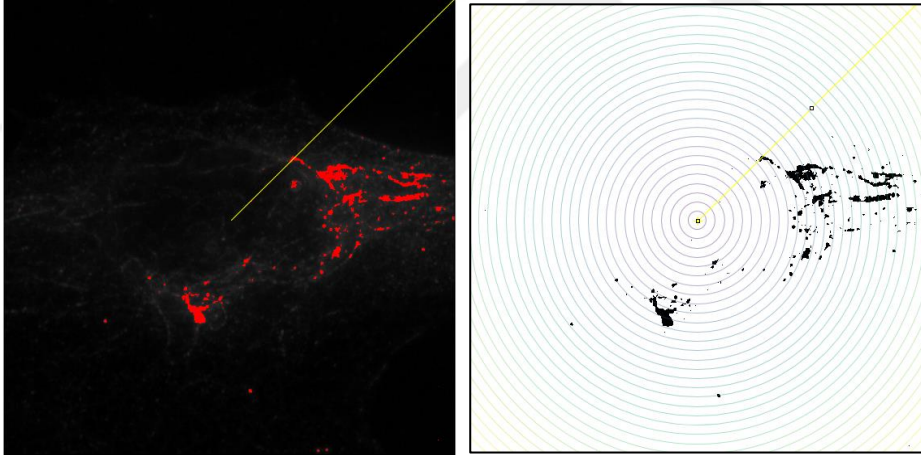
Şekil 3.2. Floresan şiddet analizleri için belirlenen sabit alana ait örnek fotoğraflar. Mavi: DAPI, Yeşil: Asetil α -tübülün

- Asetil α -tübülün ağ yapısının analizi için Image J programının “Sholl Analysis” *plug-in*'i kullanıldı.
 - Sholl analizlerinde daha önce belirlenen sabit alan kullanıldı ve fotoğraflar 8 bit rezolüsyona dönüştürüldü.
 - Her hücre için mikrotübüllerin en iyi seçilebileceği *threshold* değeri 45 olarak belirlendi ve tüm fotoğrafların analizinde aynı değer kullanıldı.
 - Çekirdeğin orta noktasından mikrotübüllerin en uç kısmına bir çizgi çizildikten sonra Sholl analizi gerçekleştirildi.
 - Çizilen çizgi boyunca program tarafından, çekirdek merkezinden itibaren otomatik olarak 1 μ m aralıklarla konsantrik halkalar çizildi. Çekirdeğin merkezinden başlayarak her bir daireyi kesen mikrotübül sayısı ve ortalama kesme sayıları hesaplandı (Şekil 3.3.).
 - Analizlerde hasta ve kontrol'e ait 6'şar hücre analiz edildi ve deneyler 2 kez tekrarlandı.

A



B



Şekil 3.3. Sholl analizleri için *threshold* belirlenmiş (sol) ve konsantrik halka çizilmiş (sağ); **A)** Kontrol hücreye, **B)** hasta hücreye ait örnek fotoğraflar.

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Western Blot, morfometrik analizler ve immünfloresan boyama çalışmalarından elde edilen sonuçlar Image J programı ile analiz edildi. Verilerin istatistiksel değerlendirmeleri Graphpad Prism 8 programı ile gerçekleştirildi. Kullanılan istatistiksel testler şekil alt yazılarında belirtildi. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

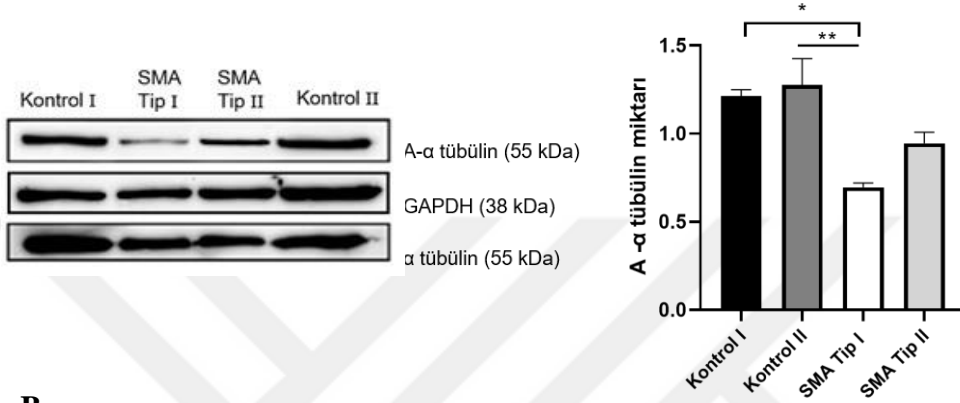
4.1. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Primer Fibroblast Hücrelerinde α -Tübülün Proteinlerinin Asetilasyon ve Detirozinasyon Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Analizi

Stabil ve uzun ömürlü mikrotübüllerde, α -tübülün proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonlarından olan asetilasyon ve detirozinasyon sık görülmektedir (22, 23). Bu nedenle, SMA hastalarına (tip I ve II) ait primer fibroblast hücrelerinde α -tübülün proteinlerinin asetilasyon ve detirozinasyon düzeyleri Western blot yöntemi ile analiz edilmiş ve sağlıklı kontrol hücrelerle karşılaştırılmıştır. Standart kültür sıcaklığı olan 37°C 'de gerçekleştirilen çalışmalara ilaveten, hasar durumunda mikrotübül stabilitesindeki değişikliklerin araştırılması amacıyla hücreler 4°C 'de 1 saat inkübe edilerek mikrotübüller depolimerize edilmiştir. Soğuk ortamda tübülün proteinlerinin konformasyonu değişmekte, tübülün proteinleri mikrotübüle eklenememekte, bu nedenle mikrotübüller depolimerize olmaktadır (17, 18, 19). Soğuk ile depolimerizasyon oluşturulan SMA hasta hücrelerindeki post-translasyonel modifikasyon düzeyleri sağlıklı kontrol hücreler ile karşılaştırılmıştır.

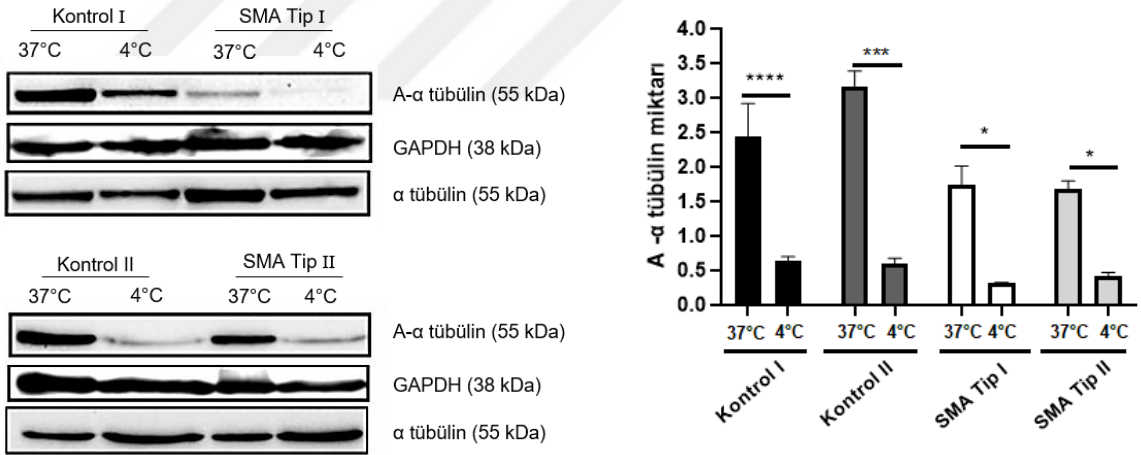
Western blot çalışmaları, tip I SMA hasta primer fibroblast hücrelerindeki asetil α tübülün düzeyinin her iki sağlıklı kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir. Tip II SMA primer fibroblast hücrelerinde ise asetil α -tübülün düzeyinde azalış gözlenmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.1.A). Soğuk uygulaması ile hem SMA hem de kontrol fibroblastlardaki asetil α -tübülün miktarının, 37°C 'de kültürü gerçekleştirilen hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptanmış olup bu bulgu mikrotübüllerin soğuk uygulaması ile depolimerize edildiğini göstermiştir. Soğuk uygulanan SMA ve kontrol hücreleri birbirleriyle karşılaştırıldığında α -tübülün asetilasyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.1.B).

α -tübülün detirozinasyonu ile ilgili olarak gerçekleştirilen çalışmalarda ise, SMA tip I ve tip II hastalarına ait hücrelerde sağlıklı kontrol hücrelere göre detirozinasyon düzeyinde bir azalma gözlenmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.2.A). Soğuk uygulaması sonrasında da hasta hücrelerde kontrole göre anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.2.B).

A

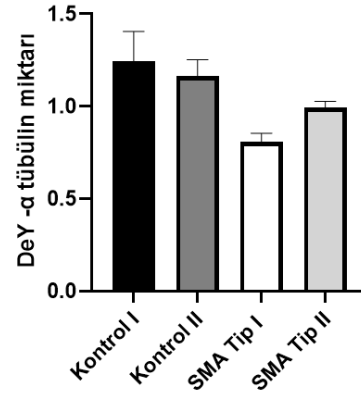
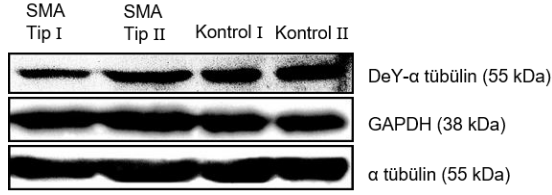


B

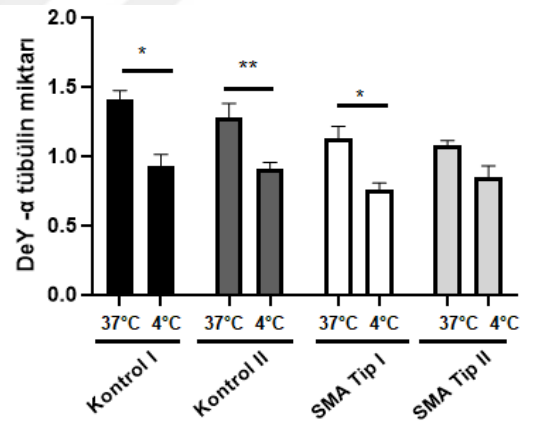
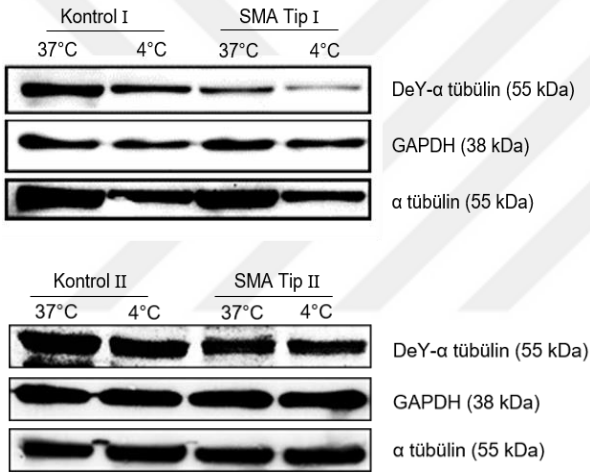


Şekil 4.1. SMA ve kontrol primer fibroblast hücrelerinde α -tübülün asetilasyon düzeylerinin analizi. **A)** SMA tip I, tip II ve 2 adet sağlıklı kontrole ait fibroblast hücrelerinde asetil α -tübülün düzeylerini gösteren örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçları, n=3, One-way ANOVA, **B)** Standart kültür sıcaklığında (37°C) tutulan ve soğuk uygulaması (4°C) yapılan SMA tip I, tip II ve 2 adet sağlıklı kontrole ait fibroblast hücrelerinde α -tübülün asetilasyon düzeylerini gösteren örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçları, n=4 tekrar, Two-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ A- α : asetil α -tübülün, Veri \pm SEM.

