



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FENİLKETONÜRİ HASTALIĞINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kadriye BARDAK

**Samsun
Haziran-2019**



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FENİLKETONÜRİ HASTALIĞINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kadriye BARDAK

Danışman
Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ

Samsun
Haziran-2019

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kadriye BARDAK tarafından Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ Danışmanlığında hazırlanan Fenilketonüri Hastalığında Endoplazmik Retikulum Stresinin Araştırılması başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 26 /07 /2019 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Özgür K. TUNÇEL
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Zeliha Cansel ÖZMEN
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

... /... /...

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana destek olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ' e, araştırmaya ait örneklerin toplanması sırasında yardımını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Işıl ÖZER' e, her konuda desteğini gördüğüm sayın Doç.Dr. Özgür Korhan TUNÇEL' e, takım arkadaşlarım değerli Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanları Neslihan ORGEN, Orhan EROL, Halit PARLAK ve Ebru TANRIKULU' na teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan sevgili annem, babam, kardeşlerim ve varlıklarıyla bana güç katan canım yeğenlerim Mustafa Hamza GİRİŐKEN, Mustafa Mert BALLIKAYA ve Zeynep Naz BALLIKAYA' ya sevgilerimle...

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.18.015 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

FENİLKETONÜRİ HASTALIĞINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Fenilketonüri (FKÜ) fenilalanini (Phe) tirozine (Tyr) katalize eden fenilalanin hidroksilaz (PAH) enziminin aktivitesini etkileyen mutasyonlardan kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. Tedavi edilmezse, kanda ve dokularda biriken aşırı fenilalanin mental retardasyona neden olur. Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikimi endoplazmik retikulum (ER) homeostazını etkiler ve ER stresine yol açar. Hücreler ER stresine katlanmamış protein yanıtı (UPR) aktivasyonu ile reaksiyon verir. Stres çözülemezse hücre ölümüne neden olur. Amacımız FKÜ’ de mutant PAH proteinlerinin neden olduğu yüksek Phe düzeylerinin lökositlerde ER stresine neden olup olmadığını araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Tanı almış ve tedavisi izlenen hastalar çalışmaya dahil edildi. Çalışma grupları; sağlıklı kontrol (n=10), hiperfenilalaninemi (HPA, n=9), BH₄-yanıtlı FKÜ (n=8) ve klasik FKÜ (n=14) olmak üzere 4’ e ayrıldı. Plazma Phe ve Tyr düzeyleri HPLC metodu ile, lökositlerde ER stres belirteçleri GRP78 ve CHOP düzeyleri ELISA metodu ile ölçüldü.

Bulgular: Phe düzeyleri HPA grubuna kıyasla klasik FKÜ grubunda (p=0.026) ve kontrol grubuna kıyasla BH₄-yanıtlı FKÜ ve klasik FKÜ gruplarında istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (p=0.006, p<0.001). ER stres belirteçleri GRP78 ve CHOP düzeyleri için kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (p>0.05). GRP78 ile Phe düzeyleri arasında negatif korelasyon tespit edildi (r= -0.362, p= 0.02).

Sonuç: FKÜ tedavisinde kan Phe düzeyinin 600 µmol/ l’ nin altında olması esastır. Diyet tedavisi alan hastalardaki Phe düzeyleri lökositlerde ER strese yol açmıyor olabilir. FKÜ’ de ER stresinin aydınlatılabilmesi için hastalara ilk tanı konulduğu zaman alınan lökositlerde ya da deneysel hayvan modellerinde beyin dokusu kullanılarak yapılan çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Fenilketonüri; fenilalanin; ER stres; lökositler

Kadriye BARDAK, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Samsun, Haziran-2019

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN PHENYLKETONURIA DISEASE

Aim: Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive disease resulted from mutations affecting the activity of phenylalanine hydroxylase (PAH) enzyme that catalyzes phenylalanine (Phe) to tyrosine (Tyr). If it is left untreated, phenylalanine excessively accumulated in blood and tissues cause mental retardation. Accumulation of unfolded or misfolded proteins affect endoplasmic reticulum (ER) homeostasis and lead to ER stress. Cells biochemically react to ER stress by activation of the unfolded protein response (UPR). ER stress results in cell death, if the stress state cannot be resolved. The aim of this study was to investigate whether high levels of Phe caused by mutant PAH proteins in PKU disease induce ER stress in leukocytes.

Material and Method: Patients who have received diagnosis and treatment has been included in the study. The study groups were divided into 4 groups as healthy control (n= 10), hyperphenylalaninemia (HPA, n= 9), BH₄-responsive PKU (n= 8) and classical PKU (n= 14). Phe and Tyr levels in the plasma of subjects were determined by using HPLC method. ER stress markers GRP78 and CHOP were measured by ELISA in leukocytes isolated from whole blood.

Results: Phe levels were statistically high estimated in BH₄-responsive PKU and classic PKU groups as compared to healthy control (p=0.006, p<0.001) and also in classic PKU group according to HPA group (p=0.026). However, there was no statistically significant difference between control and patient groups in terms of GRP78 and CHOP levels associated with ER stress in leukocytes (p>0.05). GRP78 was also negatively correlated with phe levels (r= -0.362, p= 0.02).

Conclusion: The amount of blood phe below 600 µmol/ l is essential for the treatment of PKU. Phe levels in patients receiving dietary therapy may not cause ER stress in leukocytes. To show ER stress in PKU, studies using leukocytes taken from when patients were first diagnosed or brain tissue in experimental animal models are needed.

Keywords: Phenylketonuria; phenylalanine; ER stress; leukocytes

Kadriye BARDAK, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATF3	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 3
ATF4	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 4
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 6
BH₂	: Dihidrobiyopiterin
BH₄	: Tetrahidrobiyopiterin
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CHOP	: C / EBP homolog proteini
CRP	: C-reaktif protein
DHPR	: Dihidropteridin redüktaz
eIF2α	: Ökaryotik translasyon başlatma faktörü
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: Endoplazmik retikulum ile ilişkili protein yıkımı
FKÜ	: Fenilketonüri
GADD34	: Büyüme durması ve DNA hasarına neden olan protein
GDP	: Guanozin difosfat
GMP	: Glikomakropeptit
GRP78	: Glikoz ile düzenlenen protein 78
GRP94	: Glikoz ile düzenlenen protein 94
GTP	: Guanozin trifosfat
GTPCH 1	: GTP siklohidrolaz I
HPA	: Hiperfenilalaninemi
HPLC	: Yüksek performanslı likit kromatografisi
IRE1	: İnositol gerektiren enzim 1
LAT1	: Büyük nötral amino asit taşıyıcısı
LNAA	: Büyük nötral amino asit (Large Neutral Amino Acid)
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
PAH	: Fenilalanin hidroksilaz
PAL	: Fenilalanin amonyak liyaz
PCD	: Pterin-4a-karbinolamin dehidrataz
PEG-PAL	: Polietilenglikol ile konjuge PAL
PERK	: RNA' ya bağımlı protein kinaz benzeri ER kinaz

Phe	: Fenilalanin
PTPS	: 6-piruvoil-tetrahidropiterin sentaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SR	: Sepiapiterin redüktaz
Trp	: Triptofan
Tyr	: Tirozin
UPR	: Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolded Protein Response)
XBP1	: X-Box Bağlayıcı Protein1
XBP1s	: Kırpılmış X-Box Bağlayıcı protein 1



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Fenilketonüri	2
2.1.1. Tanım	2
2.1.2. Tarihçe	2
2.1.3. Epidemiyoloji	3
2.1.4. Klinik Bulgular	3
2.1.5. Patofizyoloji	4
2.1.6. Fenilalanin Metabolizması	4
2.1.7. BH ₄ Kofaktörü	6
2.1.8. Biyokimyasal Tanı	7
2.1.9. Sınıflandırma	10
2.1.10. PAH Enzimi	12
2.1.11. Tedavi Seçenekleri	16
2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptoz Mekanizması	23
2.2.1. Endoplazmik Retikulum	23
2.2.2. GRP78 (Glikoz ile Düzenlenen Protein 78)	24
2.2.3. GRP94 (Glikoz ile Düzenlenen Protein 94)	25
2.2.4. Kalneksin / Kalretikulin	25
2.2.5. Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Protein Yıkımı (ERAD, Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation)	26
2.2.6. Endoplazmik Retikulum Stresi	26
2.2.7. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR, Unfolded Protein Response)	27
2.2.8. ER Stres Kaynaklı Apoptoz Mekanizmaları	31
3. MATERYAL VE METOT	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Tam Kan, Serum ve Plazma Örnekleri	37
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	37
3.1.3. Kimyasal Maddeler	37

3.2. Metot	37
3.2.1. Araştırmanın Planlanması Ve Kan Örneklerinin Toplanması.....	37
3.2.2. Kullanılacak Reaktiflerin Hazırlanması	38
3.2.3. Lökosit İzolasyonu	38
3.2.4. GRP78 Ölçümü	39
3.2.5. CHOP Ölçümü.....	39
3.2.6. Protein Miktarı Tayini	40
3.2.7. İstatiksel Analiz	41
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIşMA.....	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR	49
EKLER	61
ÖZGEÇMİş	62

1. GİRİŞ

Fenilketonüri, fenilalanin hidroksilazı kodlayan gendeki mutasyonların neden olduğu kalıtsal bir metabolizma hastalığıdır. PAH, kofaktör tetrahidrobiyopiterin (BH₄) varlığında fenilalanini tirozine dönüştürür. PAH enziminin aktivite eksikliği kanda ve beyinde Phe birikimine neden olur. Tedavi edilmeyen FKÜ; geri dönüşü olmayan zihinsel engellilik, mikrosefali, ekzamatöz döküntü, otizm, gelişim sorunları ve psikiyatrik semptomlarla karakterizedir. (Blau ve ark., 2010). Phe birikiminin nörodejeneratif etkilerinin çoğunun azalmış kreatin kinaz aktivitesi, yetersiz miyelin üretimi ve tirozin eksikliğinden dolayı dopamin sentezinin azalması gibi dolaylı etkilerden olduğu düşünülse de (Joseph ve Dyer, 2003) beyin fonksiyon bozukluğunun patogenezi hala belirsizdir. Bununla birlikte yüksek Phe konsantrasyonları nöronal apoptozu doğrudan etkileyebilir (Friedlander, 2003).

Endoplazmik retikulum salgı ve transmembran proteinlerin sentezinden, olgunlaşmasından, katlanmasından, kalite kontrolünden ve yıkımından sorumludur. Sadece doğru katlanmış proteinler hücre dışına gönderilir (Wang ve Kaufman, 2016). ER homeostazını etkileyen durumlar protein katlanmasını bozar ve katlanmamış proteinlerin ER’ de birikmesine neden olur. Bu durum “ER stres” olarak adlandırılır. Kalsiyum homeostazındaki bozulmalar, enerji yoksunluğu, viral enfeksiyonlar ve protein katlanmasını bozan mutasyonlar dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik koşullar ER stresini tetikleyebilir (Kaufman, 2002). Hücreler bu durumla mücadele edebilmek için katlanmamış protein cevabı olarak adlandırılan bir mekanizmayı harekete geçirir. Bununla birlikte, eğer protein birikimi kalıcıysa ve stres çözülemezse hücre apoptozaya yönlendirilir. (Kadowaki ve Nishitoh, 2013).

FKÜ’ de Phe ve metabolitlerinin (fenilpiruvat, fenillaktat ve fenilasetat) beyin için sitotoksik olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca, FKÜ’ de yüksek Phe düzeylerinin oksidatif strese ve lökositlerde DNA hasarına neden olduğu rapor edilmiştir (Sirtori ve ark., 2005; Sitta ve ark., 2009) Ancak, tedavi edilmemiş ya da tedavisi izlenen FKÜ hastalarında yüksek Phe düzeylerinin ER stresine neden olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında FKÜ tanısı almış ve tedavileri izlenen hastalarda mutant PAH proteinlerinin neden olduğu kandaki yüksek Phe düzeylerinin lökositlerde ER stresine neden olup olmadığı araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fenilketonüri

2.1.1. Tanım

Fenilketonüri (OMIM 261600), ağırlıklı olarak fenilalanin hidroksilaz (EC 1.14.16.1) genindeki mutasyonların neden olduğu doğuştan gelen bir metabolizma hastalığıdır (Scriver ve Kaufman, 2001). Kalıtım şekli otozomal resesiftir. PAH, esansiyel bir amino asit olan fenilalanini tirozine dönüştürmek için gereken hepatik bir enzimdir ve kofaktör olarak tetrahidrobiyopiterine ihtiyaç duyar. PAH genindeki mutasyonlar ve tetrahidrobiyopiterin sentezi ya da geri dönüşümündeki bozukluklar nedeniyle metabolize edilemeyen Phe, kanda ve dokularda birikerek hiperfenilalaninemi olarak adlandırılan duruma neden olur (Blau ve ark., 2010). Ayrıca tirozin sentezindeki yetersizlik onun alt ürünleri melanin, tiroksin ve katekolamin eksikliklerine yol açabilir.

2.1.2. Tarihçe

FKÜ, ilk olarak tıp çalışmalarında kimyasal yöntemler kullanan Norveçli doktor Asbjorn Folling tarafından tanımlanmıştır (Centerwall ve ark., 2000). 1934 yılında zihinsel engelli iki çocuğun annesi yardım istemek için Folling' e başvurmuş, Folling çocukların idrarındaki küf kokusunu fark ederek idrara keton varlığını test etmek için ferrik klorür ilave etmiştir. Ferrik klorür ilavesinde idrar normal olarak kahverengi ve keton bulundurduğu takdirde mor ya da şarap rengine dönüşmesi gerekirken bu defa koyu yeşil bir duruma gelmiştir (Folling, 1994). Olağan dışı sonucun herhangi bir ilaca bağlı olmadığını testi iki ay boyunca tekrarlayarak doğruladıktan sonra, sorumlu bileşiğin saflaştırılmasını ve erime noktasının belirlenmesini içeren daha ayrıntılı kimyasal analize devam etmiştir. Saflaştırılmış maddenin fenilpirüvik asit olduğunu keşfettikten sonra birkaç yerel kurumdan 430 zihinsel engelli hastadan idrar numuneleri talep etmiş ve sekiz kişide daha benzer bir sonuç gözlemlemiştir. Bu sekiz kişinin hepsinde açık bir ten rengi ile (genellikle egzama varlığında) geniş omuzlar, spastik yürüyüş ve ciddi zihinsel bozukluk tespit etmiştir. Dr. Folling, bulgularını yayınlamak için atılan maddeye yönelik entelektüel bozulma ile ilgili "Fenilpirüvik Oligofreni" ismini önermiş daha sonra isim fenilketonüri olarak değiştirilmiştir (Penrose ve Quastel, 1937).

FKÜ' nün keşfinden bu yana geçen 70 yılda hastalığa yönelik anlayış çarpıcı bir şekilde değişmiştir. Jervis (1947) metabolik blok ve enzim eksikliğini tespit etmiş, Bickel (1953) tarafından Phe alımı ile prognoz arasındaki azalışın bağlantısı gösterilmiştir. Phe kısıtlı diyet tedavisi ciddi mental ve motor geriliği olan 2 yaşındaki FKÜ' lü bir hastaya uygulanmıştır. Tedavi sonrasında çocuk yürümeye başlamış ve saç rengi koyulaşmıştır. Feniletonüri hastalığının diyet ile tedavi edilebileceği ile ilgili ilk makalenin yayınlanmasından sonra fenilketonüri bebeklere daha doğumda tanı konulması gerektiği fikri doğmuştur. Zihinsel engelli oğlu ve FKÜ' lü yeğenin doğumundan sonra, Kanada' lı çocuk doktoru Robert Guthrie (1963) FKÜ için tarama testleri geliştirmiştir. 1970' lerin sonunda çeşitli gruplar FKÜ' nün moleküler temelini araştırmaya başlamışlar ve 1996 yılında PAH Mutasyon Analiz Konsorsiyumu Veritabanı kurulmuştur.

FKÜ' nün Dr. Asbjorn Folling tarafından keşfi tıpta önemli bir dönüm noktası olmuştur. Guthrie tarama testi ve diyet tedavisinin geliştirilmesi tüm dünyada FKÜ' lü çocuklarda zihinsel bozulmanın önlenmesini sağlamış, FKÜ modeli o zamandan beri 200' den fazla metabolik bozukluk üzerine ışık tutmak için bir şablon olarak kullanılmıştır.

2.1.3. Epidemiyoloji

FKÜ insidansı tüm dünyada değişiklik göstermektedir. Avrupa' da yaygınlık 10.000 canlı doğumda yaklaşık 1 vakadır. Kafkas popülasyonlarında FKÜ görülme sıklığı 1/ 10.000-15.000, Arap ülkelerinde 1/ 6000, İsrail' de 1/ 5.300 dir. Finlandiya 1/ 200.000 ve Japonya 1/ 125.000 ile en düşük FKÜ insidansına sahipken, Türkiye ise 1/ 2600 oranı ile dünyada nüfusuna göre en yüksek FKÜ insidansına sahip ülkedir. Ülkemizde her yıl yaklaşık 250-300 çocuk bu hastalıkla doğmaktadır. Ülkemizdeki yüksek insidansın nedeni yaklaşık 26 kişiden birinin taşıyıcı olması ve sık yaşanan akraba evlilikleridir (Scriver ve Kaufman, 2011).

2.1.4. Klinik Bulgular

FKÜ' lü bebekler genelde doğumda normal olup herhangi bir klinik belirti ya da bulgu göstermezken, çocuk 2-3 aylık iken gelişimindeki gerilik fark edilmeye başlanır. Zeka ve motor gelişim geriliği 6 ile 7. aydan itibaren belirginleşir. Tedavi edilmeyen FKÜ' lü bebekler davranışsal, zihinsel, nörolojik ve fiziksel semptomlar

dahil olmak üzere çeşitli bozukluklar geliştirir. En sık karşılaşılan sonuçlar; genellikle idrar ve terde küf kokusu, azalan tirozin (melanin pigmenti öncüsü) üretimi nedeniyle saç, deri ve iris hipopigmentasyonu, egzama ve ciddi zihinsel engelliliktir. Ayrıca büyüme geriliği, mikrosefali, titreme ve epilepsi gibi nörolojik bulgular mevcuttur. Tedavi edilmeyen tüm hastalar hiperaktivite, yürüyüş ve tik anormallikleri gibi davranışsal problemlere sahiptir. Klinik fenotipin ciddiyeti, enzimatik eksikliğin derecesini yansıtan kan fenilalanin düzeyleriyle doğrudan ilişkilidir (Strisciuglio ve Concolino, 2014).

2.1.5. Patofizyoloji

Her ne kadar PAH mutasyonları karaciğerdeki fenilalanin homeostazını bozsa da bilişsel sorunların etiyojisi ve beyin gelişimindeki anomalilerin nedeni belirsizliğini korumaktadır. Ancak, patolojik değişiklikleri açıklayan bazı mekanizmalar önerilmiştir. Fenilalaninin beyne taşınmasına büyük nötral aminoasit taşıyıcısı LAT1 aracılık eder. Kandaki yüksek Phe konsantrasyonları rakabetçi etkisi nedeniyle diğer aminoasitlerin beyne yeterli miktarda taşınmasını engeller. Beyindeki artmış Phe konsantrasyonları miyelin metabolizmasını değiştirerek çeşitli mekanizmalar vasıtasıyla nöropsikolojik fonksiyonlara zarar verebilir (Surtees ve Blau, 2000). Görüntüleme çalışmalarında beyin beyaz maddesinde azalmış miyelin oluşumuyla ilişkili beyaz cevher lezyonları tanımlanmıştır (Anderson ve ark., 2007). Ayrıca beyindeki yüksek Phe seviyelerinin; piruvat kinaz, tirozin hidroksilaz, triptofan hidroksilaz ve HMG-CoA redüktaz gibi enzimlerin aktivitesini azaltması diğer olası mekanizmalardır (Shefer ve ark., 2000).

2.1.6. Fenilalanin Metabolizması

Phe $C_9H_{11}NO_2$ molekül formülüne sahiptir, D ve L enantiyomerleri olarak bulunur. L-Phe insanlarda protein sentezi için gerekli olan esansiyel aminoasitlerdendir.

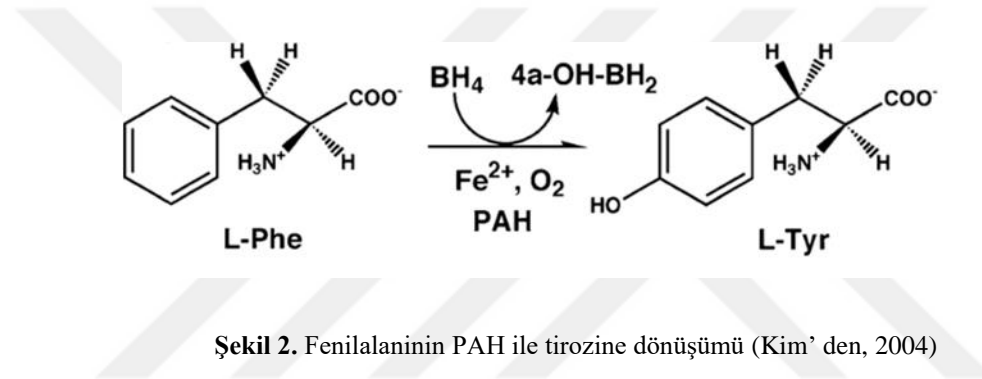


Şekil 1. (a): L-fenilalanin, (b): L-tirozin (Alves' den, 2013)

Fenilalanin, β karbon üzerinde bir fenil sübstitüentine sahip bir alanin türevidir (Şekil 1). Benzil yan zincirinin hidrofobik doğası nedeniyle nonpolar amino asit olarak sınıflandırılır. Hidrofobikliği nedeniyle, serbest amino asit su içinde fazla çözünür değildir ve bir protein içinde gömülü olarak bulunur.

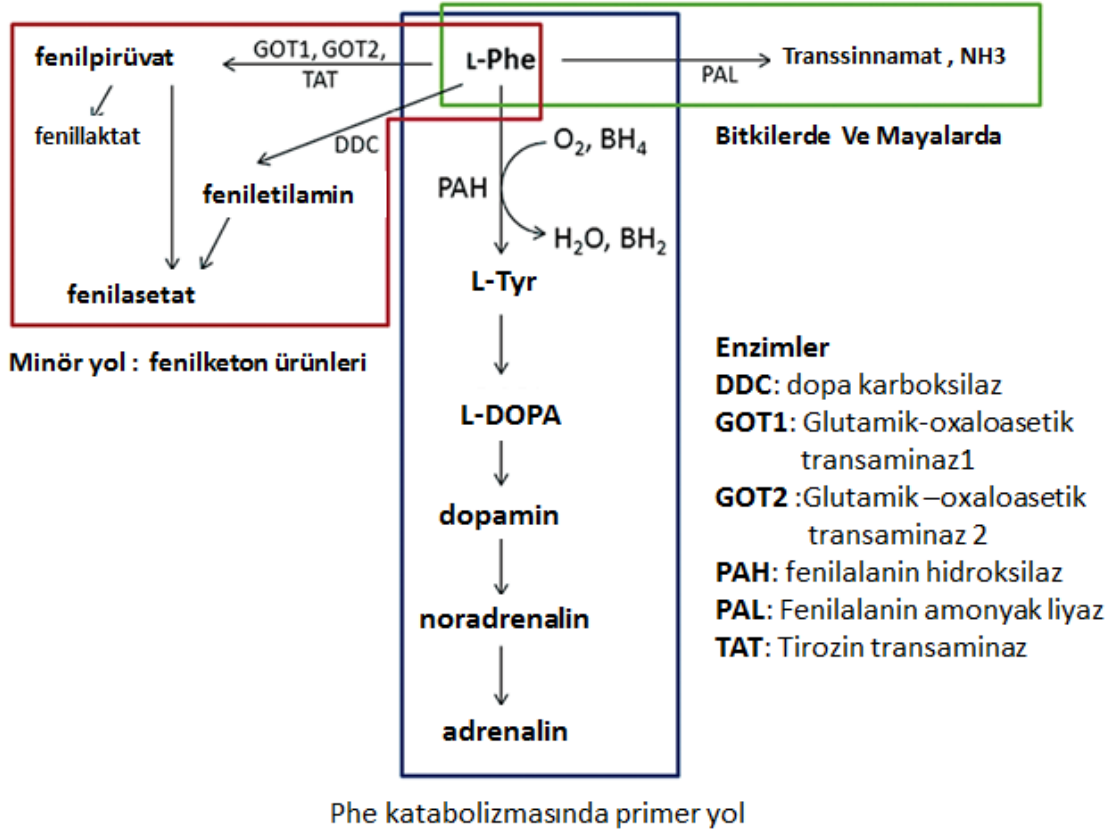
Fenilalanin bebeklerde büyüme için yetişkinlerde de azot dengesi için gereklidir. Sığır eti, kümes hayvanları, balık, süt, yoğurt, yumurta, peynir, soya ürünleri, fındık ve bazı tohumlar gibi protein içeren yiyeceklerin çoğunda bulunur. Yapay tatlandırıcı aspartamın % 50' si fenilalaninden oluşur (Nelson ve ark, 2000).

$C_9H_{11}NO_3$ molekül formülüne sahip tirozin, Phe' nin aksine esansiyel olmayan bir amino asittir ve fenilalaninin hidrosilasyonundan üretilir (Şekil 2).



Diyetle alınan proteinlerden ve amino asit depolarından endojen geri dönüşüm ile elde edilen Phe, başlıca Phe kaynaklarıdır. Hepatik PAH enzimi kofaktör BH_4 , oksijen ve Fe^{2+} varlığında L-Phe' nin L-Tyr' e dönüşümünü katalize eder (Şekil 2). L-Tyr daha sonra nörotransmitterler dopamin, noradrenalin ve adrenaline dönüştürülür.

PAH aktivitesi eksikliğinde, dokularda biriken ilk bileşik fenilalaninin kendisidir. PAH yokluğunda Phe, transaminasyon ve dekarboksilasyon alternatif yolları ile idrarla atılan fenilpiruvat, fenillaktat ve fenilasetat (Şekil 3) gibi metabolitlerin oluşumuna yol açar (Scriver ve Kaufman, 2001). Normalde fenilpiruvat oluşturan fenilalaninin transaminasyonu, dolaşımdaki konsantrasyonlar $1200 \mu\text{mol/ l}$ yi geçmediği sürece gerçekleşmez. Bitkilerde ve mantarlarda ise fenilalanin amonyak liyaz enzimi L-Phe' nin katabolizmasında rol oynar (Sarkissian ve ark., 2005).