A



B

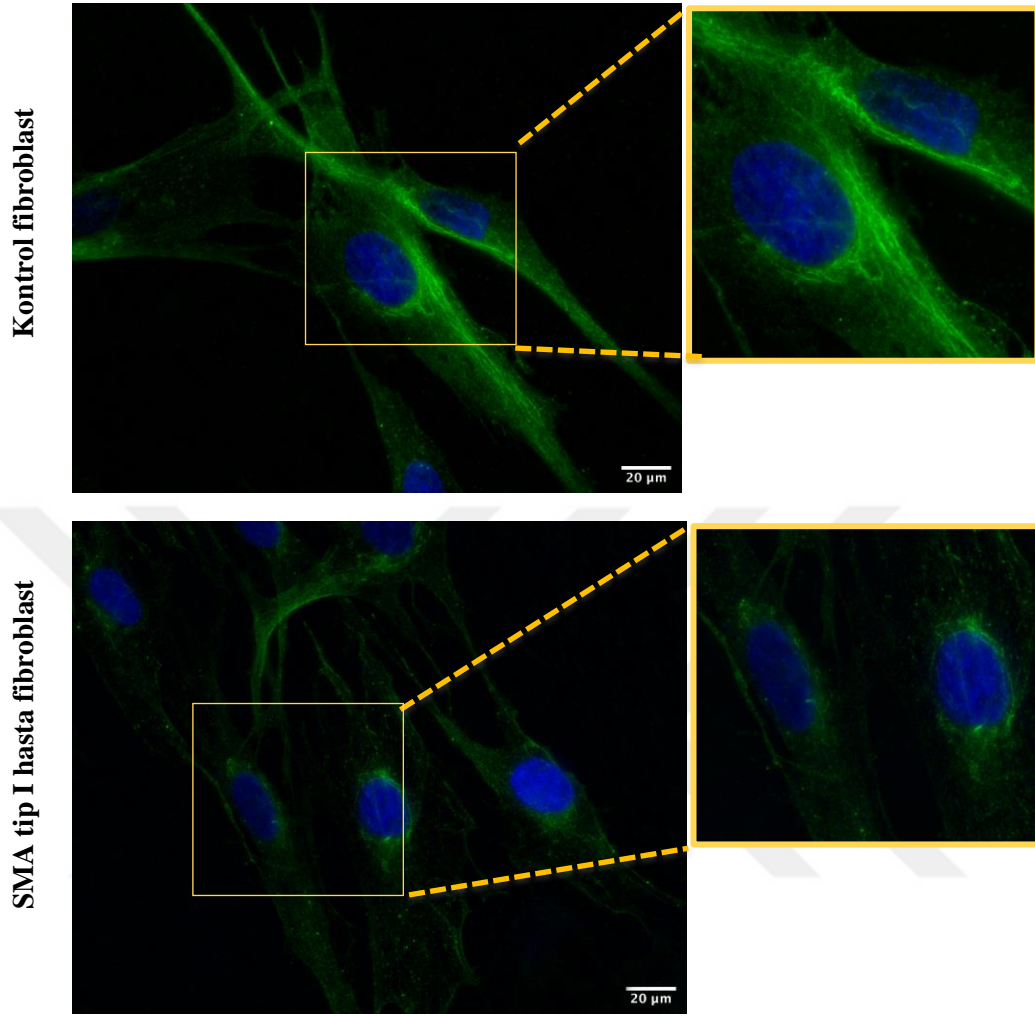


Şekil 4.2. SMA ve kontrol primer fibroblast hücrelerinde detirozin α-tübülün düzeylerinin analizi. **A)** SMA tip I, tip II ve 2 adet sağlıklı kontrole ait fibroblast hücrelerinde detirozin α-tübülün düzeylerini gösteren örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçları, n=3, One-way ANOVA, **B)** Standart kültür sıcaklığında (37°C) tutulan ve soğuk uygulaması (4°C) yapılan SMA tip I, tip II ve 2 adet sağlıklı kontrole ait fibroblast hücrelerinde detirozin α-tübülün düzeylerini gösteren örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçları, n=3 tekrar, Two-way ANOVA, DeY: detirozin α-tübülün, *p<0.05, **p<0.01, Veri ±SEM.

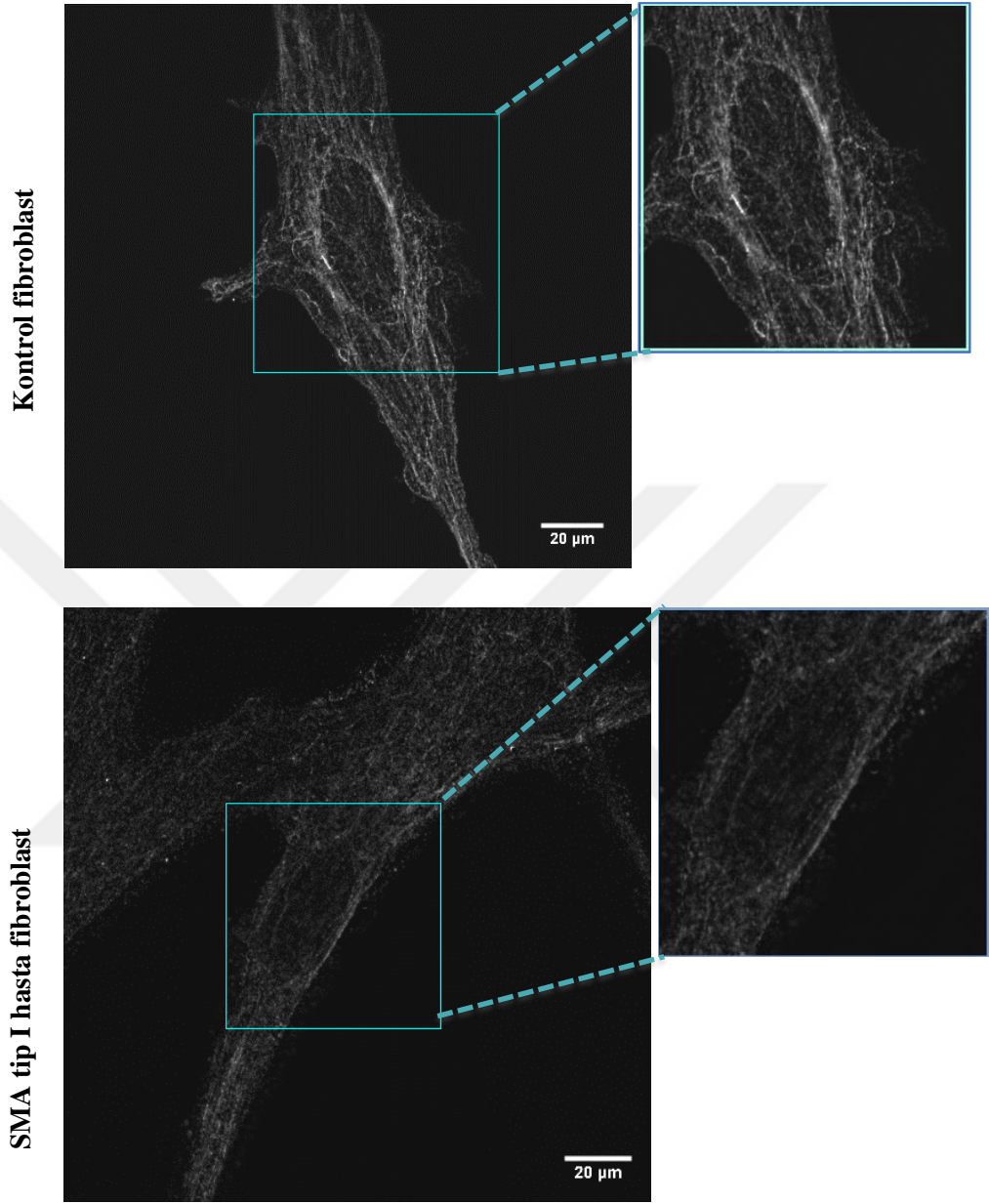
4.2. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Primer Fibroblast Hücrelerinde İmmünfloresan Boyama ve Kantitatif Mikroskopi Analizleri

SMA hastalarına ait hücrelerde kontrol hücrelere göre α -tübülün asetilasyon düzeyinde Western blot yöntemi ile saptanan azalma, immünfloresan boyama yöntemi ile de araştırılmıştır. Bu amaçla, azalmanın en fazla görüldüğü SMA tip I hastasına ait hücrelerde asetil α -tübülün boyamaları gerçekleştirilmiş, stabil mikrotübüllerin hücrelerdeki dağılımı kontrol ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 4.3. ve 4.4)

İmmünfloresan boyama çalışmaları, Western blot sonuçlarını destekler şekilde SMA tip I hastalarına ait hücrelerde asetil α -tübülün miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını göstermiştir (Şekil 4.5.). Hem kontrol ve hem de hastaya ait hücrelerde asetilenmiş mikrotübüllerin çekirdeğin etrafında yoğunlaştığı saptanmış, bu nedenle çekirdeğin etrafındaki alanda da floresan şiddet analizleri gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, hastaya ait hücrelerdeki asetil α -tübülün sinyal yoğunluğunda kontrole göre anlamlı bir azalma saptanmıştır (Şekil 4.5.). Asetil α -tübülün miktarında saptanan bu azalmanın, ağ yapısına etkisinin araştırılması amacıyla Sholl analizleri gerçekleştirilmiştir. Çekirdek etrafındaki alanda gerçekleştirilen analizler sonucunda çekirdek merkezinden periferik doğru çizilen konsantrik halkaları kesen ortalama mikrotübül sayısında hasta hücrelerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Azalmanın özellikle çekirdek merkezinden 16 μ m uzaklıktaki halkadan itibaren gerçekleştiği ve stabil mikrotübül ağ yapısının bozulduğu gösterilmiştir (Şekil 4.5).