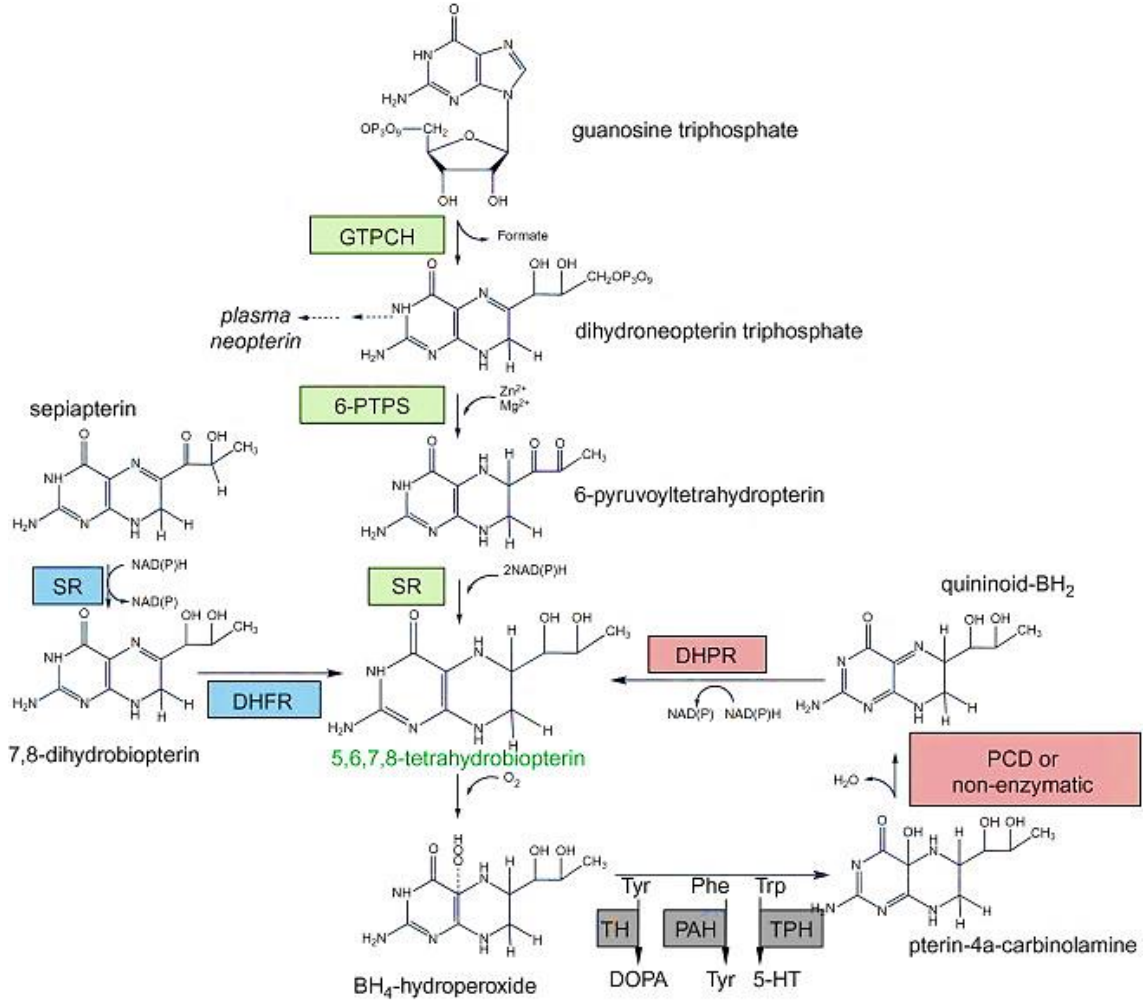
Şekil 3. Phe katabolizması (Ho ve Christodoulou, 2014' den uyarlanmıştır)

2.1.7. BH₄ Kofaktörü

BH₄ ökaryotların her hücresinde ve dokusunda bulunur. Monoamin nörotransmitterlerin oluşumu, kardiyovasküler ve endotel disfonksiyonu, bağışıklık tepkisi ve ağrı duyarlılığı ile ilişkili çeşitli biyolojik işlemlerde ve patolojik durumlarda anahtar rol oynar. BH₄ çeşitli prosesler ve enzimler için temel bir kofaktördür ve fenilalanin hidroksilaz enziminin katalitik aktivitesi için gereklidir.

BH₄, GTP siklohidrolaz I (GTPCH), 6-piruvoil tetrahidropiterin sentaz (PTPS) ve sepyapiterin redüktaz (SR) tarafından gerçekleştirilen üç enzimatik adım dizisi ile GTP' den de novo sentezlenir ve Phe' nin hidroksilasyonu sırasında rejenere edilir (Şekil 4). PAH' ın katalizlediği reaksiyon sırasında BH₄, 4-alfa-hidroksi-tetrahidrobiyopiterin ara maddesine oksitlenir. Daha sonra, karbinolamin-4alfa-dehidrataz (PCD) enzimi ile ara bileşik kinonoid (q) dihidrobiyopiterine, oradan da NADH' e bağlı dihidropiteridin redüktaz (DHPR) ile BH₄' e geri dönüştürülür. SR hariç

diğer enzimlerden herhangi birindeki eksiklik, BH₄ eksikliğine ve dolayısıyla hiperfenilalaninemiye neden olur (Blau ve ark., 2010).



Şekil 4. BH₄ sentezi ve rejenerasyonu (Higgins ve Gross' dan, 2010)

2.1.8. Biyokimyasal Tanı

Tedavi edilmemiş FKÜ hastalığının ciddiyeti nedeniyle hastalara erken tanı konması ve tedaviye başlanması gerekmektedir. Gelişmiş ülkelerde FKÜ doğumdan hemen sonra ulusal yenidoğan tarama programları ile tanımlanmaktadır. Türkiye'de FKÜ yenidoğan tarama programına 1986 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından başlanmıştır. Programın ilk yıllarında taramalar belirlenen pilot merkezlerde yapılmış, 1994 yılında "Ulusal Fenilketonüri Tarama Programı" tüm ülkeye yayılmıştır. 25 Aralık 2006 tarihinde Konjenital hipotiroidinin FKÜ tarama programına eklenmesiyle

programın ismi “Ulusal Yenidoğan Tarama Programı” olarak değiştirilmiştir (Tezel ve ark., 2014).

1960’ lara kadar, fenilketonüri ile dünyaya gelen çocukların çoğu yaşamlarını ağır zihinsel engelli olarak geçirmişlerdir. 1950’ lerde Horst Bickel’in düşük fenilalanin diyeti ve 1960’ larda Robert Guthrie tarafından geliştirilen bakteriyel inhibisyon testi (test, büyüme için Phe gerektiren *Bacillus subtilis*’ e dayandırılır) sayesinde hastaların normal bir şekilde hayatlarını sürdürebilmelerine olanak sağlanmıştır.

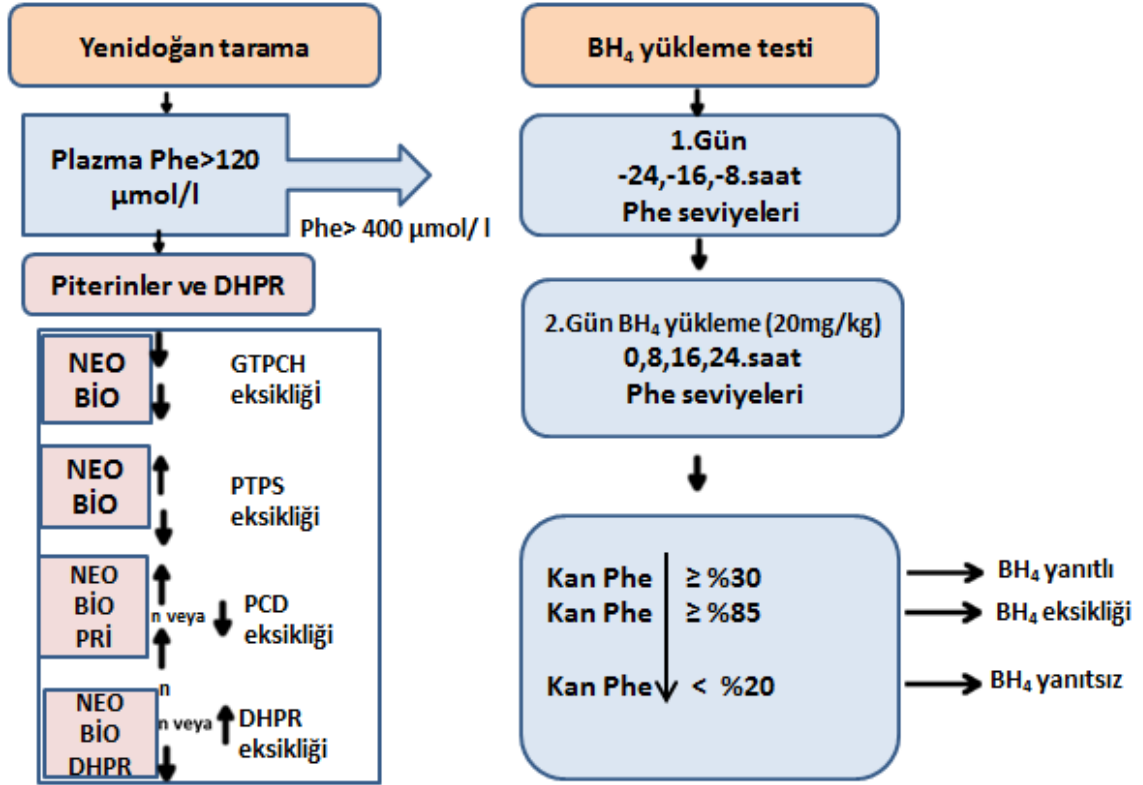
90’ lı yıllarda geliştirilen Tandem Kütle Spektrometresi, küçük miktarlarda kan veya plazma içindeki amino asit konsantrasyonlarının güvenilir ve kantitatif olarak belirlenmesi için olanak sağlar. Bu yöntem hem Phe hem de Tyr seviyelerini ölçerek Phe/ Tyr oranını sağladığı için daha düşük bir hatayla pozitif sonuç vermektedir. Ek olarak diğer doğuştan metabolizma hastalıkları da aynı anda tanımlanabilir (Chace ve ark., 1998).

HPA tanısının doğumdan sonraki ilk 15 gün içinde konulması yenidoğan taramasının temel hedeflerinden biridir. Taramanın etkin olabilmesi için kan örneği proteinle beslenmeye başladıktan en az 24-48 saat sonra alınmalıdır. Ancak yenidoğanların çoğu 48. saatten önce taburcu edildikleri için taramanın bebek 7-10 günlükken tekrar edilmesi önerilmektedir (Zaffanello ve ark., 2003). Kan amino asit analizinde Phe konsantrasyonları $> 120 \mu\text{mol/l}$, (Phe/ Tyr oranı > 2) ise ve normal ya da düşük tirozin konsantrasyonları mevcutsa HPA düşünülür (Eastman ve ark., 2000).

Tüm vakaların % 2-3’ ünde yüksek kan fenilalanin konsantrasyonları BH_4 sentezi ya da geri dönüşümündeki kusurlardan kaynaklanır. Bu nedenle tanı konmadan önce ilk olarak, hastanın BH_4 sentezinde veya geri dönüşümünde bir kusur olup olmadığının açıklığa kavuşturulması gereklidir. Dolayısıyla idrardaki piterinlerin analizi ve eritrositlerdeki DHPR aktivitesinin belirlenmesi büyük önem taşır. Patolojik sonuçlar söz konusu olduğunda ise biyopiterin metabolizmasındaki bozukluğu incelemek için beyin omurilik sıvısındaki nörotransmitter metabolit konsantrasyonlarının değerlendirilmesi gerekebilir. Bu gibi kusurlar yoksa HPA/ FKÜ hastalarında tedaviye sadece diyet ya da BH_4 tedavisi ile beraber sınırlı bir diyet ile devam edilir (Thöny ve Blau, 2006).

Avrupa ülkelerinde HPA tanısı alan bebek BH_4 yükleme testi için hastaneye yatırılır ve 1. gün BH_4 uygulamasından önce -24., -16., -8. saatlerindeki Phe düzeyleri

belirlenir. 2. gün vücut ağırlığına göre 20 mg/ kg BH₄ oral olarak verilir ve kan Phe konsantrasyonları 8., 16. ve 24. saat sonra ölçülür. Kan Phe konsantrasyonlarının % 30' dan fazla zılması BH₄' e pozitif yanıt alındığını, % 85' ten daha fazla azalması BH₄ eksikliğini işaret ederken, % 20' den daha az bir azalma hastanın tedaviye yanıt vermediğini gösterir (Şekil 5).



Şekil 5. Hiperfenilalanineminin ayırıcı tanısı (Blau ve ark., 2010' dan uyarlanmıştır)

(Phe: fenilalanin, DHPR: dihidropiteridin redüktaz, Neo: neopiterin, Bio: biyopiterin, Pri: primapiterin, GTPCH: GTP-siklohidrolaz I, PTPS:6-pirüloil tetrahidropiterin sentaz, PCD: piterin-4 α - karbinolamin dehidrataz, BH₄: tetrahidrobiyopiterin, n:normal)

ABD' de BH₄ yenidoğan bebeklere verilmemektedir. Bunun yerine, idrar piterinlerini (neopiterin ve biyopiterin) ve BH₄ eksikliği ile ilişkili bir kusur olasılığını değerlendirmek için bebekten idrar ve filtre kağıdıyla kurutulmuş bir kan örneği alınır (Blau ve ark., 2005). Kan veya idrardaki aşağıdaki anormal piterin paternleri, farklı BH₄ eksikliği tipleri için tanısaldır:

- GTPCH eksikliğinde; hem neopiterin hem de biyopiterin çok düşüktür veya tespit edilemez

- PTPS eksikliğinde; neopiterin çok yüksektir ve biyopiterin çok düşüktür veya tespit edilemez
- PCD eksikliğinde; neopiterin yüksek, biyopiterin düşük veya sınırda ve primapiterin yüksektir
- DHPR eksikliğinde; DHPR aktivitesi düşüktür, neopiterin normaldir ve biyopiterin yüksektir
- DHPR redüktaz eksikliği olan bazı hastalarda, piterin paternleri normal olabilir ve filtre kağıdıyla kurutulmuş bir kan numunesinde sadece dihidropiteridin redüktaz aktivitesi tanısaldır (Şekil 5).

Ek olarak, yenidoğanda yüksek Phe kan seviyelerinin karaciğer fonksiyon bozukluğu veya galaktozemi gibi hastalıklardan da kaynaklanabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Hastaların tedavisi genetik arka plana bağlı olarak büyük ölçüde farklılık gösterdiği için altta yatan HPA nedeninin genetik nedeninin tam olarak belirlenmesi son derece önemlidir. PAH eksikliğinden dolayı doğrulanmış HPA durumunda, PAH geninin moleküler genetik analizi yapılabilir ancak düşük fenilalanin diyetinin uygulanması için ön şart değildir.

2.1.9. Sınıflandırma

Hastalıkların varsayılan seyrini tahmin etmek ve hastaya optimal tedavi seçenekleri konusunda yardımcı olmak için hastalığın ciddiyetinin sınıflandırılmasına ihtiyaç vardır. Biyolojik belirteçlerin bilindiği hastalıklarda güvenilir klinik ve biyokimyasal sınıflandırma oluşturmak daha kolaydır. FKÜ' de, tedavi edilmemiş kişilerdeki kan Phe konsantrasyonları biyolojik belirteç olarak işlev görür ve bu nedenle FKÜ sınıflandırması, uzunca bir süre esas olarak kan Phe düzeyinin derecesine dayanmıştır. Tüm dünyada kabul görmesine rağmen, bu sınıflandırma tam olarak doğru değildir. Bunun nedeni, fenilalanin konsantrasyonlarının genellikle yenidoğanlarda fenilalanin konsantrasyonlarının henüz en yüksek değerlere ulaşmadığı zamanlarda ölçülmesidir. Ayrıca erken doğmuş bebekler tamamen gelişmiş metabolik yollara sahip değildirler. Bu nedenle, FKÜ sınıflandırmasını iyileştirmek için ek, stabil bir parametre olarak fenilalanin toleransı belirlenmiştir. Fenilalanin toleransı kan fenilalanin seviyelerinin artmasına neden olmadan organizma tarafından tolere edilen diyetteki günlük fenilalanin alımını açıklar. Çok hassas diyet protokolleri kullanarak iyi

standartlaştırılmış koşullar altında fenilalanin toleransının belirlenmesi önemlidir (Blau ve ark., 2011).

1980 yılında, ilk kez, FKÜ' nün üç farklı fenotipini ayırt etmek için kan Phe düzeyleri kullanılmıştır ve halhuftonen çeşitli PAH eksikliklerinin bu sınıflandırması FKÜ' yü fenotiplemede kullanılır (Güttler, 1980).

PAH eksikliği olan fenotipler, kan fenilalanin seviyelerinde hafif bir artış ile hafif bir HPA formundan belirgin FKÜ ile klasik bir fenotipe kadar değişir (Tablo1). Klasik FKÜ, yüksek kan fenilalanin konsantrasyonları ($> 1200 \mu\text{mol} / \text{l}$), çok düşük diyet Phe toleransı ($<20 \text{ mg} / \text{ kg} / \text{ gün}$) ve PAH enziminin belirgin şekilde azalmış aktivitesi ile ilişkili en ciddi PAH eksikliği şeklidir. Klasik FKÜ ile başvuran hastaların, plazma fenilalanin konsantrasyonlarını güvenli bir seviyede tutmaları için sıkı bir diyet yönetimi gereklidir. Bu gruptaki bireyler eğer tedavi edilmezse, ağır ve geri dönüşü olmayan zihinsel engellilik geliştirir (Mitchell ve ark., 2011). Orta derecede FKÜ olarak sınıflandırılan hastaların kan fenilalanin düzeyleri 600 ile $1200 \mu\text{mol} / \text{l}$ arasındadır ve günlük olarak daha yüksek bir fenilalanin toleransı ($20 - 50 \text{ mg} / \text{ kg} / \text{ gün}$) gösterir. Orta derece FKÜ' de de Phe değerlerini fizyolojik aralıkta tutmak için Phe kısıtlı bir diyet gerekir. Normal diyet altında kan fenilalanin konsantrasyonları $600 \mu\text{mol} / \text{l}$ 'nin altında olan hafif HPA' lı hasta grubunun, genellikle özel diyet rejimlerine ihtiyaç duymadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte bu, uzmanlar arasındaki bir tartışma konusudur ve HPA' lı tedavi edilmemiş kadınların, ciddi embriyopati ile maternal fenilketonüri yaşayabileceğini not etmek önemlidir. BH_4 ' e cevap veren PAH eksikliği FKÜ' de yeni bir fenotip olarak ortaya çıkmıştır. Duyarlılık BH_4 yükleme testleriyle belirlenir. BH_4 uygulamasından sonra kan Phe konsantrasyonunda en az % 30 azalma BH_4 ' e duyarlı FKÜ olarak tanımlanır (Blau ve ark., 2010; Mitchell ve ark., 2011).

Atipik FKÜ, yüksek kan fenilalanin seviyelerinin BH_4 eksikliğinden kaynaklandığı nadir bir durumu (tüm HPA olaylarının % 2-3' ü) tanımlar. BH_4 metabolizmasındaki sentez veya geri dönüşümdeki kusurlar, PAH eksikliğinden daha şiddetli ilerleme göstermektedir. Dahası, tedavi önemli ölçüde farklıdır. BH_4 eksikliği olan hastalar sadece düşük fenilalanin diyetine cevap vermezler. Bunun yerine tedavide dopamin, serotonin ve BH_4 öncüleri ile erken takviye etkilidir (Opladen ve ark., 2012).

Tablo 1. Hiperfenilalanineminin sınıflandırılması (Blau ve ark., 2010; Mitchell ve ark., 2011'dan uyarlanmıştır)

Sınıflandırma	Tedavi öncesi kan Phe düzeyi	Phe toleransı
Klasik FKÜ/ Tip I	> 1200 $\mu\text{mol/l}$	< 20 mg/ kg/ gün
Orta derece FKÜ/ Tip II	600-1200 $\mu\text{mol/l}$	20-50 mg/ kg/ gün
Hafif HPA/ Tip III	<120-600 $\mu\text{mol/l}$	> 50 mg/ kg/ gün
Atipik FKÜ	150-1200 $\mu\text{mol/l}$	değişken
Sağlıklı bireyler	50-120 $\mu\text{mol/l}$	sınır yok

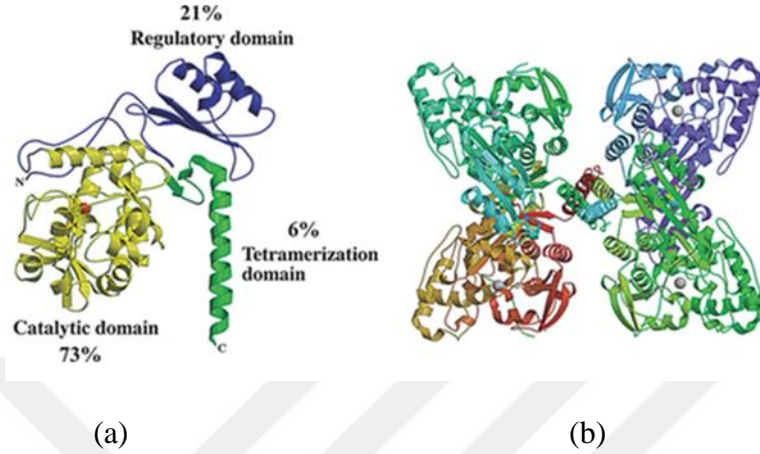
Hafif ve ağır FKÜ formları sınıflandırması için klinik olarak yararlı olduğu kanıtlanan ek bir parametre Phe/ Tyr oranıdır (Contreras ve ark., 2015). Bu parametre ciddi FKÜ tanısı için özgüldür ve yanlış pozitif değerlendirmeleri azaltabileceği gösterilmiştir (Ceglarek ve ark., 2002). Phe/ Tyr oranı New England Yenidoğan Tarama Programı tarafından başarılı bir şekilde sunulmuş; ortalama Phe/ Tyr oranı ≥ 5 ve ortalama Phe seviyesinin 477 μmol ve üzeri olması şiddetli klasik FKÜ kabul edilirken, ortalama Phe/ Tyr oranı ≥ 1.5 ve ortalama Phe seviyesinin 215 $\mu\text{mol/l}$ ve üzeri olması hafif FKÜ olarak adlandırılmıştır (Singh ve ark., 2014). Her ne kadar Phe/ Tyr oranının rutin bir biyobelirteç kullanılması için daha fazla değerlendirmeye ihtiyaç duyulsa da tanısal test için son öneriler Phe düzeyinin, Phe/ Tyr oranının ve tam amino asit profilinin değerlendirilmesini içermektedir (Vockley ve ark., 2014).

2.1.10. PAH Enzimi

PAH Enziminin Yapısı

Fenilalanin hidroksilaz, esas olarak karaciğerde sentezlenen sitozolik bir enzimdir (toplam karaciğer proteininin% 0.1-0.3' ü). PAH enzimi düşük miktarlarda insan böbreklerinde ve çok daha düşük oranda pankreasta sentezlenir. PAH, triptofan hidroksilaz (TPH; EC 1.14.16.4) ve tirozin hidroksilaz (TH; EC 1.14.16.2) dahil olmak üzere biyopiterin bağımlı aromatik amino asit hidroksilazlar ailesine aittir. PAH, nörotransmitter sentez yollarındaki hız sınırlayıcı aşamaları katalize eder (Fitzpatrick,

2000). İnsan PAH enzimi çözelti içinde tetramerler ve dimerler arasında, pH' a ve substrata bağlı bir denge halinde bulunur (Şekil 6). Her monomer yaklaşık olarak 50 kDa büyüklüğündedir ve 452 amino asitten oluşur (Hufton ve ark., 1995).



Şekil 6. PAH' ın 3B kristal yapısı (a): Etkileşim bölgesi (b): Tetramer form (Erlandsen'den 1999)

Tetramerik PAH enziminde her bir sübünite üç domain içerir (Fusetti ve ark., 1998).

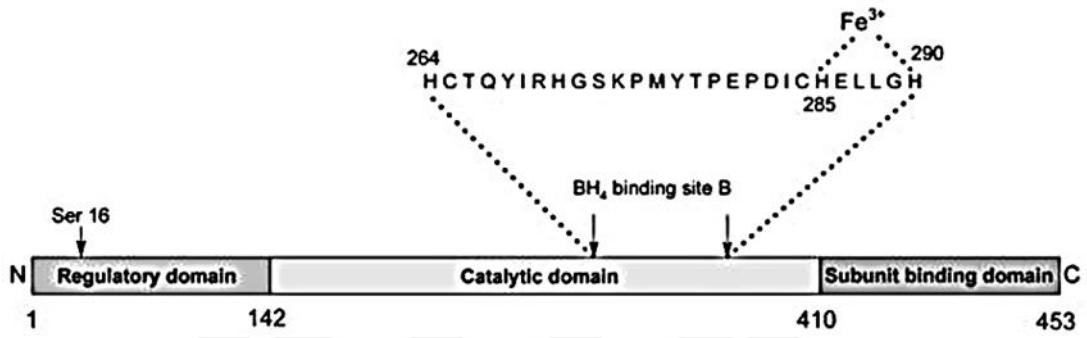
1. Fosforillenebilir serin artıklarını bulunduran bir N-terminal regülatör domain (1-142 kalıntıları)
2. Phe, BH₄ ve demir atomu için bağlayıcı bölgelere sahip aktif katalitik domain (143-410 kalıntıları)
3. Dimerizasyon (411-424 kalıntıları) ve tetramerizasyon motiflerinden (428-452 kalıntıları) oluşan bir C-terminal oligomerizasyon domaini

PAH' ın Fonksiyonu ve Regülasyonu

PAH, esansiyel amino asit Phe' nin katabolik yolundaki hız sınırlayıcı aşamayı katalize eder. Fizyolojik koşullar altında, Phe' nin yaklaşık % 75' i katabolize edilerek tirozine hidroksile edilir. (Scriver ve Kaufman, 2001). Hidroksilasyon reaksiyonu, PAH enziminin yanı sıra moleküler oksijen (O₂) ve enzimin doğal kofaktörü olan fizyolojik bir elektron donörü BH₄ gerektirmektedir (Werner ve ark., 2011). Reaksiyon sırasında Phe' nin fenil grubuna bir hidroksil grubu ilave edilir ve aynı zamanda BH₄ dihidrobiyopiterine (BH₂) oksitlenir. Bir sonraki adımda BH₂, DHPR ile BH₄' e

yenilenirken reaksiyon ürünü Tyr nörotransmitterlerin, melanin ve tiroid hormonlarının sentezinde kullanılır.

BH₄ kofaktörünün bağlanması His264 ile His290 arasındaki 26 amino asit sekansında gerçekleştiği düşünülmektedir (Şekil 7). Pterinik kofaktörün aktif bölgeye bağlanmasından sonra büyük bir konformasyonel değişiklik meydana gelir. 245 ile 250 arasındaki kalıntılar, demir yönünde hareket eder ve bu, pterin halkası ile protein arasında sayısız hidrojen bağı oluşumuna izin verir (Erlandsen ve ark., 1999).



Şekil 7. PAH enziminin yapısal bileşenleri (Rossia'dan, 2014)

İnsan PAH'ın enzimatik aktivitesi, fenilalanin ve tirozin havuzu arasındaki homeostazı korumak için sıkı bir şekilde düzenlenir. Memeli PAH fonksiyonunun spesifik düzenlenmesine üç ana faktör aracılık eder: i) Phe substratı ii) kofaktör BH₄ konsantrasyonları ve iii) Ser16 kalıntısının fosforilasyonu (Fitzpatrick, 2012).

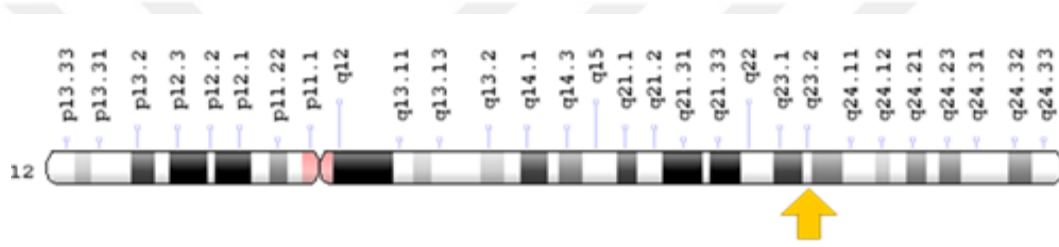
Substratın aktivasyonu, karaciğerdeki PAH regülasyonu için en önemli mekanizmadır. Substrat Phe, PAH'ın katalitik olarak aktif formunu indükleyen ve enzimin spesifik aktivitesini birkaç kat arttıran pozitif bir allosterik efektör görevi görür (Fitzpatrick, 2012).

Phe'nin aksine kofaktör BH₄, enzimi düşük aktivite durumunda tutan allosterik inhibitör görevi görür. BH₄, N-terminal otergülasyon alanını bağlayarak, substratların aktif bölgeye erişimini bloke eder. PAH-BH₄ kompleksinin oluşumu, hem serbest BH₄ hem de serbest PAH enziminin konsantrasyonlarında azalmaya yol açar (Thöny ve ark., 2004). Yine de BH₄, enzim aktivasyonu için kaçınılmaz bir ön koşul olan Fe³⁺ iyonunun Fe²⁺ ye indirgenmesi için gereklidir.