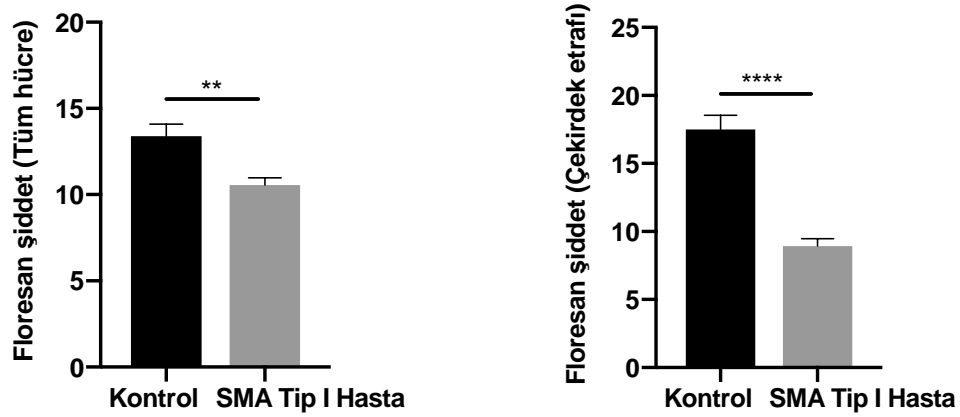


Şekil. 4.3. Hasta ve kontrol hücrelerde asetil α -tübülin boyamalarına ait örnek fotoğraflar ve çekirdeğin etrafındaki ağ yapısının yakınlaştırılmış görüntüleri, Bar; 20 μ m

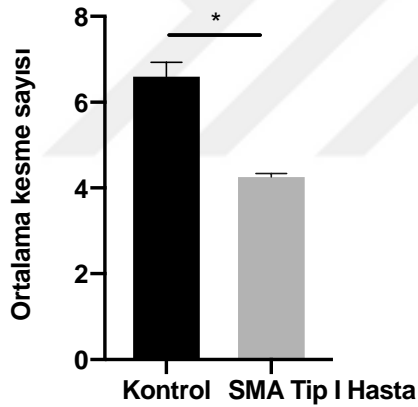


Şekil. 4.4. Hasta ve kontrol hücrelerin konfokal mikroskop ile çekilmiş görüntüleri, z ekseninden alınan 4 optik kesit karşılaştırılmıştır. Bar; 20 µm

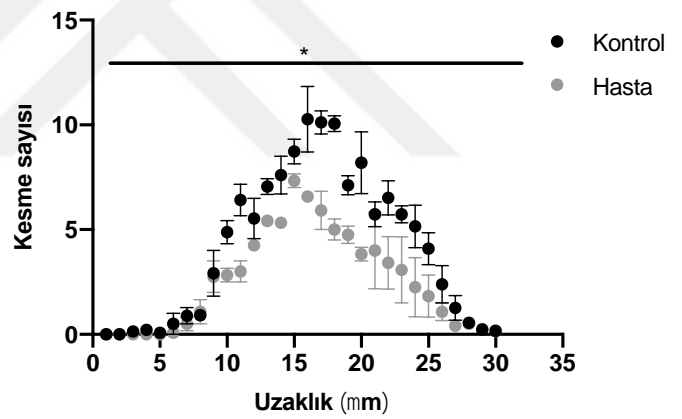
A



B



C



Şekil 4.5. SMA tip I hasta ve kontrol bireye (kontrol II) ait primer fibroblast hücrelerinde kantitatif mikroskopik analizler. **A)** Hücrelerin tamamı ve çekirdeğin etrafındaki alana ait floresan şiddet analizi sonuçları (sinyal/ μm^2) (**B ve C**) Ağ yapısı analizi sonuçları; **B)** Konsantrik halkaları kesen ortalama mikrotübül sayıları, **C)** Her bir konsantrik halkayı kesen mikrotübül sayıları. $n=2$, Student t-test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, Veri \pm SEM.

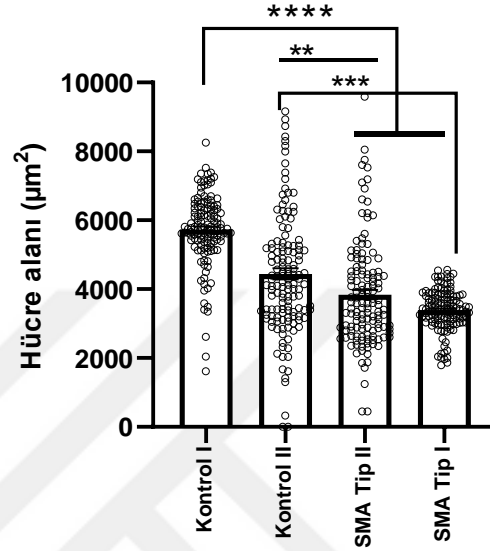
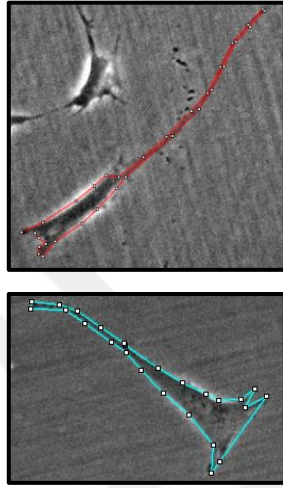
4.3. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Primer Fibroblast Hücrelerinde Morfometrik Analizler

Mikrotübüller hücre morfolojisinin düzenlenmesinde görevli olup mikrotübül stabilitesindeki değişikliklerin hücre morfolojisini etkilediği bilinmektedir (41). Bu nedenle, SMA hastalarına ve sağlıklı kontrol bireylere ait fibroblast hücrelerinin morfolojileri analiz edilmiştir. Morfolojik analizler için hücreler, 6 kuyucuklu kültür kaplarına 70.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde triplike olarak dağıtılmış, 24 saatlik inkübasyonun ardından ışık mikroskopunda görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

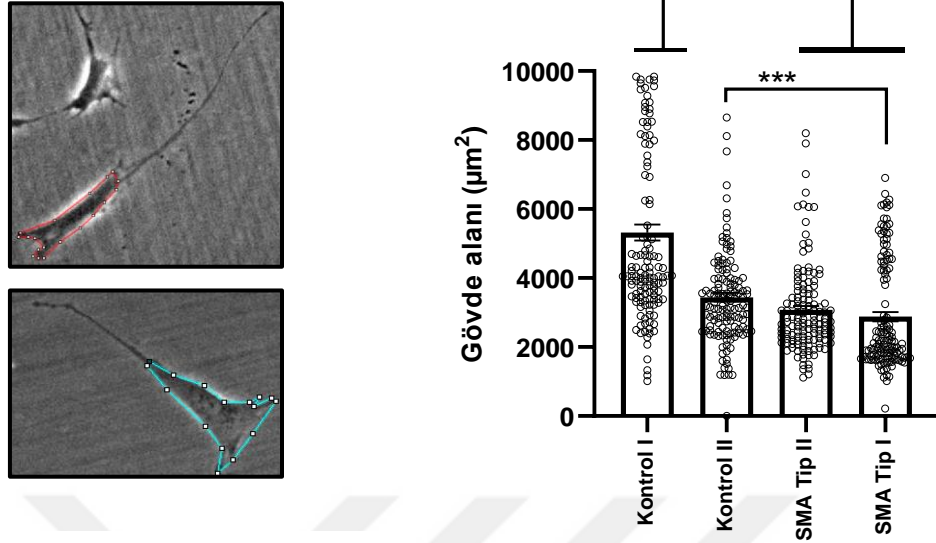
Morfolojik analizler için her kuyucuktan 3 farklı alanın fotoğrafı çekilmiştir. Yöntem kısmında detaylı olarak bahsedildiği gibi her fotoğraftan 15 hücrenin alanı, hücre gövdesi alanı, boyu, eni, boy/en oranları (*axis ratio*) ve filopod uzunlukları ImageJ programı kullanılarak ölçülmüştür. Analiz sonuçlarımıza göre;

- İki sağlıklı kontrol bireye ait fibroblast hücrelerinin morfolojilerinin birbirinden farklı olduğu, kontrol I'e ait hücrelerin kontrol II'e ait hücrelere göre daha büyük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6.-Şekil 4.11.)
- SMA hasta fibroblast (tip I ve II) hücrelerinin toplam alanları ve hücre gövdesi alanlarının her iki kontrol fibroblast hücresine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde küçük olduğu saptanmıştır. (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.)
- SMA tip I hasta fibroblast hücrelerinin boylarının her iki kontrol hücreye göre daha kısa olduğu saptanmıştır. Tip II hastasına ait hücrelerin boylarının kontrol I' den kısa olduğu saptanmış, ancak kontrol II'e göre anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.8.)
- SMA tip I hasta fibroblast hücrelerinin eninin her iki kontrol hücreye göre daha kısa olduğu saptanmıştır. Tip II hastasına ait hücrelerin eninin kontrol I' den kısa olduğu saptanmış, ancak kontrol II'e göre anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.9.)
- SMA hasta fibroblastların (tip I ve II) boy ve en uzunluklarının benzer oranlarda değişmesinden ötürü boy/en oranlarında kontrol hücrelere göre anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.10.)

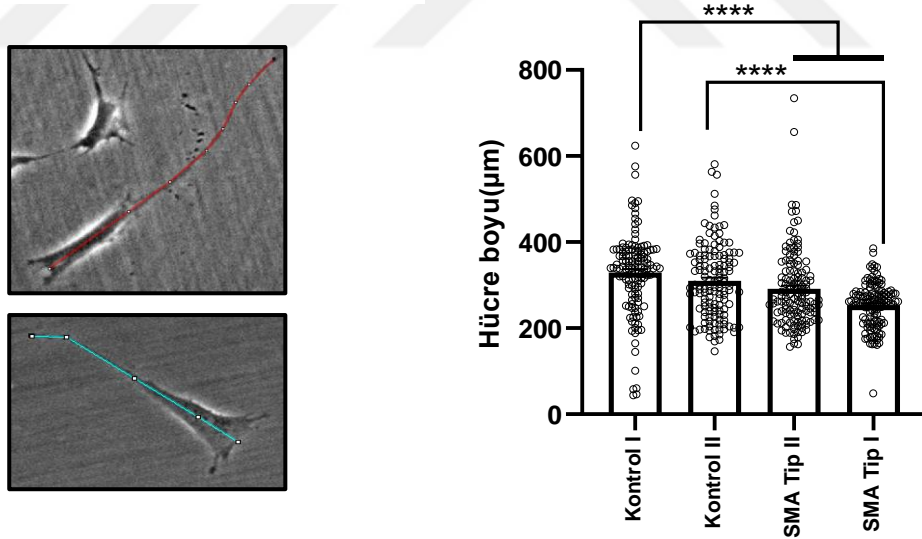
- SMA hasta fibroblastların (tip I ve II) filopod uzunluklarının kontrol I'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kısa olduğu saptanmış, kontrol II'e göre anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.11.)



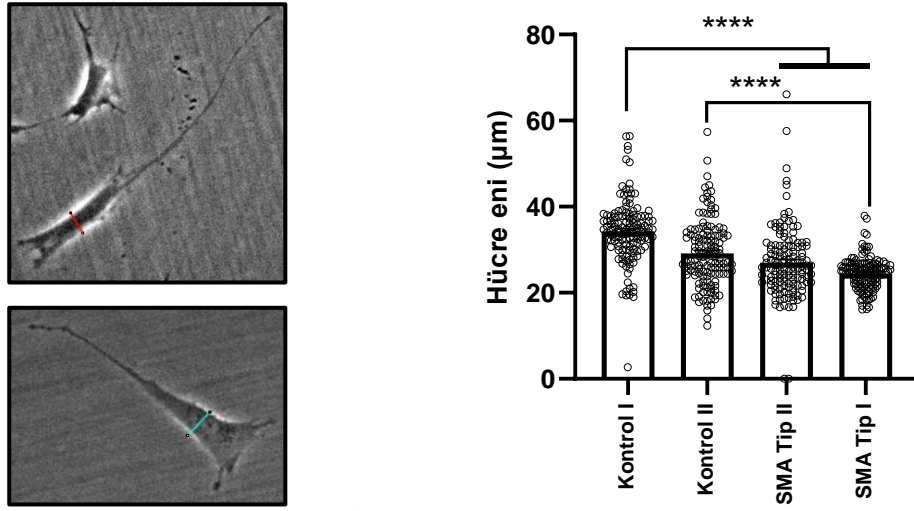
Şekil 4.6. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinde tüm hücre alanı ölçüm bölgelerini gösteren yaklaşıtırlmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları. n=3 tekrar. Kruskal Wallis Testi, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, Veri ±SEM.