PAH' ın ilk 30 tortusu, cAMP' ye bağımlı protein kinaz için bir substrat olan Ser16' yı içerir ve oteoregülatuar bir sekans olarak işlev görür. Substrat tarafından indüklenen pozitif etkinin ve doğal kofaktör BH₄' ün neden olduğu inhibitör etkinin ifadesi için gereklidir (Kobe ve ark., 1999). Fosforilasyon oranının, substrat varlığında arttırıldığı ve BH₄ varlığında azaldığı in vitro olarak gösterilmiştir (Kaufman, 1993; Fitzpatrick, 2012).

PAH Geni

12. kromozomun uzun kolunda (12q23.2) bulunan insan PAH geni (Şekil 8), 452 amino asitlik bir polipeptidi kodlayan 13 ekzon ve 12 intron içerir (Konecki ve ark., 1992).



Şekil 8. İnsan PAH geni (Genetics Home Reference, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PAH>'dan alınmıştır)

Fenilketonüri, her iki allel de mutasyona uğradığında ortaya çıkar. İki mutasyon ekzonların herhangi birinde, intronların birleşme noktalarında veya promotör bölgesinde olduğu gibi genin henüz tanımlanamayan diğer alanlarında da olabilir. Sadece bir PAH mutasyonuna sahip olanlar taşıyıcılardır ve FKÜ' nün biyokimyasal veya klinik özelliklerinden hiçbirine sahip değildirler (Blau ve ark., 2010).

İnsan PAH genindeki doğal olarak meydana gelen mutasyonlar İnsan PAH Mutasyon Bilgi Bankası (hPAHdb) veri tabanında özetlenmiştir ve 1000' den fazla mutasyon içermektedir (Flydal ve Martinez, 2013). Bunların çoğunluğu nokta mutasyonlarına (% 63) ve küçük delesyonlara (% 13) karşılık gelir (Scriver, 2007). En yaygın olanı 408 konumundaki argininin triptofan ile yer değiştirmesidir. Mutasyonun konumu ve doğası, PAH enziminin aktivitesini etkileyerek hastanın HPA fenotipini belirler. Enzim aktivitesinin çok az veya hiç olmaması, klasik FKÜ fenotipiyle sonuçlanırken diğer mutasyonlar sadece kısmen FKÜ veya hafif HPA' ya yol açar. Mutasyonların kabaca % 5' i PAH aktivitesini etkilemez (Zschocke, 2003). Veriler FKÜ hastalarının% 55' inin klasik bir fenotip gösterdiğini,% 27' sinin hafif bir fenotipe

sahip olduğunu ve geri kalanının FKÜ dışı hafif HPA' ya sahip olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda, mutasyon kaynaklı yanlış protein katlanması PAH enziminin işlev kaybına neden olan ana moleküler mekanizmalardan biri olarak tanımlanmıştır (Flydal ve Martinez, 2013). Protein yanlış katlanmasına bağlı olarak PAH enzimidaki fonksiyon kaybının moleküler mekanizmasının bozulmuş oligomerizasyon, azalmış proteolitik ve termodinamik stabilite, topaklaşmaya karşı artan duyarlılık, hızlandırılmış bozulma veya azaltılmış katlanma verimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Muntau ve ark., 2014).

Her ne kadar in vitro fibril oluşumu açıkça gözlemlense de, diğer protein katlanma defektlerinde zararlı olan amiloid veya fibril birikimleri FKÜ için rapor edilmemiştir ve yanlış katlanmış mutantların hücresel kalite kontrol sistemi tarafından etkin bir şekilde bozulduğu görülmektedir. HPA için heteroallellik fare modelinin son kanıtları, mutant PAH' ın, in vivo ubiquitine olarak proteazom aracılı bozulmaya ve otofajiye yöneldiğini göstermiştir (Sarkissian ve ark, 2012). Bu nedenle hastalığın temel olarak protein birikimlerinin ikincil sonuçları olmadan enzimatik aktivite eksikliğinin sonucu olduğu düşünülmektedir.

2.1.11. Tedavi Seçenekleri

Diyet Tedavisi

Diyetteki Phe' nin kısıtlanması, piyasaya sürülmesinden bu yana FKÜ tedavisinin temelini oluşturmaya devam etmektedir (Bickel ve ark., 1954). FKÜ tedavisinin temel amacı bebeğin mümkün olan en iyi nörokognitif ve psikososyal gelişimini sağlamaktır. Bu amaçla, tedaviye doğumdan hemen sonra başlanmalı ve yaşam boyu uluslararası yönergelerle göre devam edilmelidir. Tedavi kan fenilalanin konsantrasyonlarını tavsiye edilen 120-360 µmol/ l aralığında tutmayı amaçlar. Ancak bu değerler klinikler ve ülkeler arasında ayrıca hastanın yaşına bağlı olarak da değişebilir (Vockley ve ark., 2014). Diyet, kandaki fenilalanin konsantrasyonlarını düşürmeye izin verecek şekilde tasarlanır. Aynı zamanda hastanın normal büyümesi ve gelişimi için gereken yeterli miktarda Tyr ve besin sağlar. Normalde diyet ile alınan Phe'nin yaklaşık % 75' i Try' e dönüştürülür. Bu nedenle tedavinin önemli bir kısmı Try takviyesidir (van Spronsen ve Enns, 2010). Ek olarak diyete esansiyel amino

asitlerin, vitaminlerin ve minerallerin karışımını içeren tıbbi gıda formülleri eklenmelidir (Acosta ve Matalon, 2010). Et, balık, yumurta, ekmek ve peynirlerin yanı sıra çikolata ve sakızlar gibi çocukların favorisi tüm yüksek proteinli yiyecekler diyetten çıkarılmalıdır. Bazı düşük proteinli meyve ve sebzelere sınırlı miktarda izin verilmelidir (van Spronsen, 2010). Diyet günlük fenilalanin toleransı yaş, büyüme ve aktivite dikkate alınarak her bireye göre uyarlanmalıdır. Fenilalanin seviyelerinde belirgin dalgalanmalardan kaçınılmalıdır ve bu nedenle diyet fenilalanin değerlerinin düzenli ve sık ölçümleri eşlik etmelidir. Phe konsantrasyonunun hedef seviyesi hastanın yaşına göre değişir. İki yaşın altındaki çocuklarda hedef konsantrasyon genellikle 360 $\mu\text{mol/l}$ 'nin altındadır ve Almanya, Avusturya ve Fransa gibi ülkelerde yetişkinlerde 1.200 $\mu\text{mol/l}$ 'ye yükselirken, Avustralya'da ergenler ve gençler için hedef 750 $\mu\text{mol/l}$ 'dir. Küçük yaştaki katı kısıtlamalar küçük çocuklarda gelişmekte olan beynin yüksek Phe seviyelerinin nörotoksik etkilerine olan duyarlılığından kaynaklanmaktadır (Demirkol ve ark., 2011). Genel olarak 40-360 $\mu\text{mol/l}$ fenilalanin konsantrasyonları güvenli olarak kabul edilir. Günümüzde uzmanlar yaşam boyu düşük bir fenilalanin diyeti önermektedir. Bununla birlikte sıkı diyet yönetimi erken yaşamda özellikle önemlidir çünkü fenilalanin değerleri ile IQ arasında anlamlı bir ters korelasyon olduğu, 12 yaşına kadar olan çocuklarda ortalama kan fenilalanin konsantrasyonundaki her 100 $\mu\text{mol/l}$ artışın IQ'da 1,3 - 3,1 puanlık azalma ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir (Mitchell ve ark., 2011). Öte yandan geç tanı konmuş küçük çocukların çoğunun net bir şekilde gözlenen zihinsel engellilik derecesini koruduğu ve hemen hepsinin önemli öğrenme problemleri gösterdiği görülse de, diyet tedavisinden belirgin ve hızlı yarar sağladıkları gösterilmiştir. Yetişkinlikte diyetin bir miktar rahatlatılması mümkündür ancak diyetin ne ölçüde ihmal edilebileceği konusunda bir fikir birliği yoktur ve bu nedenle yetişkin hastalar bireysel bir tedaviye ihtiyaç duyarlar (Feillet ve ark., 2010).

Fenilalaninden kısıtlı diyetle bağlılık hamilelik planlayan FKÜ'lü kadınlar için özellikle önemlidir çünkü yüksek Phe seviyeleri teratojeniktir ve çoğunlukla düşük yapma riski ile ilişkilidir. FKÜ'lü kadınların çocuklarında intrauter gelişme geriliği (% 40), mikrosefali (% 73), psikomotor gerilik (% 92) ve doğuştan kalp defekti (% 10) görülür. Ayrıca doğum sonrası gelişme geriliği, anormal nörolojik bulgular ve hafif dismorfik yüz özellikleri de bildirilmiştir (Waisbren ve ark., 2015). Bu nedenle gebe kalmadan önce sıkı bir diyet tedavisi uygulanmalı ve hamilelik süresince diyetle devam

edilmelidir. Dahası hamilelik sırasında PAH yetersiz kadınlar yeterli enerji alımını ve normal kilo alımını sağlamak ve aynı zamanda düşük plazma Phe konsantrasyonlarını korumak için sürekli beslenme rehberliğine tabi tutulmalıdır. En iyi gözlenen sonuçlar maternal kan Phe seviyesinin sıkı kontrolünün hamile kalmadan önce kurulduğu ve hamilelik boyunca devam ettiği zaman ortaya çıkar. Hamilelikte önerilen Phe kontrol seviyeleri 120–360 $\mu\text{mol/l}$ arasındadır (Waisbren ve ark., 1998).

Bebeklik döneminde, çoğunlukla ebeveynlerin kontrolü nedeniyle diyete bağlılık kolaydır. Ancak çocuklar büyüdükçe diyete bağlılık zorlaşır. Ek olarak diyet rejimine bağlı zorluklar, amino asit takviyelerinin rahatsız edici tadı, psikososyal ve duygusal faktörler ve düşük proteinli özel gıdalar için ödeme zorluğu diyete zayıf uyum nedenleridir. Sonuç olarak geç ergenlik ve yetişkinlik döneminde FKÜ hastalarının en az % 75' i diyet tedavisine uymamaktadır. Ergenlik döneminde diyet yönetiminin kesilmesi hayatı tehdit edici değildir. Bununla birlikte yetişkinlerde azalmış dikkat süresi, yavaş motor reaksiyon süresi, yavaş bilgi işleme yetenekleri, artan kas tonusu, düşük kemik mineral içeriği gibi ince ama ölçülebilir eksikliklere yol açmaktadır (Mitchell ve ark., 2011).

Sıkı bir diyet tedavisi uygulanan, özellikle reçete edilen tıbbi gıda takviyelerini tam olarak tüketmeyen FKÜ hastalarında beslenme yetersizlikleri yaygındır. FKÜ hastaları ayrıca B₁₂ vitamini, D vitamini, kalsiyum, demir ve doymamış uzun zincirli yağ asitlerinden eksiklik riski altındadır (MacDonald ve ark., 2011). Bu eksiklikler nörolojik sorunları daha da kötüleştirebilir (Modan-Moses ve ark., 2007).

BH₄ Tedavisi

1950' lerin sonlarında BH₄' ün PAH enzimi için temel bir kofaktör olduğu kabul edilmiş, Kure ve arkadaşları (1999) BH₄' ün farmakolojik dozlarının PAH' daki mutasyonların neden olduğu HPA' lı hastalarda plazma Phe konsantrasyonlarında azalmaya yol açabileceğini göstermiştir. BH₄ takviyesi kan Phe seviyesinin düşmesine, Phe toleransının artmasına ve hastalarda Phe' den kısıtlı diyetin gevşetilmesine izin verir.

2007' de ABD' de sapropiterin dihidroklorür FKÜ için adjuvan tedavi olarak onaylanmıştır. Ayrıca klinik çalışmalarda 5-25 mg/ kg/ gün dozlarında uygulandığında, tedavi edilen katılımcıların yaklaşık % 32-50' sinde plazma Phe konsantrasyonunda bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Faz II ve III klinik deneyleri, sapropiterinin BH₄

yükleme testine yanıt veren hafif ve orta şiddette FKÜ' lü HPA ve bazı hastalarda seçilmiş ve güvenli bir tedavi olduğunu göstermiştir (Burnett, 2007).

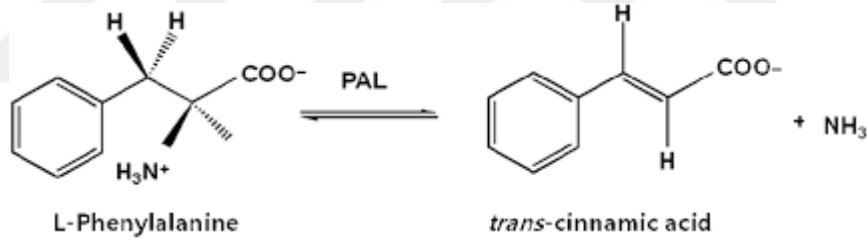
BH₄ duyarlılığı için hiperfenilalaninemili hastaların test edilmesine ilişkin öneriler değişmektedir. Phe düzeyi > 360 µmol/ l olan tüm hastalar sapropiterine cevap verilebilirlik açısından test edilmelidir. BH₄' e duyarlılık, hastalara 20 mg/ kg' lık tek bir oral doz ile verilen yükleme testi ile değerlendirilebilir. 24 saat sonra Phe seviyelerinin % 30' dan fazla azalması, BH₄' e duyarlı olarak tanımlanır (Blau ve ark., 2009). Kan fenilalanin konsantrasyonlarının % 85' ten daha fazla azalması BH₄ eksikliğine işaret ederken, % 20' den daha az bir azalma hastanın tedaviye cevap vermediğini gösterir. Bununla birlikte yükleme testlerinde, ölçümlerin alındığı zaman noktalarında ve Phe başlangıç seviyelerinde diğer farklılıklar da bildirilmiştir (Burton ve ark., 2007). Bazı hastalar ilk 8 saatte Phe azalması gösterebilir ancak 24 saatte başlangıç Phe seviyelerine dönebilirler (Mitchell ve ark., 2005). Öte yandan bazı hastalar yalnızca 48 saatte (Anjema ve ark., 2011) pozitif cevap verebilirler. Bu nedenle tatminkar bir tedavi cevabı alınır (kan fenilalanin konsantrasyonlarında en az % 30 azalma), Phe cevabına göre doz ayarlanır (önerilen aralık 5-20 mg/ kg). Yeterli bir cevap alınamazsa (kan fenilalanin % 20-30 oranında azalır) günde 20 mg/ kg' lık bir dozda tedaviye 1-3 hafta daha devam edilerek hastanın tedaviye uygun olup olmadığı belirlenir. Duyarlı değilse tedavi sonlandırılır. BH₄ tedavisinin faydalı olabileceği FKÜ hastalarının yüzdesinin % 30 ile % 50 arasında olduğu tahmin edilmektedir.

PAH eksikliği olan hastalar için BH₄ tedavisinin başlamasından bu yana BH₄' ün etki tarzını analiz etmek ve açıklığa kavuşturmak için birçok çalışma yapılmıştır. Farmakolojik şaperonlar, protein katlanmasını iyileştirerek protein yapısını stabilize eden, protein fonksiyonunu düzelter ve hedef proteinin doğal ligandlarına (örneğin protein kofaktörleri, agonistler, antagonistler, rekabetçi inhibitörler) benzeyen moleküllerdir. Yanlış katlanan proteine elektrostatik kuvvetler, van der waals kuvvetleri veya hidrojen bağı yoluyla tersinir olarak bağlanırlar. Hedef proteini yeniden katlama kabiliyetleri yoktur ancak mutant enzimin yarılanma ömrünü arttırarak onu proteolitik bozunmadan korur ve böylece dengeyi katlanmış duruma doğru değiştirebilirler. BH₄' e cevap verme mekanizmaları çok yönlü olmasına rağmen BH₄' ün yanlış katlanmış PAH varyantlarını dengeleyici bir farmakolojik şaperon olarak işlevini yerine getirdiği yaygın olarak kabul edilmektedir (Pey ve ark., 2007).

Enzim Replasman Tedavisi -Fenilalanin Amonyak Liyaz (PAL) Enzimi

PAH enzim replasman tedavisinin temel amacı fonksiyonel enzimi organizmaya verimli bir şekilde iletmektir. Rekombinant olarak ekspresse edilen insan PAH enziminin büyük ölçekte saflaştırılması karmaşık aktivitesi ve BH₄ gerekliliği nedeniyle zor olduğundan bir alternatif enzime ihtiyaç vardır. BH₄ tedavisinin aksine, enzim değişimi PAH genotipine bağlı değildir. Enzimin değiştirilmesi kısmi karaciğer veya normal hepatosit nakli ile kolaylaştırılabilir. Her ne kadar karaciğer nakli FKÜ' de metabolik fenotipi düzeltse de majör cerrahi ve yaşam boyu immünoşüpresyon riski rutin kullanımı engeller (Vajro ve ark., 1993).

PAL (EC 4.3.1.5) ile enzim replasman tedavisi daha umut verici görünmektedir. Memelilerde bulunmayan PAL enzimi bitkilerde, bazı mantarlarda ve mayalarda bulunur. Ayrıca E. Coli' den de üretilir (Rao ve ark., 1967). PAL, güçlü bir otokatalitik enzimdir ve Phe' yi metabolize etmek için kofaktör gerektirmez. PAL ile Phe önce trans-sinamik asite sonrasında karaciğerde benzoik aside dönüştürülür ve idrarda hippürik asit olarak atılır (Hoskins ve Gray, 1982) (Şekil 9).



Şekil 9. PAL enziminin katalizlediği reaksiyon (Hyun'dan, 2011)

1980' lerin başlarında FKÜ tedavisi için PAL araştırılmış ve insan FKÜ hastalarında enzim replasman tedavisi çalışmalarına enterik kaplı jelatin kapsüllere Maya R. glutinis'den saflaştırılmış PAL' in oral yoldan verilmesi ile başlanmıştır. PAL FKÜ hastalarındaki kan Phe seviyelerini % 22 azaltmıştır (Hoskins ve ark., 1980). Ancak PAL mide sıvısında hızla inaktive olmuştur. Oral yolun uygulamasının kolaylığına rağmen enjekte edilen PAL' in immünojenik reaksiyonlara neden olması ve PAL' in aktivitesini mide asiditesine ve pankreas proteazlarına karşı korumak amacıyla bir ön işlem gerektiği sonucu ortaya çıkmıştır (Gilbert ve ark., 1981). Polietilen glikol (PEG) ile konjugasyon (PEG-PAL), immün yanıtı azaltmada ve enzim aktivitesinin korunmasında başarılı olmuştur. Pegilasyon metodu Wieder ve arkadaşları (1979)

tarafından R. glutinis'den elde edilen PAL' e uygulanmıştır. Hastaların deri altı altından yapılan 1. enjeksiyondan sonra doğal PAL'in yarı ömrü 6 saat iken PEG-PAL yarı ömrü 20 saat olmuştur. İnsanlarda Faz I çalışmaları, FKÜ' lü erişkin hastalarda PAL-PEG' in subkutan olarak 0.1 mg/ kg' lık tek bir dozda uygulanmasının güvenli olduğunu, iyi tolere edildiğini ve kan Phe seviyelerinde belirgin düşüslere yol açtığını göstermiştir. Olumsuz olaylar arasında enjeksiyon bölgesi reaksiyonları, baş dönmesi ve cilt döküntüleri kaydedilmiştir. Laboratuvar test sonuçlarında önemli bir değişiklik gözlenmemiş ancak tüm hastalarda antikorlar geliştirilmiştir. Kan PAL düzeyleri ilacın uygulanmasından yaklaşık 5 gün sonra en üst seviyeye ulaşmış ve enjeksiyondan 6 gün sonra kan Phe seviyelerinde ortalama %54 düşüğe neden olmuştur. Fenilalanin düzeyleri enjeksiyondan 21 gün sonra bazal seviyelere yakın konsantrasyonlara geri dönmüştür (Longo ve ark., 2014).

Enzim replasman tedavisi FKÜ' lü tüm hastalar için büyük umut vaat etmektedir. PAL-PEG' in klinik gelişimi şu anda oldukça ilerlemiş durumda olup Faz II ve Faz III çalışmaları devam etmektedir.

Büyük Nötral Amino Asit (LNAA) Takviyesi

FKÜ' nün tedavisinde bir diğer cesaretlendirici yaklaşım LNAA' larla diyet takviyesidir. LNAA tedavisi hipotezinin kökeni, Olendorf ve arkadaşlarının (1976) amino asitlerin kan beyin bariyeri boyunca taşınması konusundaki çalışmalarından kaynaklanmaktadır. Kaufman (1977), FKÜ tedavisinin bir parçası olarak Phe' nin beyne girişi ile rekabet etmesi için LNAA' ların kullanılmasını önermiştir. Pardridge (1982) amino asitlerin kan beyin bariyeri boyunca hareketini incelemek için deneysel bir model kullanarak ortak bir taşıyıcının (LAT1) olduğunu ve diğer LNAA' ların (tirozin, triptofan, treonin, izolösin, lösin, valin, metiyonin ve histidin) konsantrasyonundaki artışın Phe' nin beyne taşınmasıyla rekabet ettiğini doğrulamıştır.

Olası LNAA tedavi hedefleri arasında kan ve beyin Phe konsantrasyonlarının azaltılması, beyin nörotransmitter sentezinin arttırılması ve serebral esansiyel amino asit konsantrasyonlarını arttırılması vardır (van Spronsen ve ark., 2009).

Özet olarak, tek başına veya düşük Phe diyetiyle kombinasyon halinde LNAA takviyesinin, düşük Phe diyetini takip edemeyen bireyler için sağlık sonuçlarını iyileştirdiği gösterilmiştir.

Glikomakropeptitler (GMP)

GMP, doğal olarak düşük Phe oranına sahip, izölösün, valin ve treonin bakımından zengin, peynir altı suyundan elde edilen 64 aminoasitten oluşan bir proteindir (Etzet, 2004). Yeterli saflıkta üretilmiş ve tirozin, triptofan, arginin, sistein ve histidin ile desteklenmiş GMP, Phe kısıtlı diyetine faydalı bir yardımcı olabilir. Çalışmalar, FKÜ hastalarının GMP içeren yiyecekleri normal amino asit formüllerinden daha lezzetli bulduklarını ve GMP ile desteklenmiş bir diyeti tercih ettiklerini göstermektedir (Ney ve ark., 2009). GMP' nin FKÜ diyetinde bulunmasının potansiyel faydaları araştırılmış ve veriler GMP diyetinin üregenezi, protein tutulumunu ve Phe düzeyini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (van Calcar ve ark., 2009). Bir başka çalışma GMP diyetinin kahvaltıda tüketilmesinin, bir amino asit diyeti ile karşılaştırıldığında postprandiyal grelin konsantrasyonunu azalttığı gibi doygunluğu artırdığını göstermiştir (Macleod ve Ney, 2010). Bu veriler umut vericidir ve amino asit diyetine alternatif olarak kullanılabilir ancak GMP diyetinin insan deneklerinde sistemik inflamasyon üzerindeki etkisini araştırmak ve GMP tüketiminin uzun süreli güvenilirliğini ve etkinliğini daha iyi değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Gen Tedavisi

Gen tedavisinde fonksiyonel bir rekombinant PAH geni, PAH aktivitesi esas olarak karaciğerde olduğundan karaciğeri hedef alır. Adeno-viral vektörler fare modellerinde FKÜ' yü düzeltme potansiyeli açısından incelenmiştir. İnsan PAH-cDNA' sını içeren bir rekombinant adenoviral vektörü FKÜ farelerinin portal veni yoluyla karaciğer içine infüze edilmiş, bir hafta içinde serum fenilalanin seviyelerinin tamamen normalleşmesi sağlanmıştır. Bununla birlikte adenoviral vektörün terapötik etkisi birkaç hafta sonra kesilmiş ve tekrarlanan uygulamada immün yanıtın gelişmesi nedeniyle orijinal sonuçlar tekrar elde edilememiştir (Fang ve ark., 1994). PAH aktivitesinin zaman içindeki kaybı hepatositlerin sürekli yenilenmesi ve adeno-viral vektörün kaybı nedeniyledir. Antikor aracılı immün yanıtlar aynı vektörün yeniden enjeksiyonunun etkinliğini de azaltmıştır. Bu tedavinin etkili olması için adenoviral vektörlerin modifiye edilmesi gerekmektedir (Ding ve ark., 2004). İskelet kası gen tedavisi için daha ümit verici bir hedef olarak kabul edilmiştir çünkü karaciğere kıyasla kolayca erişilebilirdir ve hücreler daha uzun ömürlüdür. Öte yandan PAH' ın kofaktörü olan BH₄' ün

biyosentezi için gerekli olan enzimler kas dokusunda bulunmamaktadır. Viral vektörlerdeki gelişimin hem karaciğer hem de kas yönelimli gen tedavilerinde devam etmesi muhtemeldir (Thöny, 2010).

2.2. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptoz Mekanizması

2.2.1. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum salgı ve transmembran proteinlerin sentezinden, olgunlaşmasından, katlanmasından, kalite kontrolünden ve yıkımından sorumludur. (Wang ve ark., 2016). ER hücredeki en büyük organeldir. Lipid ve steroid sentezi, karbonhidrat metabolizması ve kalsiyum depolamasının yapıldığı ana bölgedir. ER granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum olmak üzere ikiye ayrılır. Granülsüz ER yağ asidi ve fosfolipit sentezi, karbonhidrat metabolizması, Ca^{+2} homeostazının regülasyonu ve ayrıca ilaç ve ksenobiyotiklerin metabolizması için önemlidir. Granüllü endoplazmik retikulum protein sentezinin yapıldığı hücrelerde daha çok bulunur, üzerinde proteinlerin sentezlendiği ribozomları taşır ve proteinlerin üç boyutlu yapısının oluşturulduğu yerdir (Görlach ve ark., 2006). Protein sentezinin yapıldığı hücrelerde daha yüksek miktarlarda bulunur.

Proteinler çok yönlü ve yapısal olarak karmaşık biyolojik makromoleküllerdir. Hemen hemen her biyolojik sürece katılırlar. Memeli hücrelerinde ribozomlar üzerinde 10.000' den fazla farklı protein türü sentezlenir. Proteinlerin görevlerini yerine getirebilmesi ve fonksiyonel aktivite kazanabilmeleri için üç boyutlu yapılar katlanması gerekir (Hartl ve ark., 2011). Proteostaz; protein sentezi, katlanması ve yıkımı arasındaki hassas dengenin korunması yoluyla sağlanır. Bu nedenle hücre şaperon moleküllerinin, ubikitin proteozom yolunun ve otofajinin önemli rol oynadığı protein kalite kontrol sistemleri ile donatılmıştır (Balch ve ark., 2008). Ökaryotik hücrelerde protein katlanması mitokondri, peroksizomlar, endoplazmik retikulum sitozol ve çekirdek dahil bir dizi hücre bölmesinde gerçekleştirilir.

Protein sentezinden sonra hücre dışına gönderilecek olan proteinler ve transmembran proteinleri, ER' nin sitozolik yüzeyinde yer alan ER lümenine gelir. Bu ER translokasyon proteinleri, uygun üçüncül yapılarını oluşturmak için ER şaperonları ve katlama faktörleri tarafından katlanır ve glikozilasyon, hücre içi ve moleküller arası disülfür bağlarının oluşumu da dahil olmak üzere çok sayıda post-translasyonel

modifikasyona uğrar. Kalite kontrol olarak adlandırılan bu işlemde sadece doğru katlanmış proteinler golgi kompleksine sevk edilir.

Bu kalite kontrol süreci, retiküler bölmenin belirli şaperonları tarafından hassas bir şekilde düzenlenir. Bunlar üç gruba ayrılabilir: i) GRP78 ve GRP94 (Fu ve Gao, 2014), ii) kalneksin ve kalretikulin, iii) glikoproteinlerin olgunlaşma sürecine katılan lektinlerdir (Williams, 2006; Ishida ve Nagata, 2011). Ayrıca özellikle kollajen için ısı şok proteini 47 (Hsp47), disülfid bağlarının oluşumunu veya yıkımını katalize eden disülfid izomerazları (PDI' lar) gibi moleküller de görev yapar (Fu ve Gao, 2014).