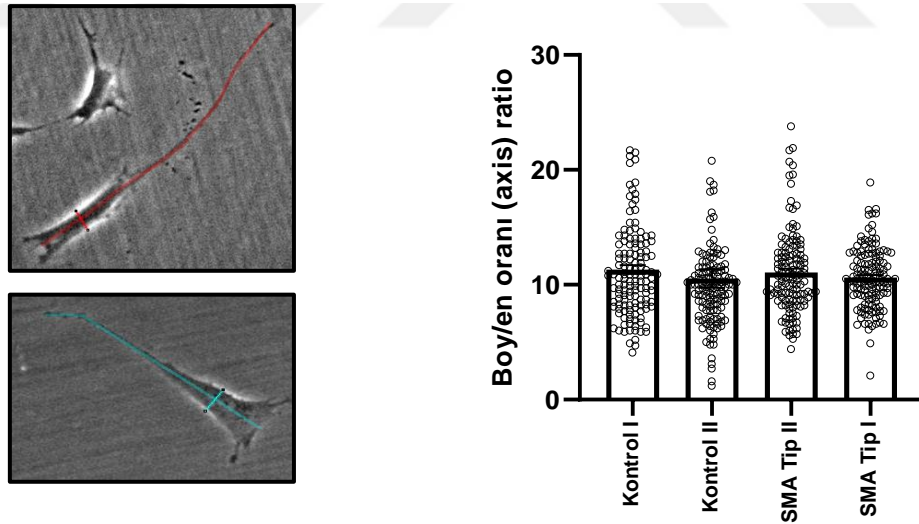
Şekil 4.7. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinde gövde alanı ölçüm bölgelerini gösteren yakınlştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları. n=3 tekrar. Kruskal Wallis Testi, ***p<0.001, ****p<0.0001, Veri ±SEM.



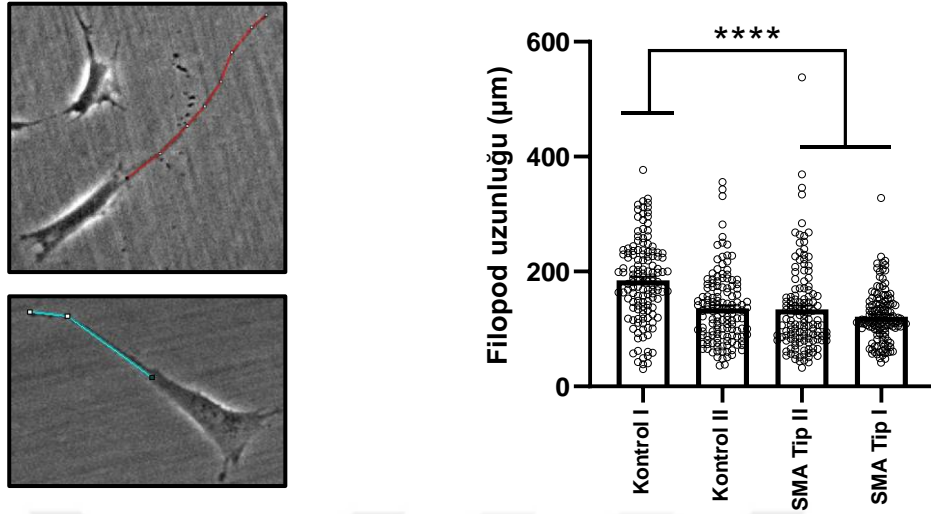
Şekil 4.8. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinin boy uzunluk ölçüm bölgelerini gösteren yakınlştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları. n=3 tekrar. Kruskal Wallis Testi, ****p<0.0001, Veri ±SEM.



Şekil 4.9. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinin en uzunluk ölçüm bölgelerini gösteren yakınlştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları. n=3 tekrar. Kruskal Wallis Testi, ****p<0.0001, Veri ±SEM.



Şekil 4.10. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinde boy/en (*axis ratio*) ölçüm bölgelerini gösteren yakınlştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları. n=3 tekrar. Kruskal Wallis Testi

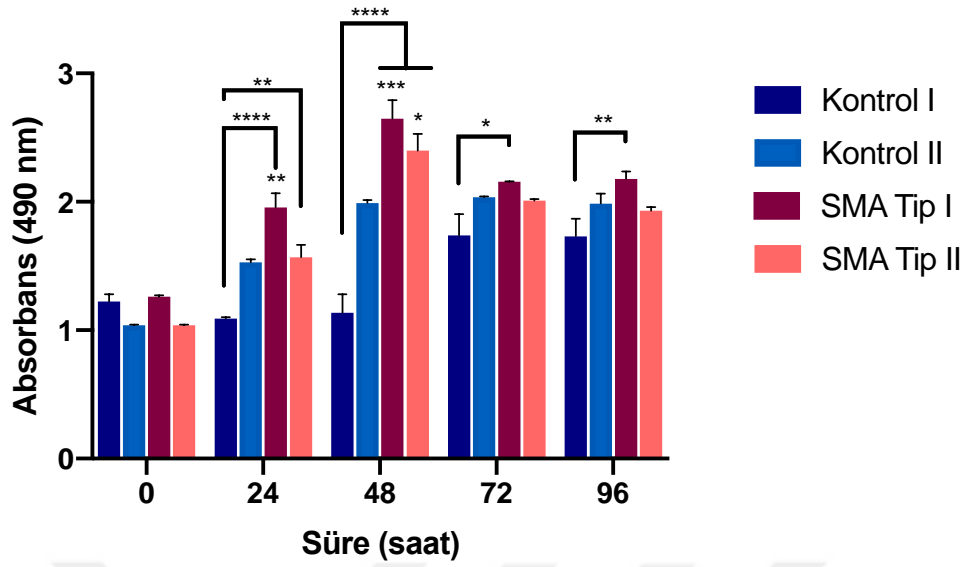


Şekil 4.11. SMA hastalarına ve sağlıklı kontrollere ait primer fibroblast hücrelerinin filopod uzunluğu ölçüm bölgelerini gösteren yakınlaştırılmış örnek fotoğraflar ve analiz sonuçları. n=3 tekrar. Kruskal Wallis Testi, ****p<0.0001, Veri ±SEM.

4.4. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Primer Fibroblast Hücrelerinin Proliferasyon Hızlarının MTS Yöntemi ile Analizi

SMA hasta hücrelerinde α -tübülün asetilasyonunda saptanan azalmanın, mikrotübüllerin fonksiyonlarını etkileyebileceği düşünülmüştür. Mikrotübüllerin hücre bölünmesinde görev alması ve α -tübülün asetilasyonundaki azalmanın hücre proliferasyonunu etkilediğinin bilinmesi nedeniyle, SMA hasta fibroblast hücrelerinin proliferasyon hızları kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (83, 84). Hücrelerin proliferasyon hızlarının analizi MTS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz, MTS bileşiğinin canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından artan NAD(P)H bağımlı dehidrogenaz enzim aktivitesi ile MTS tetrazolyum bileşiğinin indirgenerek formazan boya üretirken oluşturduğu renk değişiminin, absorbans spektrofotometresiyle ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Hücre canlılığı kaybolduğunda mitokondriyal fonksiyon azalmakta, bu nedenle tetrazolyum tuzu formazana indirgenememektedir. Formazan miktarının kültürdeki hücre sayısı ile orantılı bir şekilde değişmesi nedeniyle canlı hücre miktarı tespit edilebilmektedir (85).

Hücrelerin proliferasyon hızlarının analizi amacıyla, SMA hastalarına (tip I ve II) ve sağlıklı kontrol bireylere ait fibroblast hücreleri 96 kuyucuklu mikrolakalara 4000 hücre/kuyucuk olacak şekilde triplike olarak dağıtılmıştır. Hücrelerin proliferasyon hızları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde analiz edilmiştir. Analizler sonucunda, SMA hastalarına ait fibroblastların kontrol fibroblastlardan daha hızlı proliferere oldukları, ayrıca SMA tip I hastasına ait hücrelerin proliferasyon hızının, SMA tip II hastasına göre yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12.)



Şekil 4.12. SMA ve kontrol primer fibroblast hücrelerinin proliferasyon hızlarına ait analiz sonuçları. Two-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Veri \pm SEM

5. TARTIŞMA

Hücre iskeletinin elemanlarından biri olan mikrotübüller, mikrofilamentler ve ara filamentlerle birlikte hücre içerisinde kesintisiz bir ağ yapısı oluşturmaktadır. Mikrotübüller, polar özellikleri, dinamik yapıları ve motor proteinlerle etkileşimleri sayesinde birçok hücrel mekanizmada görev almaktadır. Mikrotübüllerin görevleri arasında; hücre morfolojisinin düzenlenmesi, organellerin yerleşimlerinin belirlenmesi, hücre içerisinde protein, RNA gibi biyomoleküller ile organellerin taşınması, ayrıca veziküler transportun gerçekleştirilmesi, hücre bölünmesi sırasında kromozomların hareketinin sağlanması ve hücre göçü yer almaktadır. Temel olarak hücre içerisine hareket kazandırmaktan ve morfolojinin korunmasından sorumlu olan mikrotübüllerin kurulumları tüm hücrelerde benzer olmakla birlikte, yapılarındaki stabil ve dinamik kısımların oranı; tübülün izotipleri, tübülün post-translasyonel modifikasyonları ve mikrotübüle bağlanan proteinlerle etkileşimleri nedeniyle değişmektedir. Mikrotübüllerin dinamiklerinin değişkenlik göstermesi, hücrelerin yapısal bütünlüklerinin korunması ve işlevleri açısından gereklidir.