2.2.2. GRP78 (Glikoz ile Düzenlenen Protein 78)

ER şaperonları, ER lümeni içinde yeni sentezlenmiş polipeptitlerin katlanmasına yardımcı olur ve katlanmamış proteinlerin toplanmasını önler. En iyi karakterize edilen ve hücrede en çok bulunan ER şaperonu BiP (binding immunoglobulin protein) veya HSPA5 olarak da adlandırılan 70 kDa ısı şoku proteinleri (HSP70) ailesine ait 78-kDa' luk GRP78' dir. GRP78, yeni sentezlenen polipeptitlerin ER membranı boyunca translokasyonunu, proteinlerin katlanmasını ER ile ilişkili yıkım için yanlış katlanmış proteinlerin hedeflenmesini, kalsiyum homeostazını düzenlemeyi ve bir ER stres sensörü olarak hizmet etmeyi içeren birçok hücresel süreçte yer alır (Lee, 2005).

GRP78 genellikle yeni oluşan bir polipeptit zincirini bağlayan ilk şaperondur. Amino asitlerin hidrofobik yüzeylerine bağlanır. Sitozolik HSP70' ler gibi, ATP' yi bağlayan ve hidrolize eden bir N-terminal nükleotit bağlanma alanından ve polipeptitleri bağlayan bir C-terminal substrat bağlanma alanından oluşur (Määttänen, 2010). Nükleotit bağlanma alanı ATP' yi bağlar ve hidrolize eder, substrat bağlanma alanı polipeptitleri bağlar. Hsp70' ler, ATP bağlanması ve hidrolizi ile düzenlenen substrat bağlanma döngüleri ve salınımları yoluyla proteinlerin uygun şekilde katlanmasını ve toplanmasını önleme işlevini görür.

GRP78 ayrıca kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. ATPaz aktivitesi yüksek konsantrasyondaki kalsiyum iyonları tarafından inhibe edilirken ve kalsiyum tükenmesi ile aktive edilir. GRP78 esas olarak ER lümeninde bulunur ancak bazı koşullar altında sitozol, çekirdek ve mitokondriye de gönderilir (Suzuki ve ark., 1991). ER stresi ve UPR sinyalleri GRP78' in mitokondriyal lokalizasyonuna neden olarak ekspresyonunu indükler. Alt mitokondriyal fraksiyon çalışmaları GRP78' in ağırlıklı olarak

membranlar arası boşlukta, iç zarda ve mitokondri matrisinde lokalize olduğunu göstermiştir (Sun ve ark., 2006).

GRP78' in seviyeleri hücre içinde nispeten düşük seviyelerde tutulur ve endoplazmik retikulum (ER) ve kalsiyum homeostazını etkileyen stresler altında önemli ölçüde artar.

2.2.3. GRP94 (Glikoz ile Düzenlenen Protein 94)

Bir başka ana ER şaperonu, ER' de en bol bulunan glikoprotein olan 94 kDa' luk ağırlığa sahip GRP94' tür. İlginçtir ki mayadan insana korunan GRP78' den farklı olarak GRP94 sadece çok hücreli organizmalarda bulunur. GRP94, hem doğal hem de adaptif immün yanıtın başlangıcında etkilidir (Yang ve Li, 2005). GRP78 gibi protein katlanmasına katılır, ER protein katlama makinesinin diğer bileşenleriyle etkileşime girer, ER kalsiyumunu depolar ve ER ile ilişkili bozulma (ERAD) için yanlış katlanmış proteinlerin hedeflenmesine yardım eder (Eletto ve ark., 2010). GRP78' e kıyasla GRP94' ün müşteri proteinleri bağışıklık ve büyüme sinyali gibi kritik rollerde daha seçicidir.

2.2.4. Kalneksin / Kalretikulin

Kalneksin ve kalretikulin Ca^{2+} iyonu bağlanması, lektin benzeri aktivite ve yanlış katlanmış proteinlerin tanınması dahil olmak üzere birçok işlevi olan şaperonlardır. Yeni sentezlenmiş proteinlerin glikozilasyonu, katlanması, kalite kontrolü ve yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı için sinyal olarak hareket eder. Kalneksin integral bir membran proteini iken kalretikulin ER lümeninde serbestçe hareket edebilen bir lümen proteini. Bu nedenle kalneksin ER zarının sabit fazındaki protein katlama ara maddeleri ile geçici olarak etkileşime girerken, kalretikulin lümenin daha hareketli ortamında protein katlama ara maddeleri ile etkileşime girer (Yoshida ve ark., 2002). Olgunlaşmamış protein endoplazmik retikuluma girdiği zaman N-bağlı glikozilasyon işlemine tabi tutulur. Protein doğru katlanmışsa son glukoz uzaklaştırılarak olgun protein golgiye gönderilir. Eğer protein doğru katlanamamışsa UGGT (UDP-glukoz; glikoprotein glukosiltransferaz) katlanmış ve katlanmamış proteinler arasında ayırım yapar ve sadece katlanmamış proteinlere glukoz kalıntısını geri ekler. Böylece kalneksin ve kalretikulin için bağlanma bölgesi oluşturulur. Doğru konformasyon gerçekleşirse protein golgiye gider. Bu deglikozilasyon-glikozilasyon döngüsü, yeni sentezlenmiş bir

glikoproteininin düzgün bir şekilde katlanmasından önce birkaç kez tekrarlanabilir. Düzgün katlanma olmazsa protein ubiquitin-proteozom tarafından yıkıma uğratılır (Schroder ve Kaufman, 2005).

2.2.5. Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Protein Yıkımı (ERAD, Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation)

Proteinlerin yıkımı, hücrelerde protein homeostazının korunması için protein sentezi kadar önemlidir. Proteinlerin katlanması N-bağımlı glikozilasyonun inhibisyonu, kalsiyum homeostazının bozulması, hipoksi, oksidatif stres, enfeksiyonlar, ortamın sıcaklığı gibi çok sayıda etkenden etkilendiğinden hatalı katlanma olasılığı oldukça yüksektir. Yanlış katlanmış proteinler GRP78 gibi şaperonlar tarafından tanınır ve daha sonra yeniden katlama işlemlerinin gerçekleştirilmesi için ER' de tutulur (Ellgaard ve ark., 1999). Tekrar katlama işleminin başarısız olduğu durumlarda yanlış katlanmış proteinler tekrar sitozole döner ve ERAD yolu aracılığı ile proteozomlar tarafından parçalanır (Nishikawa ve ark., 2005).

Ökaryotlarda, ubiquitin-proteozom sistemi protein yıkımının çoğundan sorumludur. Ubikitin, tüm ökaryotlarda yüksek oranda korunan 76 amino asit içeren bir polipeptittir. Proteinler, ubiquitin lizin kalıntısının yan zincirinin amino grubuna eklenmesi ile bozulma için işaretlenir. Bu tür ubiquitine edilmiş proteinler, proteozom adı verilen çok birimli bir proteaz kompleksi tarafından tanınır ve yıkımlanır. Ubikitin işlem sırasında serbest bırakılır bu nedenle başka bir döngüde tekrar kullanılabilir (Nishikawa ve ark., 2005).

2.2.6. Endoplazmik Retikulum Stresi

En geniş tanımında stres, herhangi bir sistemin normal durumunun bozulmasına verdiği tepkidir (Selye, 1985). Katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin ER' de birikmesi "ER stresi" olarak adlandırılır. Hücreler ER stresinin üstesinden gelmek için katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan kendinden koruyucu bir mekanizmayı harekete geçirir. UPR, ER' deki ana kalite kontrol mekanizmasıdır ve bu yanıtla hücre proteostazı sağlamaya çalışılır. Bununla birlikte, eğer protein agregasyonu kalıcıysa ve stres çözülemezse hücre apoptoza yönlendirilir.

Viral enfeksiyonlar, glikozilasyonun inhibisyonu, disülfid bağlarının indirgenmesi, ER kalsiyum depolarının tükenmesi, golgiye protein transferinin bozulması, ER’de protein sentezinin artması, ERAD mekanizmasının bozulması veya mutasyona uğramış ER proteinlerinin ekspresyonu gibi çok çeşitli koşullar ER homeostazını değiştirebilmektedir (Ron ve Walter., 2007).

ER lümeni, kalsiyum açısından zengin, oksidatif bir ortamdır ve disülfid bağı oluşumu ve uygun protein katlanması için ideal koşulları sağlar. Kalsiyum depolarının tükenmesi GRP78, kalneksin ve kalretikulinin işlevine müdahale eder. (Vassilakos ve ark., 1998).

Azalan glukoz seviyeleri UPR yolunu aktive eder çünkü proteinlerin katlanması ve toplanması büyük miktarda enerji gerektirir. Ayrıca bazı proteinlerin glikozilasyonu uygun katlanmaları için çok önemli bir adımdır. İskemi sırasında azalan kan akımı benzer bir mekanizma ile ER’ de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine yol açan lokal hipoglisemi ile sonuçlanır (Glembotski, 2008).

Virüsler ER’ ye akut olarak protein yüklenmesine neden olur. Bu da ER stresine ve UPR yolağının aktivasyonuna yol açar. Virüsler ayrıca metabolik hızda artışa neden olarak daha yüksek ATP kullanımına neden olur. Bu da UPR yolunu tamamen aktive eden geçici glukoz tükenmesiyle sonuçlanır (Lee, 2005).

Protein zincirinin en stabil konformasyonda katlanmasını önleyen belirli mutasyonlar da ER stresine neden olur. Yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinler, hücre için toksik agregatları birleştirme ve oluşturma eğilimindedir. Parkinson (Ryu ve ark., 2002), Alzheimer (Hoozemans ve ark., 2009) ve Huntington (Atwal ve ark., 2007) gibi bazı nörodejeneratif hastalıklar yanlış katlanmış proteinlerin bZİNGirikimi ile ilişkilendirilmiştir.

2.2.7. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR, Unfolded Protein Response)

UPR, hücrelerin farklı mekanizmalar kullanarak homeostazı geri kazanmalarına yardımcı olur. Genel olarak UPR’ deki hücresel tepkiler:

1. Katlanmış proteinlerin daha fazla üretilmesini önlemek için translasyonun zayıflatılmasından (Harding ve ark., 2000)
2. Protein katlanmasına yardımcı olmak için ER’ de yerleşik proteinlerin (şaperonlar ve foldazlar) transkripsiyonel indüksiyonundan (Gething ve Sambrook., 1992)

3. Hatalı katlanmış proteinleri yıkıma uğratmak ve ER katlama kapasitesi üzerindeki yükü azaltmak için ERAD süreçlerinin uyarılmasından (Yoshida ve ark., 2000)

4. Katlanmamış proteinlerin yüküyle başa çıkabilmek için ER' nin büyütülmesinden oluşur (Selye, 1985).

UPR' ye üç ER transmembran sensörü aracılık eder. Bunlar; protein kinaz RNA benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve inositol gerektiren enzim 1 (IRE1)' dir. Bu proteinlerin üçü de lüminal bir ER domaini içerir ve fizyolojik koşullar altında GRP78 ile beraber inaktif halde bulunmaktadır. ER lümenindeki anormal koşulları algılayarak bilgiyi membrandan sitozole iletirler (Walter ve Ron, 2011).

Üç sensör protein katlama makinesini indüklemek ve katlanmamış proteinlerin yükünü azaltmak için işbirliği yapar. Katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikmeye başlamasıyla GRP78 ER membran proteinlerinden ayrılır ve ER stres sensörleri aktive olur. PERK, IRE1 ve ATF6; ER şaperonlarının ekspresyonunu artıran, ER' ye yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini önleyen, mRNA translasyonunu durdurarak ER' ye protein girişini inhibe eden ve hatalı katlanmış proteinlerin ubiquitinasyon ile yıkım için ER' den ERAD' a taşınmasını uyaran sinyal yollarını indükler.

Protein Kinaz RNA (PKR) Benzeri ER Kinaz (PERK) Sinyal Yolu

PERK, tip I transmembran proteinidir. N- terminali ER sinyallerini algılar. C-terminali bir serin/ treonin protein kinaz fonksiyonel alanına sahiptir, ancak endonükleaz aktivitesinden yoksundur. PERK hem dimer hem de geçici tetramer durumunda bulunur ve tetramer durumu dimerden daha yüksek aktivasyona sahiptir. PERK stabil dimerler oluşturmak üzere oligomerize olur ve daha sonra bir helezonik takas veya sarmal alt ünite yoluyla iki dimerin iç içe geçmesi tetramer konfigürasyonunu üretir (Carrara ve ark., 2015). Tetramer arayüzü, temel olarak tetramer yapısını stabilize etmeye ve fosforilasyon verimini arttırmaya yardımcı olduğu düşünülen hidrofobik artıklardan oluşur.