SMN, tüm hücrelerde sentezlenen ve farklı hücrel mekanizmalarda görev alan bir proteindir. SMA modelleri ile yapılan çalışmalarda, SMN eksikliğinde hücre iskeletinin tüm elemanlarında yapısal ya da işlevsel bozukluklar saptanmıştır. Mikrotübüllerle ilgili sınırlı sayıda yapılan çalışmada, SMN ifadesi azaltılan hücre kültürü ve hayvan modellerinde, mikrotübüllere bağlanan proteinlerin ifade düzeylerinde ya da post-translasyonel modifikasyonlarında değişiklikler bildirilmiştir. Bu proteinlerden biri, mikrotübül depolimerizasyonunu sağlayan statmin proteini olup, ciddi seyirli bir fare modelinde ifadesi yüksek bulunmuş, tübülün polimerizasyonundaki azalma ve hatalı mitokondri transportu ile ilişkilendirilmiştir (70). Mikrotübül stabilizasyonunda görevli proteinlerden biri olan TAU proteininde ise hiperfosforilasyon bildirilmiştir (73). Anabilim Dalı'mızda daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda ise TAU ile aynı protein ailesinde yer alan MAP1B protein ifadesinde ve fosforilasyonunda, ayrıca MAP2 gen ifadesinde fare motor nöron benzeri NSC34 hücre hattında ve ciddi seyirli SMA tip I fare modeline ait omurilik dokularında artış saptanmıştır (75). Ayrıca, mikrotübül polimerizasyonunda görevli +TIP proteinlerinden biri olan EB3 protein düzeyinin de SMN eksikliğine bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir (82). SMN eksikliğinde ifadesi

ya da post-translasyonel modifikasyonu değişen bu proteinlerin tümünün mikrotübül stabilitesinin düzenlenmesinde görev alması, SMN kaybının hücrelerde mikrotübül stabilitesinin azalmasına neden olabileceğine işaret etmiştir. Bu nedenle yine Anabilim Dalı'mızda gerçekleştirilen önceki çalışmalarda, SMN ifadesinin baskılandığı NSC34 hücrelerinde mikrotübüllerin stabilitesi araştırılmış, α -tübülün detirozinasyonunda azalma saptanarak, mikrotübüllerin polimerizasyon ve de depolimerizasyonunda hatalar olduğu gösterilmiştir (hakem değerlendirmesinde). SMA modelleri ile yapılan bu çalışmalarda, mikrotübül stabilitesinin azaldığı gösterilmiş olmakla birlikte hastalara ait örneklerde daha önce araştırılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında, hastalığı ciddi seyreden SMA tip I hastasına ve daha hafif seyreden SMA tip II hastasına ait fibroblast hücrelerinde mikrotübül stabilitesi araştırılmıştır. Bağ dokunun temel hücreleri olan fibroblastlar, hastalara ait primer nöron kültürlerine erişimin mümkün olmadığı SMA gibi nörodejeneratif hastalıklarda *in-vitro* modeller olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Fibroblastlar, büyük ve yassı morfolojileri sayesinde mikrotübül yapılarının görüntülenmesi açısından avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, nöronlara benzer şekilde, içsi sitoplazmik uzantıları olan polar hücreler olmaları nedeniyle hücre morfolojisinin kurulumu çoğunlukla mikrotübüller aracılığıyla sağlanmaktadır. Fibroblastların bölünen hücreler olması ve mikrotübüllerinin nöronlara göre daha dinamik yapıda olması, mikrotübül stabilitesindeki değişimleri daha kolay belirlemeyi mümkün kılmaktadır.

Tez kapsamındaki çalışmalara ilk olarak, stabil mikrotübül belirteçleri olan α -tübülün detirozinasyon ve asetilasyon düzeylerinin Western blot analizi yapılmıştır. SMA hastalarına ait primer fibroblast hücrelerinde α -tübülün detirozinasyonunda kontrole göre anlamlı bir fark saptanmazken, α -tübülün asetilasyonunda her iki hastada da azalma gözlenmiştir. Özellikle ciddi seyirli SMA tip I hastasına ait hücrelerdeki azalma her iki sağlıklı kontrol hücreye göre de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu hücrelerde gerçekleştirilen floresan şiddet analizleri, asetillasyondaki azalmayı desteklemiş; asetillenmiş stabil mikrotübül ağının, özellikle çekirdek merkezine 16 μ m mesafeden itibaren bozulduğu saptanmıştır.

α -tübülün asetilasyonundaki azalma daha önce grubumuz tarafından SMA tip I Taiwanese fare modeline ait omurilik dokularında da saptanmıştır (yayınlanmamış veri). Benzer bulgu, farklı bir tip I fare modeline ait siyatik sinirde

ve hafif seyirli bir fare modeline ait omurilik dokusunda da bildirilmiştir (70, 81). Daha önce SMA'lı fare modellerinde gösterilen ve bu tez çalışması ile ilk defa SMA hastalarına ait hücrelerde de saptanan asetilasyon düşüklüğünün, tübülün asetilasyonunu katalizleyen α TAT1 veya deasetilasyonu katalizleyen HDAC6 aktivitesindeki değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Birçok nörodejeneratif hastalıkta, özellikle HDAC6 aktivitesine bağlı olarak α -tübülün asetilasyonunun değiştiği bilinmektedir. Örneğin, Alzheimer hastalarına ait beyin dokularında, HDAC6 protein miktarındaki artışa paralel olarak α -tübülün asetilasyonunda azalma saptanmıştır (86, 87). Klinik olarak SMA'ya benzeyen bir motor nöron hastalığı olan ALS'de ise, hastalara ait IPSC kaynaklı motor nöronlarda α -tübülün asetilasyonunda saptanan düşüklük, HDAC6 enzimi inhibe edilerek düzeltilebilmiştir (88). Charcot-Marie-Tooth hastalığına ait fare modellerinde ise periferik nöronlarda HDAC6 enzimi inhibe edilerek, α -tübülün asetilasyonundaki azalma ve hatalı gerçekleşen mitokondri transportu düzeltilebilmiştir (89). SMA hastalığına ait fare modellerinde ve tip I hastaya ait IPSC-kaynaklı motor nöronlarda yapılan çalışmalarda da aksonlarda mitokondri transportunun hatalı gerçekleştiği gösterilmiş ancak α -tübülün asetilasyonu veya HDAC6 aktivitesi ile ilişkilendirilmemiştir (90, 70).

In-vitro ve *in-vivo* SMA modelleri ile yapılan çalışmalarda SMN eksikliğinde saptanan bazı bulgular, mikrotübüllerin işlevleri ile örtüşmekle birlikte daha önce mikrotübül hataları ile ilişkilendirilmemiştir. Bu bulgulardan bir tanesi, diğer nörodejeneratif hastalıklarda da ortak olarak saptanan aksonal transport hatasıdır. SMN eksikliğinde, mitokondrilerin yanı sıra, nöromusküler kavşakta sentezlenen proteinlere ait bazı mRNA'ların da aksonal transportunun hatalı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (91). Bu mRNA'lardan biri, β -aktin mRNA'sı olup aksonal transport hatası nedeniyle büyüme bölgesi ve sinaps yapısının bozulduğu bildirilmiştir (92). Ayrıca, SMN eksikliğinde F-aktin miktarının azaldığı gösterilmiş ve endositoz mekanizmasında saptanan hatalar F-aktine bağlanan plastin 3 ve coronin 1C proteinlerinin aşırı ifadesi ile düzeltilebilmiştir (93). Aksonal transport temelde mikrotübül-aracılı olarak gerçekleşmekte ve motor proteinler görev almaktadır. Motor proteinlerin mikrotübüle kenetlenmelerinde tübülün post-translasyonlarının önemli olduğu bilinmektedir. Örneğin; kinezin-1 motor proteininin

stabil mikrotübüllere bağlandığı, asetilasyonun azalması durumunda mikrotübül ile olan bağlantısının ve hareketinin azaldığı bildirilmiştir (39). Huntington hastalığı ile yapılan bir çalışmada ise HDAC6 enzimi inhibe edilerek asetilasyon artırıldığında, kinezin-1 ve dyneinin mikrotübülle olan etkileşiminin arttığı ve transport hatalarının düzeltilebildiği bildirilmiştir (86). Bu nedenle SMN eksikliğinde saptanan ve çoğunlukla aktin dinamiğindeki değişikliklerle ilişkilendirilen endositoz ve aksonal transport hatalarının, mikrotübül stabilitesinin kaybı ile de ilişkili olması olasıdır. SMN eksikliğinde saptanan diğer bir bulgu ise, Golgi cisimciğindeki morfolojik değişikliklerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan hasta primer fibroblast hücreleriyle gerçekleştirilen bir çalışmada, kontrolde çekirdeğin yakınında kompakt şekilde bulunan Golgi cisimciğinin, hastalarda sitoplazmaya doğru yayıldığı gösterilmiştir (97). Golgi cisimciğinin morfolojik bütünlüğünün sağlanmasında mikrotübüllerin görev alması nedeniyle, SMN eksikliğinde mikrotübül stabilitesindeki azalma ile Golgi morfolojisindeki bozulmanın ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, birçok hücrede interfaz evresinde mikrotübüllerin sentrozomun yanı sıra Golgi cisimciğinden de çekirdeklenerak polimerize olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, SMN, mikrotübül ve Golgi cisimciği arasındaki mekanistik ilişkinin ilerleyen çalışmalarda detaylı olarak araştırılması gerekmektedir.

Tez çalışmaları sırasında, SMA hastalarına ait hücrelerdeki mikrotübüllerin hasara karşı direncinin kontrol hücrelere göre farklılık gösterebileceği düşünülmüş, bu amaçla hücreler soğuk ortamda bırakılarak mikrotübülleri depolimerize edilmiştir. Mikrotübüllerin soğuk-stabil kısımlarının belirlenebilmesi amacıyla α -tübülün asetilasyon ve detirozinasyon düzeyleri analiz edilmiş, SMA hastaları ve kontrol hücreler arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu bulgu, SMN eksikliğinin mikrotübüllerin soğuk-stabil kısımlarını etkilemediğine işaret etmiştir.

SMN proteini eksikliğinde hücre morfolojisinin de etkilendiği bilinmektedir. SMA'lı fare modellerinden kurulan motor nöron kültürlerinde, nöron benzeri hücre hatlarında ve hastalara ait IPSC-kaynaklı motor nöron hücrelerinde akson boyunun kısaldığı ve büyüme bölgelerinin küçüldüğü gösterilmiştir (67, 92, 94). Benzer şekilde, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen morfometrik analizlerde de SMA hastalarına ait fibroblastların en, boy, filopod uzunlukları ile alanlarının kontrole göre küçük olduğu saptanmıştır. Literatürde, hücre

morfolojisinin, α -tübülün asetilasyon düzeyinden etkilendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; *LRRK2* mutasyonu olan Parkinson hastalarına ait fibroblast hücrelerinde α -tübülün asetilasyonunun artışına bağlı olarak hücre morfolojisinin büyüdüğü gösterilmiştir (41). Başka bir çalışmada ise, tübülün asetilasyonunu katalizleyen α Tat1 enzimi *knock-out* edilmiş fare embryonik fibroblast kültüründe, α -tübülün asetilasyonun azalmasına bağlı olarak, hücre alanının küçüldüğü gösterilmiştir. Bu hücrelerde fokal adezyonun zayıfladığı, ayrıca kontak inhibisyonun kaybı nedeniyle hücre proliferasyonunun arttığı bildirilmiştir (95). Ayrıca, mikrotübül dinamiğinin kontrolünde görevli olan Tpp1 proteininin de hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rolü olduğu bildirilmiştir. Hücrelerin G1'den S-fazına geçişini düzenleyen proteinlerden biri olan Tpp1'nin HDAC6 aktivitesini düzenlediği, Tpp1 ifadesi baskılanmış hücrelerde asetilasyon düzeyinin azalmasına bağlı olarak hücre proliferasyonunun arttığı bildirilmiştir (96). Literatür bilgileri ve mikrotübüllerin hücre bölünmesindeki işlevleri göz önünde bulundurularak, asetillenmiş mikrotübüllerin kaybı nedeniyle SMA hasta hücrelerinin proliferasyonunun etkilenebileceği düşünülmüştür. Yapılan analizler SMA hastalarına ait hücrelerin kontrol hücrelere göre daha hızlı proliferere olduklarını göstermiştir. Hasta hücreleri arasında da fark saptanmış; SMA tip I hastasına ait hücrelerin tip II hastasına ait hücrelerden daha hızlı proliferere olduğu görülmüştür. Elde edilen bu bulgular değerlendirildiğinde, SMA hasta hücrelerinde stabil mikrotübüllerin azalması ve hücrelerin hızlı proliferasyonu nedeniyle hücre morfolojisinin tam olarak kurulamadığı; bu durumun hücre adhezyonunun zayıflaması nedeniyle ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasının sonucunda, SMA tip I hastasına ait primer fibroblast hücrelerinde mikrotübül stabilitesinin azaldığı saptanmış, stabilite kaybının hücre morfolojisi ve mikrotübül fonksiyonlarından biri olan hücre bölünmesini etkilediği gösterilmiştir. Daha hafif klinik ciddiyette olan SMA tip II hastasına ait hücrelerde de tübülün asetilasyonunda azalma gözlenmiş, tip I hücreler kadar belirgin olmasa da hücre morfolojisinde küçülme ve hücre proliferasyonunda artış saptanmıştır. Bu durum, mikrotübül stabilite kaybının hastalık ciddiyeti ile ilişkili olduğuna işaret etmekle birlikte daha fazla sayıda hasta hücrede çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

Son yıllarda SMA hastalığı ile yapılan çalışmalar, SMA'nın çoklu sistem hastalığı olduğu yönündeki görüşleri desteklemektedir. SMN proteini tüm hücrelerde sentezlenmekte olup kaybı hücre tiplerine göre farklı sonuçlara neden olmaktadır. Fonksiyonel SMN kaybına en hassas olan hücre tipi olan motor nöronlarda, mikrotübül stabilitesinin korunması nöron morfolojisi, aksonal transport ve sinaptik iletimin devamlılığı için önemlidir. Bu nedenle mikrotübül stabilitesinin, SMA hastalarına ait IPSC-kaynaklı motor nöronlarda, ayrıca nöron sağkalımını destekleyen astrosit ve mikroglia hücrelerinde de araştırılması, hastalıkta görülen motor nöron dejenerasyonunun mekanizmasının açıklanabilmesine katkı sağlayacaktır. Ayrıca, mikrotübül stabilitesinin SMN eksikliğinden etkilenen diğer dokularda da araştırılması, SMA patomekanizmasında mikrotübül hatalarının fonksiyonel sonuçlarının anlaşılması açısından değerli olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- Mikrotübül stabilitesinin belirteçlerinden olan asetil ve detirozin α -tübülün miktarları Western blot yöntemiyle incelenmiştir. SMA tip I hasta primer fibroblast hücrelerindeki asetil α -tübülün düzeyinin, her iki sağlıklı kontrol hücreye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. SMA tip II primer fibroblast hücrelerinde ise asetil α -tübülün düzeyinde kontrol hücrelere göre azalış gözlenmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Farklı klinik ciddiyete sahip hasta hücreleri arasında saptanan bu farklılık, α -tübülün asetilasyonunun SMN ya da hastalığı modifiye eden diğer genlerle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. α -tübülün detirozinasyon düzeyinde ise her iki tip hasta hücrelerinde kontrol hücrelere göre bir azalma gözlenmiş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- Standart kültür sıcaklığında gerçekleştirilen bu çalışmalara ek olarak, mikrotübüller soğuk uygulanarak depolimerize edilmiş ve tübülün post-translasyonel modifikasyonları araştırılmıştır. Soğuk uygulanan hasta ve kontrol hücrelerindeki asetil ve detirozin α -tübülün miktarlarının anlamlı şekilde azaldığı saptanmış olup bu bulgu mikrotübül depolimerizasyonunun gerçekleştiğine işaret etmiştir. Ancak soğuk uygulanan SMA ve kontrol primer fibroblast hücreleri karşılaştırıldığında her iki post-translasyonel modifikasyonda da anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu bulgu, hasta ve kontrol hücrelerdeki mikrotübüllerin soğukta benzer stabiliteye sahip olduklarına işaret etmiştir.
- SMA tip I hastasına ait primer fibroblastlarda asetil α -tübülün düzeyinde saptanan azalma immunfloresan boyama yöntemi ile de araştırılmıştır. Çalışmalarda asetillenmiş mikrotübüllerin çekirdek etrafında yoğunlaştığı saptanmış, floresan şiddet analizleri, Western blot sonuçlarını destekler şekilde, tip I hastasına ait hücrelerde asetil α -tübülün düzeyinde kontrole göre azalma olduğunu göstermiştir. Asetillenmiş stabil mikrotübüllerin oluşturduğu ağ yapısının hasta hücrelerde

korunamadığı, özellikle çekirdek merkezine 16 µm mesafeden itibaren bozulduğu saptanmıştır.

- α-tübülün asetilasyonundaki azalmanın ve stabil mikrotübül ağındaki değişikliklerin hücrelerin morfolojisini etkileyeceği düşünülmüş, detaylı morfometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda;
 - İki sağlıklı kontrol fibroblastın morfolojilerinin birbirinden farklı olduğu, kontrol I'e ait hücrelerin morfolojisinin kontrol II'e ait hücrelere göre daha büyük olduğu saptanmıştır.
 - SMA hasta fibroblastların (tip I ve II) total ve hücre gövdesi alanlarının her iki kontrol fibroblast hücresine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde küçük olduğu saptanmıştır.
 - SMA tip I hasta fibroblast hücrelerinin boylarının her iki kontrol hücreye göre daha kısa olduğu saptanmıştır. SMA tip II hasta fibroblast hücrelerinin boylarının kontrol I' den kısa olduğu saptanmış, ancak kontrol II'e göre anlamlı bir fark bulunmamıştır.
 - SMA tip I hasta fibroblast hücrelerinin enlerinin her iki kontrol hücreye göre daha kısa olduğu saptanmıştır. SMA tip II hastasına ait hücrelerin enlerinin kontrol I' den kısa olduğu saptanmış, ancak kontrol II'e göre anlamlı bir fark bulunmamıştır.
 - SMA hasta fibroblastların (tip I ve II) boy ve en uzunluklarının benzer oranlarda kısalmasından ötürü boy/en oranlarında (*axis ratio*) kontrol hücrelere göre anlamlı bir fark saptanmamıştır.
 - SMA hasta fibroblastların (tip I ve II) filopod uzunluklarının kontrol I'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kısa olduğu saptanmış, kontrol II'e göre anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Morfometrik analizlerden elde edilen bulgular, SMA tip I hücresinin hem tip II hasta hem de sağlıklı kontrol hücrelerden daha küçük olduğunu göstermiş olup mikrotübül stabilite kaybının hücre morfolojisini etkilediğine işaret etmiştir.

- SMA hasta hücrelerinde mikrotübül asetilasyonunda saptanan değişikliklerin mikrotübüllerin fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmüştür. Mikrotübüllerin

hücre bölünmesinde görev alması nedeniyle hücrelerin proliferasyon hızları analiz edilmiş, SMA hastalarına ait fibroblastların kontrol fibroblastlardan daha hızlı proliferasyon oldukları saptanmıştır. Ayrıca SMA tip I hastasına ait hücrelerin proliferasyon hızının, SMA tip II hastasına göre yüksek olduğu dikkati çekmiştir.

- Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, özellikle ciddi seyirli SMA tip I hastasına ait primer fibroblast hücrelerinde mikrotübül dinamiğinin hem kontrol hem de tip II hastasına ait hücrelere göre farklı olduğu gösterilmiş, bu mikrotübül stabilitesinin azaldığı ya da dinamizminin arttığı sonucuna varılmıştır.



6.2. Öneriler

Tez çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda, aşağıdaki çalışmaların yapılması önerilmektedir.

- SMA tip I hasta hücrelerinde α -tübülün asetilasyonunda saptanan azalmanın, asetilasyonu ve/veya deasetilasyonu katalizleyen enzimlerin ifadesindeki/aktivitesindeki değişiklikten kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Asetilasyondaki azalmanın mekanizmasının anlaşılabilmesi amacıyla, tübülün asetilasyonundan sorumlu α TAT1 ve deasetilasyondan sorumlu HDAC6 düzeylerinin/aktivitelerinin SMA hasta hücrelerinde kontrol ile karşılaştırmalı olarak analizi önerimizdir.
- Tez çalışmaları sonucunda SMA tip I hastalarına ait hücrelerin kontrole göre morfolojik olarak küçüldüğü ve hücrelerin proliferasyon hızlarının arttığı saptanmıştır. Bu değişikliklerin, doğrudan α -tübülün asetilasyonundaki azalmadan kaynaklandığının gösterilmesi amacıyla, deasetilasyondan sorumlu HDAC6 enziminin aktivitesinin küçük bileşiklerle inhibe edilmesi, bu yolla tübülün asetilasyonu artırılarak hücre morfolojisinin ile proliferasyonunun analiz edilmesi önerimizdir.
- Literatürde α -tübülün asetilasyonundaki azalmaya bağlı olarak fibroblast hücrelerinde fokal adezyonun azaldığı ve hücre proliferasyonunun arttığı bildirilmiştir. Bu nedenle, SMA tip I hasta hücrelerinde α -tübülün asetilasyonunda saptanan azalmanın, fokal adezyonu etkileyerek hücre proliferasyonunda artışa neden olabileceği düşünülmüştür. Sonraki çalışmalarda, SMA hasta hücrelerindeki fokal adezyonun, kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak araştırılması önerimizdir.
- α -tübülün asetilasyonunun, motor proteinlerin mikrotübüle kenetlenmesini düzenlediği, asetilasyondaki azalmanın transport hatalarına neden olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, SMA hasta primer fibroblast hücrelerinde, tübülün asetilasyonunda saptanan azalmanın, hücre içi veziküler transportu ve organel yerleşimlerini etkileyebileceği düşünülmüş olup sonraki çalışmalarda araştırılması önerimizdir.

- Tez çalışmasının sonuçları, özellikle ciddi seyirli SMA tip I hastasına ait primer fibroblast hücrelerinde mikrotübül stabilitesinin azaldığına işaret etmektedir. Bu bulgunun daha fazla hastaya ait fibroblast hücrelerinde, ayrıca hastalara ait farklı hücre tiplerinde (ör; İPSC-kökenli motor nöron, astrosit vb) gösterilmesi, mikrotübül stabilitesindeki hataların fonksiyonel sonuçlarının araştırılması ve SMA patomekanizmasındaki öneminin anlaşılması açısından katkı sağlayacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Fletcher, D. a, & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanisms and cytoskeleton. *Nature*,463(7280), 485–492.
2. Mostowy, S., & Cossart, P. (2012). Septins: The fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 183–194.
3. Svitkina, T. (2018). The actin cytoskeleton and actin-based motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1), 1–22.
4. Herrmann, H., & Aebi, U. (2016). Intermediate filaments: Structure and assembly. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(11), 1–22.
5. Bora, G., Koyunoğlu, D., & Sunguroğlu, M. (2019). Microtubule Structure, Organization and Defects: Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 39(2).
6. Brouhard, G. J., & Rice, L. M. (2018). Microtubule dynamics: An interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7), 451–463.
7. Sanchez, Ariana D; Feldman, J. L. (2015). Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non- centrosomal sites. *Curr Opin Cell Biol*, 40(4), 1291 1296.
8. Muroyama, A., & Lechler, T. (2017). Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development (Cambridge)*, 144(17), 3012–3021.
9. Schulze, E., & Kirschner, M. (1987). Dynamic and stable populations of microtubules in cells. *The Journal of Cell Biology*, 104(2), 277–288.
10. Desai, A., & Mitchison, T. J. (1997). Microtubule Polymerization Dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), 83–117.
11. Meiring, J. C. M., Shneyer, B. I., & Akhmanova, A. (2020). Generation and regulation of microtubule network asymmetry to drive cell polarity. *Current Opinion in Cell Biology*, 62, 86–95.
12. Conde, C., & Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 319–332.
13. Baas, P. W., Rao, A. N., Matamoros, A. J., & Leo, L. (2016). Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskeleton*, 73(9), 442–460.
14. Dubey, J., Ratnakaran, N., & Koushika, S. P. (2015). Neurodegeneration and microtubule dynamics: Death by a thousand cuts. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(September), 1–15.

15. Meunier, S., & Vernos, I. (2012). Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions? *Journal of Cell Science*, 125(12), 2805–2814.
16. Matamoros, A. J., & Baas, P. W. (2016). Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system. *Brain Research Bulletin*, 126, 217–225.
17. Delphin, C., Bouvier, D., Seggio, M., Couriol, E., Saoudi, Y., Denarier, E., Andrieux, A. (2012). MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35127–35138.
18. Ochoa, C. D., Stevens, T., & Balczon, R. (2011). Cold exposure reveals two populations of microtubules in pulmonary endothelia. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(1), 132–139.
19. Andrieux, A., Salin, P. A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, Schweitzer, A., Job, D. (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes and Development*, 16(18), 2350–2364.
20. Wallin, M., & Strömberg, E. (1995). Cold-Stable and Cold-Adapted Microtubules. *International Review of Cytology*, 157(C), 1–31.
21. Janke, C., & Magiera, M. M. (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(6), 307–326.
22. Wloga, D., Joachimiak, E., & Fabczak, H. (2017). Tubulin post-translational modifications and microtubule dynamics. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10).
23. Janke, C. (2014). The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions. *Journal of Cell Biology*, 206(4), 461–472.
24. Janke, C., & Kneussel, M. (2010). Tubulin post-translational modifications: Encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends in Neurosciences*, 33(8), 362–372.
25. Song, Y., & Brady, S. T. (2015). Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 125–136.
26. Roll-Mecak, A. (2019). How cells exploit tubulin diversity to build functional cellular microtubule mosaics. *Current Opinion in Cell Biology*, 56, 102–108.
27. Chakraborti, S., Natarajan, K., Curiel, J., Janke, C., & Liu, J. (2016). The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease. *Cytoskeleton*, 73(10), 521–550.
28. Eshun-Wilson, L., Zhang, R., Portran, D., Nachury, M. V., Toso, D. B., Löhr, T., Nogales, E. (2019). Effects of α -tubulin acetylation on

- microtubule structure and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(21), 10366–10371.
29. Al-Bassam, J., & Corbett, K. D. (2012). α -Tubulin acetylation from the inside out. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(48), 19515–19516.
 30. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
 31. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11, 437–444.
 32. Janke, C., & Montagnac, G. (2017). Minireview Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Current Biology*, 27(23), R1287–R1292.
 33. Prota, A. E., Magiera, M. M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., Steinmetz, M. O. (2013). Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *Journal of Cell Biology*, 200(3), 259–270.
 34. Nieuwenhuis, J., & Brummelkamp, T. R. (2019). The Tubulin Detyrosination Cycle: Function and Enzymes. *Trends in Cell Biology*, 29(1), 80–92.
 35. Halpain, S., Dehmelt, L. 2006. “The MAP1 family of microtubule-associated proteins”, *Genome Biology* , 7(6), 224.
 36. Poulain, F.E., Sobel, A. 2010. “The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players”, *Molecular and Cellular Neuroscience* , 43(1), 15-32
 37. Goold, R. G., Owen, R., & Gordon-Weeks, P. R. (1999). Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *Journal of Cell Science*, 112(19), 3373–3384.
 38. C. Ballatore, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, “Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer’s disease and related disorders,” *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 8, no. 9, pp. 663–672, 2007.
 39. Reed, N. A., Cai, D., Blasius, T. L., Jih, G. T., Meyhofer, E., Gaertig, J., & Verhey, K. J. (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. *Current Biology*, 16(21), 2166–2172.
 40. Franker, M. A. M., & Hoogenraad, C. C. (2013). Microtubule-based transport -basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *Journal of Cell Science*, 126(11), 2319–2329.
 41. Cartelli, D., Goldwurm, S., Casagrande, F., Pezzoli, G., & Cappelletti, G. (2012). Microtubule destabilization is shared by genetic and

- idiopathic Parkinson's disease patient fibroblasts. *PLoS ONE*, 7(5), 1–12.
42. Pellegrini, L., Wetzel, A., Grannó, S., Heaton, G., & Harvey, K. (2017). Back to the tubule: microtubule dynamics in Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(3), 409–434.
 43. Heo, K., Lim, S. M., Nahm, M., Kim, Y. E., Oh, K. W., Park, H. T., ... Lee, S. (2018). A de novo RapGEF2 variant identified in a sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient impairs microtubule stability and axonal mitochondria distribution. *Experimental Neurobiology*, 27(6), 550–563.
 44. Carrera, L. A. M., Gabriel, E., Donohoe, C. D., Mariappan, A., Storbeck, M., Uhlirova, M., Gopalakrishnan, J., Wirth, B. (2018). *Novel insights into SMALED2: BICD2 mutations increase microtubule stability and cause defects in axonal and NMJ development*. 27(10), 1772–1784.
 45. Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2015). Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. *Neuron*, 87(3), 492–506.
 46. Westermann, S., Weber, K., 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 938–947.
 47. Howes, S. C., Alushin, G. M., Shida, T., Nachury, M. V., & Nogales, E. (2014). Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Molecular Biology of the Cell*, 25(2), 257–266.
 48. Quinones GB et al. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from deetyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Molecular Biology of the Cell* (2011)
 49. Flunt D, Andreadis N, Menadue C, Welsh AW. Clinical commentary: obstetric and respiratory management of pregnancy with severe spinal muscular atrophy. *Obstet Gynecol Int* 2009;2009:942301.
 50. Pearn, J. (1980). Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet*, 1(8174), 919-922.
 51. Simic, G. (2008). Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathologica*, 116(3,) 223-234.
 52. Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmson KC, Daniels RJ, et al. Genetic mapping of Chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-q13.3. *Nature* 1990; 344:540-1.
 53. Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, et al. Structure and organization of the human survival motor neuron (SMN) gene. *Genomics* 1996; 32:479-82.
 54. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1177-83.

55. Wirth, B., Herz, M., Wetter, A., Moskau, S., Hahnen, E., Rudnik-Schöneborn, S., Wienker, T., Zerres, K., Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implication for genetic counseling, *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 1340–1356, 1999.
56. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, et al. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002;70:358-368.
57. Coovert D, Le T, McAndrew P, Strasswimmer J, Crawford T, Mendell J, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1205-14.
58. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neuron protein. *EMBO J* 1996; 15:3555-65
59. Schmid, A., DiDonato, C.J. (2007). Animal models of spinal muscular atrophy. *Journal of Child Neurology*, 22(8), 1004-1012.
60. Torres-Benito, L., Ruiz, R., Tabares, L. (2012). Synaptic defects in spinal muscular atrophy animal models. *Developmental Neurobiology*, 72(1), 126-133.
61. Coady, T.H., Lorson, C.L. (2011). SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2(4), 546-564.
62. Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G. Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol* 2007; 22:990-4.
63. Singh, R. N., Howell, M. D., Ottesen, E. W., & Singh, N. N. (2017). Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(3), 299–315.
64. Jablonka, S., Karle, K., Sandner, B., Andreassi, C., von Au, K., Sendtner, M. (2006). Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 15(3), 511-518.
65. Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kroning, A.K., Karle, K., Monani, U.R. ve diğerleri. (2003). Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *Journal of Cell Biology*, 163(4), 801-812.
66. Chang, T., Zheng, W., Tsark, W., Bates, S., Huang, H., Lin, R.J. ve diğerleri. (2011). Brief report: phenotypic rescue of induced pluripotent stem cell-derived motoneurons of a spinal muscular atrophy patient. *Stem Cells*, 29(12), 2090-2093.
67. Bowerman, M., Shafey, D., Kothary, R. (2007). Smn Depletion Alters Profilin II Expression and Leads to Upregulation of the RhoA/ROCK

Pathway and Defects in Neuronal Integrity. *Journal of Molecular Neuroscience*, 32(2), 120-131.

68. McWhorter, M.L., Monani, U.R., Burghes, A.H., Beattie, C.E. (2003). Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *Journal of Cell Biology*, 162(5), 919-931.
69. Oprea, G.E., Krober, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Muller, S., Krawczak, M. ve diğerleri. (2008). Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*, 320(5875), 524-527.
70. Torres-Benito, L., Neher, M.F., Cano, R., Ruiz, R., Tabares, L. (2011). SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals. *PLoS One*, 6(10), e26164.
71. Hensel, N., Stockbrügger, I., Rademacher, S., Broughton, N., Brinkmann, H., Grothe, C., Claus, P. 2014. "Bilateral crosstalk of rho- and extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) pathways is confined to an unidirectional mode in spinal muscular atrophy (SMA)", *Cell Signalling*, 26(3), 540-8.
72. Oprea, G.E., Krober, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Muller, S., Krawczak, M., Bassell G.J., Beattie, C.E., Wirth, B. 2008. "Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy", *Science*, 320(5875), 524-527.
73. Miller N., Feng, Z., Edens B.M., Yang, B., Shi, H., Sze, C.C., Hong, B.T., Su, S.C., Cantu, X.A., Topczewski, J., Crawford, T.O., Ko, C.P., Sumner, C.J., Ma, L., Ma, X.C. 2015. "Non-Aggregating Tau Phosphorylation by Cyclin-Dependent Kinase 5 Contributes to Motor Neuron Degeneration in Spinal Muscular Atrophy", *The Journal of Neuroscience*, 35(15), 6038–6050.
74. Wen, H.L., Lin, Y.T., Ting, C.H., Lin-Chao, S., Li, H., Hsieh-Li, H.M. 2010. "Stathmin, a microtubule destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy", *Human Molecular Genetics*, 19(9), 1766-1778.
75. Bora, G., Sucularlı, C., Hensel, N., Claus, P., & Yurter, H. E. (2019). Investigations of Microtubule-associated Protein 2 Gene Expression in Spinal Muscular Atrophy. *The Journal of Pediatric Research*, 6(2), 148–154.
76. Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, et al. Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*. 2008;17(16):2552–2569.
77. Kong L, Wang X, Choe DW, et al. Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(3):842–851.

78. Dachs E, Hereu M, Piedrafita L, Casanovas A, Calderó J, Esquerda JE. Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2011;70(6):444–461.
79. Cifuentes-Diaz, C. (2002). Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Human Molecular Genetics*, 11(12), 1439–1447.
80. Fuller, H. R., Mandefro, B., Shirran, S. L., Gross, A. R., Kaus, A. S., Botting, C. H., Sareen, D. (2016). Spinal muscular atrophy patient iPSC-derived motor neurons have reduced expression of proteins important in neuronal development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(JAN2016), 1–15.
81. Villalón, E., Kline, R. A., Smith, C. E., Lorson, Z. C., Osman, E. Y., O'Day, S., Lorson, C. L. (2019). AAV9-Stathmin1 gene delivery improves disease phenotype in an. *Hum Mol Genet*, 28(22), 3742–3754.
82. Koyunoğlu, D., Survival Motor Nöron Proteini Eksikliğinin Mikrotübül Pozitif Uç Proteinleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019.
83. Schofield, A. V., Gamell, C., Suryadinata, R., Sarcevic, B., & Bernard, O. (2013). Tubulin polymerization promoting protein 1 (Tppp1) Phosphorylation by Rho-associated coiled-coil kinase (Rock) and cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) inhibits microtubule dynamics to increase cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7907–7917.
84. Aguilar, A., Becker, L., Tedeschi, T., Heller, S., Iomini, C., & Nachury, M. V. (2014). α -tubulin K40 acetylation is required for contact inhibition of proliferation and cell-substrate adhesion. *Molecular Biology of the Cell*, 25(12), 1854–1866.
85. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In G. S. Sittampalam (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
86. Simões-Pires, C., Zwick, V., Nurisso, A., Schenker, E., Carrupt, P. A., & Cuendet, M. (2013). HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: What makes it different from the other HDACs? *Molecular Neurodegeneration*, 8(1).
87. Govindarajan, N., Rao, P., Burkhardt, S., Sananbenesi, F., Schlüter, O. M., Bradke, F., Fischer, A. (2013). Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 5(1), 52–63.
88. Guo, W., Naujock, M., Fumagalli, L., Vandoorne, T., Baatsen, P., Boon, R., Van Den Bosch, L. (2017). HDAC6 inhibition reverses axonal transport defects in motor neurons derived from FUS-ALS patients. *Nature Communications*, 8(1), 1–14.

89. Benoy, V., vanden Berghe, P., Jarpe, M., van Damme, P., Robberecht, W., & van den Bosch, L. (2017). Development of Improved HDAC6 Inhibitors as Pharmacological Therapy for Axonal Charcot–Marie–Tooth Disease. *Neurotherapeutics*, 14(2), 417–428.
90. Xu, C.-C., Denton, K. R., Wang, Z.-B., Zhang, X. & Li, X.-J. Abnormal mitochondrial transport and morphology as early pathological changes in human models of spinal muscular atrophy. *Dis. Model. Mech.* 9, 39–49 (2016).
91. Fallini, C., Donlin-Asp, P. G., Rouanet, J. P., Bassell, G. J., & Rossoll, W. (2016). Deficiency of the survival of motor neuron protein impairs mrna localization and local translation in the growth cone of motor neurons. *Journal of Neuroscience*, 36(13), 3811–3820.
92. Rossoll, W., Jablonka, S., Andreassi, C., Kröning, A. K., Karle, K., Monani, U. R., & Sendtner, M. (2003). Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *Journal of Cell Biology*, 163(4), 801–812.
93. Hosseinibarkooie, S., Peters, M., Torres-Benito, L., Rastetter, R. H. H., Hupperich, K., Hoffmann, A., Wirth, B. (2016). The Power of Human Protective Modifiers: PLS3 and CORO1C Unravel Impaired Endocytosis in Spinal Muscular Atrophy and Rescue SMA Phenotype. *American Journal of Human Genetics*, 99(3), 647–665.
94. Corti, S., Nizzardo, M., Simone, C., Falcone, M., Nardini, M., Ronchi, D., Comi, G. P. (2012). Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Science Translational Medicine*, 4(165).
95. Aguilar, A., Becker, L., Tedeschi, T., Heller, S., Iomini, C., & Nachury, M. V. (2014). α -tubulin K40 acetylation is required for contact inhibition of proliferation and cell-substrate adhesion. *Molecular Biology of the Cell*, 25(12), 1854–1866.
96. Schofield, A. V., Gamell, C., Suryadinata, R., Sarcevic, B., & Bernard, O. (2013). Tubulin polymerization promoting protein 1 (Tppp1) Phosphorylation by Rho-associated coiled-coil kinase (Rock) and cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) inhibits microtubule dynamics to increase cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7907–7917.
97. Custer, S. K., Foster, J. N., Astroski, J. W., & Androphy, E. J. (2019). Abnormal Golgi morphology and decreased COPI function in cells with low levels of SMN. *Brain Research*, 1706, 135–146.
98. Bora, G., Yeşbek Kaymaz, A., Bekircan Kurt, C. E., Haliloğlu, V. G., Topaloğlu, H. A., Erdem Yurter, H., & Erdem Özdamar, S. (2018). Recent therapeutic developments in spinal muscular atrophy. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 48(2), 203–211.

8. EKLER

EK-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni.



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1313

Konu :

02.07.2019

Dr. Öğr. Üyesi Gamze BORA
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Dr. Öğr. Üyesi BORA,

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz GO 19/722 kayıt numaralı ve "*Spinal Müsküler Atrofi Hastalarının Fibroblast Kültürlerinde Mikrotübül Stabilitesinin Araştırılması*" başlıklı proje Kurulumuzun 02.07.2019 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, çalışmanın ticari olarak temin edilen hücre hatlarında tamamlanacağı primer hücre kültürlerinin kullanılmayacağı görülmüştür. Gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tip çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

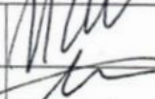
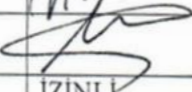

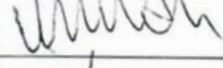
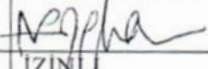
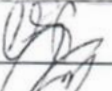
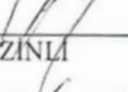
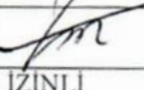

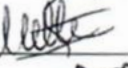
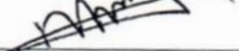
Bu yazı ilgili protokolün etik açıdan incelendiğini belirtmek için Etik Kurul kararı yerine geçmek üzere hazırlanmıştır.

Bilgilerinize rica ederim

Prof. Dr. Nürten AKARSU
Başkan

EK _____ :
Toplantı Katılım Tutanağı

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
02/07/2019 tarih ve 2019/17 no'lu toplantı
KATILIM LİSTESİ

Prof. Dr. A. Nurten AKARSU(Başkan)	
Prof. Dr. Sevda MÜFTÜOĞLU	
Prof. Dr. Yıldırım SARA	İZİNLİ
Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	
Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	İZİNLİ
Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	
Prof. Dr. Necdet SAĞLAM	
Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	İZİNLİ
Doç. Dr. Gözde GİRGİN	
Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	
Doç. Dr. Can Ebru KURT	İZİNLİ
Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	
Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	İZİNLİ
Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	
Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	
Av. Meltem ONURLU	

EK-2 Tez Orjinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI; SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ HASTALARININ FİBROBLAST KÜLTÜRLERİNDE MİKROTÜBÜL STABİLİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI; PELİN ZOBAROĞLU

DOSYANIN TOPLAM SAYFASI; 102

Spinal müsküler atrofi hastalarının fibroblast kültürlerinde mikrotübül stabilitesinin araştırılması- Pelin ZOBAROĞLU - Yüksek Lisans Tezi

ORJİNALLİK RAPORU

%4	%3	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%1
2	pt.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
4	ira.le.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
5	www.tip.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	akbis.adu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	library.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.eshg.org	

EK-3 Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Pelin Zobaroglu
Ödev başlığı: SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ HAST..
Gönderi Başlığı: Spinal müsküler atrofi hastalarının f...
Dosya adı: t_K_It_rlerinde_Mikrot_b_l_Stabilite...
Dosya boyutu: 3.43M
Sayfa sayısı: 102
Kelime sayısı: 16,402
Karakter sayısı: 114,184
Gönderim Tarihi: 03-Eyl-2020 09:22PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1379057352



9. ÖZGEÇMİŞ

PELİN ZOBAROĞLU

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi ve Yeri: 17.11.1994 / SİVAS

Yazışma Adresi: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
06100, Sıhhiye, ANKARA.

Tel: 0505 6139799

E-mail: pelinzobaroglu@hacettepe.edu.tr

EĞİTİM DURUMU

2018 – 2020

Yüksek lisans

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Temel Tıp Bilimleri Bölümü,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Tez Başlığı:

Spinal Müsküler Atrofi Hastalarının Fibroblast Kültürlerinde
Mikrotübül Stabilitesinin Araştırılması

2012 – 2018

Lisans

Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü, Ankara

2008 – 2012

Ortaöğrenim

Keçiören Anadolu Lisesi, Ankara

STAJLAR

9 Temmuz- 10 Eylül 2018

Erasmus+ Personel-Eğitim Alma Hareketliliği
Charles Üniversitesi, Bitki Biyolojisi
Prag/Çekya

19 Haziran – 4 Ağustos 2017

Moleküler Genetik Yaz Stajı
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara

PROJELER

- Spinal Müsküler Atrofi Hastalarının Fibroblast Kültürlerinde Mikrotübül Stabilitesinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Yüksek Lisans Tez Projesi, *Tez öğrencisi* (Yürütücü: Dr. Öğr. Üyesi Gamze Bora)
- Mikrotübül Asosiye Protein Düzeylerinin *in-vitro* Spinal Müsküler Atrofi Modelinde Araştırılması. TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi, *Bursiyer* (Yürütücü: Dr. Öğr. Üyesi Gamze Bora)
- Polikistik over sendromu fizyopatolojisinde ovarian hippo-signaling yolağının rolünün araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Kapsamlı Araştırma Projesi, *Araştırmacı* (Yürütücü: Prof. Dr. Lale Karakoç Sökmensüer)

BURSLAR

- Erasmus+ Personel-Eğitim Alma Hareketliliği, Avrupa Birliği Ofisi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi ve Türkiye Ulusal Ajansı. Charles Üniversitesi, Bitki Biyolojisi, Prag/Çekya (Temmuz- Eylül 2018)
- Mikrotübül Asosiye Protein Düzeylerinin *in-vitro* Spinal Müsküler Atrofi Modelinde Araştırılması. TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projesi. (2019-devam ediyor)

POSTER SUNUMU

Pelin Zobaroglu, Gamze Bora, Hayat Erdem Yurter. 'Is microtubule stability altered in spinal muscular atrophy patient fibroblast cells? EMBO | EMBL Symposium (Virtual): Microtubules: From Atoms to Complex Systems, 3-6 Haziran 2020

DERLEME

Pelin Zobaroglu, Gamze Bora. Reshaping Cytoskeleton: Different Acts of Modulatory Compounds. İstanbul Journal of Pharmacy, 2020 (yayına kabul edilmiştir.)

ÜYELİKLER

2019- devam ediyor. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

KATILINAN KONGRELER

- Cure SMA Basic and Clinical Research Virtual Session, Virtual Conference, 11 - 12 Haziran 2020
- EMBO | EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems, Virtual Conference, 3 - 6 Haziran 2020
- Erkek infertiletesi için kök hücreler 'She 4 He', Hacettepe Üniversitesi Kültür Merkezi Toplantı Salonu, Ankara, Aralık 2019
- 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul, Eylül 2019
- Horizons in Molecular Biology and Genetics of Turkey, Bilkent University, Ankara, Nisan 2019
- 5. Bilim Günleri, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Nisan 2018
- 12th Aykut Kence Evolution Conference of Turkey, Ankara, Şubat 2018
- Kampüs Gelişim Günleri, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Şubat 2017