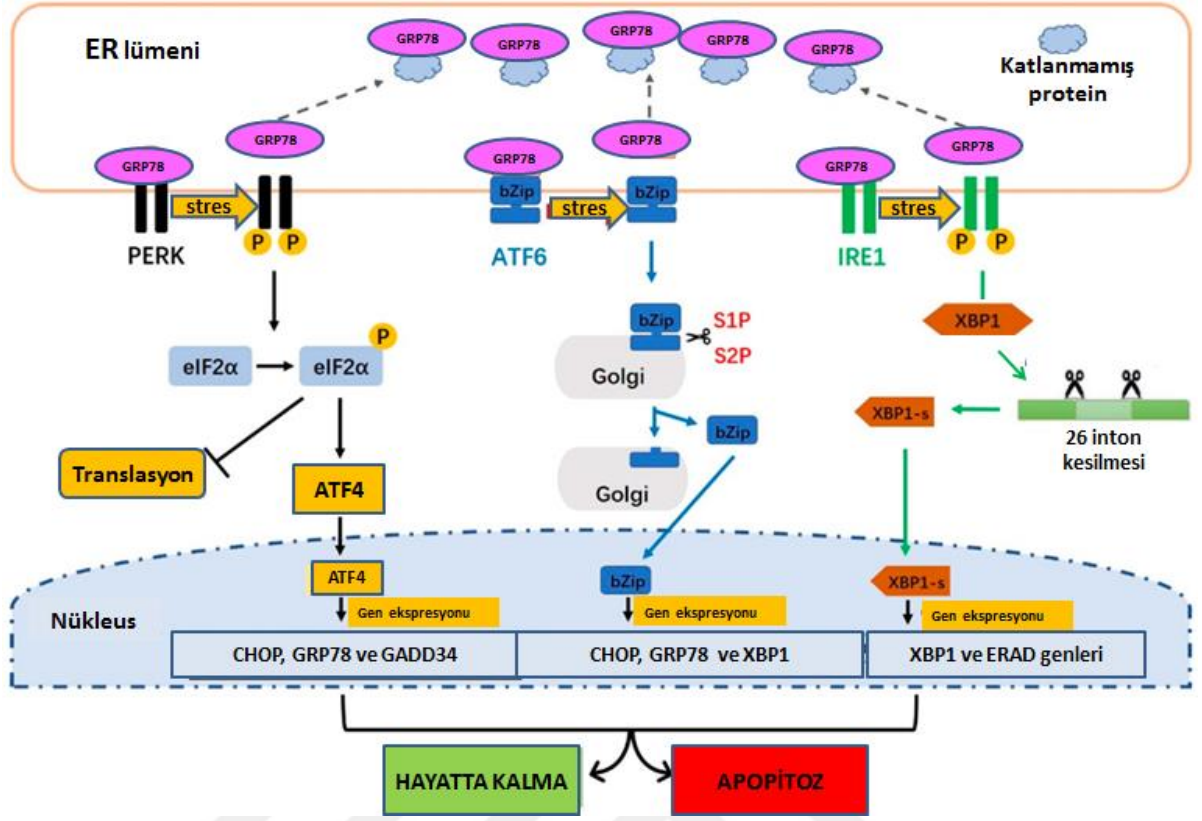
ER stresi olmadığında, ER membranında GRP78 ile beraber inaktif şekilde bulunmaktadır. ER stresine cevaben GRP78' den ayrılarak sitozolik kinaz alanı trans-otofosforilasyona uğrar ve ökaryotik translasyon başlatma faktörü eIF2 α ' nın 51.

pozisyonundaki serini fosforiller (Harding ve ark., 1999). Guanozin difosfatın (GDP) GTP ile yer değiştirmesini sağlayan bir protein olan ökaryotik başlatıcı faktör β (eIF2 β), eIF2 α ' ya GTP' yi ekleyemez ve böylece (eIF2 α / GTP/ Met-tRNAi) translasyon başlangıç kompleksinin oluşumu engellenir. Sonuç olarak genel protein sentezi azalır ve dolayısıyla ER' ye giren proteinlerin yükünde bir azalma olur.

PERK aracılı eIF2 α fosforilasyonu, hücre kaderini belirleyen genlerin ekspresyonunu çeşitli mekanizmalarla doğrudan düzenler. eIF2 α ' nın fosforilasyonu genel olarak translasyonu zayıflatırken, ER' nin kapasitesini artırarak stresi azaltan aktive edici transkripsiyon faktörü 4 (ATF4, activating transcription factor 4) gibi belirli mRNA' ların ekspresyonunu indükler. ATF4, nükleusa girdikten sonra cAMP yanıt elemanına bağlanarak hücre kaderini belirleyen karmaşık bir gen ağının transkripsiyonunu yönlendirir. ATF4' ün transkripsiyonel aktivitesi hem hücrenin hayatta kalmasını hem de hücre ölüm programlarını indükler. Hafif ER stresi altında ATF4, aktive edici transkripsiyon faktörü 3 (ATF3), glutatyon biyosentezi, oksidatif strese dirençte rol alan genlerin transkripsiyonunu ve amino asit metabolizmasında yer alan genleri tetikleyerek hücre sağkalımını uyarır. Bununla birlikte, uzun süreli stres altında, ATF4 ve C/ EBP homolog proteinini (CHOP) ve GADD34' ü (büyüme durdurma ve DNA hasarı indükleyen gen 34) indükleyerek hücre apoptozisini teşvik eder (Han ve ark., 2013) (Şekil 10).

PERK, ayrıca antioksidanları, enzimlerin detoksifikasyonunu, immün sinyali, hücre büyümesini kapsayan genleri indükleyen bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2' yi (Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2) de fosforillemektedir (Hussain ve Ramaiah., 2007).

PERK' den yoksun fare embriyonik fibroblastları, ER stres indükleyici ajanlarla muamele edildiğinde, protein translasyonunun engellenemediği ve hücre ölümünün arttığı tespit edilmiştir (Harding ve ark., 2000). Sonuç olarak PERK aktivasyonu, başlangıçta hafif stres sırasında bile hayatta kalmak için koruyucu ve çok önemlidir.



Şekil 10. UPR sinyal yolları (Lin ve ark., 2019' dan uyarlanmıştır)

Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) Sinyal Yolu

ATF6, ER stresine bağlı ER genişlemesinden, şaperonların, foldazların ve ERAD yolunun bileşenlerinin indüksiyonundan sorumlu bir sensördür. Stres algılayıcı C-terminal bir lümen domaini ve N-terminal bZip transkripsiyon faktörü domaini içeren, tip II transmembran proteinidir. Memelilerde ATF6 α ve ATF6 β olmak üzere iki geni mevcuttur. ATF6 α ve ATF6 β proteinleri tüm hücrelerde sentezlenir. ATF6 hücrede ER stresi olmadığında ER membranında GRP78 ile beraber inaktif şekilde bulunmaktadır. ER stres koşullarında GRP78' den ayrılarak golgiye geçer. Burada N-terminal transkripsiyon faktörü alanını (ATF6-N) membrandan serbest bırakmak için site-1 ve site-2 proteazları (S1P ve S2P) tarafından art arda proteolize edilir (Schroder ve Kaufman, 2005). Serbest bırakılan ATF6-N nükleusa transloke olur ve transkripsiyon faktörü olarak hareket ederek ER stres yanıt elemanına (ERSE) bağlanır. UPR sırasında ATF6' nın önemli hedef genleri GRP78, XBP1 (X-box bağlayıcı protein-1) ve CHOP' dur (He ve ark., 2010) (Şekil 10).

ATF6 α ve ATF6 β ' den yoksun fareler hayatta kalabilirken, ATF6 α ve ATF6 β ' nin ikisinin de olmadığı farelerde embriyonik ölüm gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu da ATF6 α ve ATF6 β ' nin erken gelişimde birbirlerini telafi ettiğini ileri sürer (Yamamoto ve ark., 2007).

İnositol Gerektiren Enzim 1 (IRE1) Sinyal Yolu

IRE1, tüm ökaryotlarda mevcut olan tek ER stres sensörüdür ve bu nedenle UPR' nin mayalardan insanlara kadar evrimsel olarak korunan en eski ve en korunmuş yoludur (Mori, 2009). Tip I transmembran proteini olan IRE1, bir N-terminal domaini ve bir C-terminal sitoplazmik domaini içerir. C-terminal sitosolik alanında serin/ treonin kinaz aktivitesi ve endoribonükleaz (RNAaz) aktivitesine sahiptir. Maya1p olarak adlandırılan mayada yalnızca bir tane ER stres reseptörü var iken memelilerde IRE1 α ve IRE1 β olmak üzere iki izoformu mevcuttur. IRE1 α tüm hücrelerde bulunurken IRE1 β sadece intestinal epitel hücrelerinde bulunmaktadır (Urano ve ark., 2000). ER stresi varlığında, GRP78 IRE1' den ayrılır. IRE1 dimerize olur ve kinaz bölgesi otofosforillenir. Bu konformasyon değişikliği IRE1' in RNAaz alanının aktivasyonuna yol açar. RNAaz aktivitesi ile mRNA X-box bağlayıcı protein 1 (XBP)' den 26 nükleotid uzaklaştırılır ve oluşan kırılmış XBP1 (XBP1s) mRNA translasyona uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüşür. XBP1s hücre çekirdeğine girerek sırasıyla, protein katlanması, kalite kontrolü, protein salgısı ve ERAD ile bağlantılı UPR hedef genlerinin transkripsiyonunu indükler (Acosta ve ark., 2007) (Şekil 10).

IRE1 α ve XBP1' in yokluğu embriyonik ölümcüllüğe neden olur. Bu da gelişim için IRE1 α ve XBP1' in gerekli olduğunu düşündürür. XBP1 eksikliği olan hücreler, oksidatif strese ve inflamasyon kaynaklı hücre ölümlerine karşı daha hassastır. Ayrıca XBP1 ER biyogenezi, fetal gelişim, lipogenez, adipogenez ve diğer önemli hücresel süreçlerde rol oynamaktadır (Reimold ve ark., 2001).

2.2.8. ER Stres Kaynaklı Apoptoz Mekanizmaları

Programlı hücre ölümü (apoptoz) normal gelişim ve yaşlanma sırasında dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır. Apoptoz ayrıca immün reaksiyonlarda olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak veya hücreler hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde de ortaya çıkar (Norbury ve Hickson, 2001).

Araştırmalar iki ana apopitoz yolu olduğunu göstermektedir.

1. Ekstrinsik (dışsal) veya ölüm reseptör yolu

2. İntrensik (içsel) veya mitokondriyal yol

Apopitozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni ailesinin yeleri olan ölüm reseptörlerini içerir. TNF reseptörü ailesinin yeleri sistein bakımından zengin benzer “lm alanlarına” sahiptir. Bu lm alanları, ölüm sinyalini hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına aktarmada kritik bir rol oynar. Bugüne kadar en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında FasL/ FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L/ DR3, Apo2L/ DR4 ve Apo2L / DR5 vardır (Elmore, 2007).

Apopitozu başlatan içsel sinyal yolakları, hücre içindeki hedeflere doğrudan etki eden ve mitokondri aracılığıyla başlatılan, çeşitli reseptör aracılı olmayan uyarıcı dizilerini içerir. Dışsal uyarıcılar arasında (bunlarla sınırlı olmamakla birlikte) radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller bulunur. Bu uyanların tümü i mitokondriyal zarda değişikliklere neden olarak mitokondriyal geçirgenlik gzeneğinin açılmasına neden olur. Normalde sekestre edilmiş proapopitotik proteinlerin iki ana grubunun sitozole salınması gerçekleşir (Saelens ve ark., 2004). Bu proteinler kaspaza bağımlı mitokondriyal yolu aktive eder.

Dışsal ve içsel yolakların ikisi de uygulayıcı kaspazlarının aktivasyonu ile son bulur. Uygulayıcı kaspazlar, nükleer maddeyi parçalayan sitoplazmik endonükleazı ve nükleer ve sitoskeletal proteinleri parçalayan proteazları aktive eder. Kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 efektör veya uygulayıcı kaspazlar olarak işlev görür (Elmore., 2007).

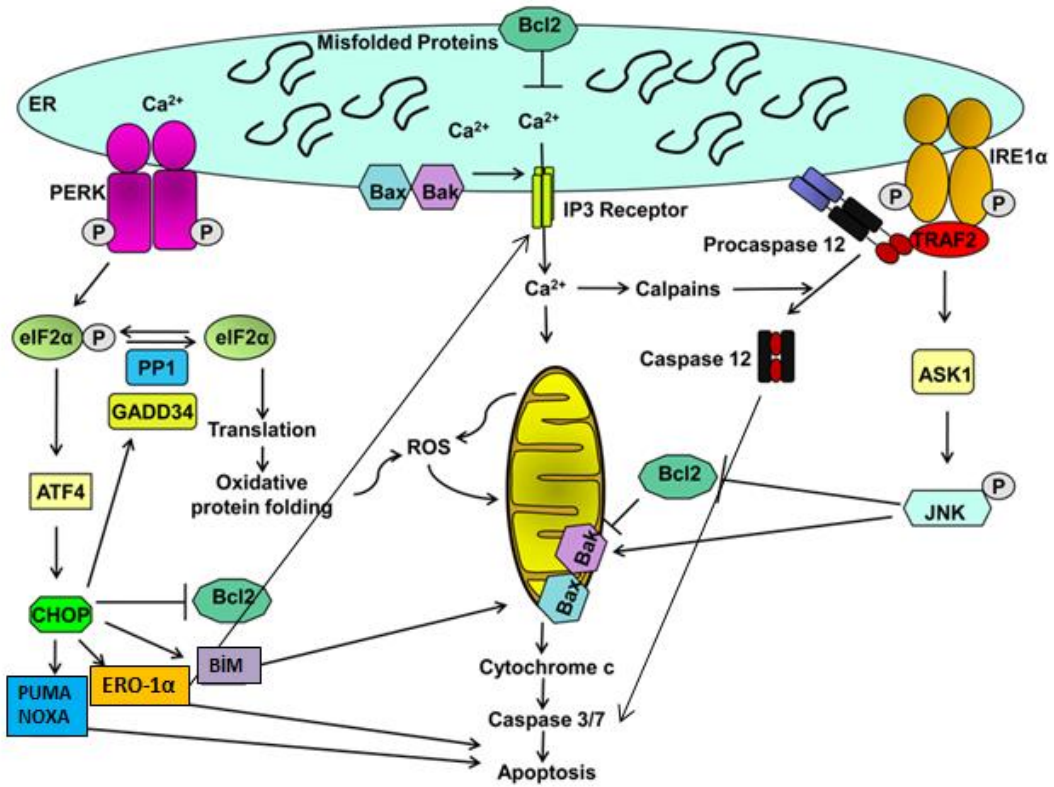
UPR sinyali, ER homeostazının restorasyonu ve normal ER fonksiyonunun sürdürülmesi için son derece önemlidir. şiddetli ve uzun süreli ER stresi koşulları altında UPR hücreyi normal işlevine döndürmekte yetersiz kalır ve otofajik programlar veya apoptoz aktivasyonu ile hücre ölümü tetiklenir (Szegezdi ve ark., 2006). ER stresi kaynaklı apopitozun dört ana yolu tanımlanmıştır (şekil 11):

1. PERK / e1f2 α ile indüklenen CHOP yolu

2. IRE1 aracılığıyla indüklenen JNK aktivasyonu

3. ER' ye lokalize sistein proteazı kaspaz 12' nin aktivasyonu

4. BAX /BAK aktivasyonu



Şekil 11. ER stres kaynaklı apoptoz yolları (Malhi ve Kaufman, 2010' dan uyarlanmıştır)

PERK Sinyali ile İndüklenen CHOP Kaynaklı Apoptoz Yolu

Daha önce bahsedildiği gibi, ER stres koşulları altında PERK aktive olur ve eIF2α' yı fosforile ederek translasyonda durmaya neden olur. Bu hızlı tepki önemli bir sağkalım yanlısı mekanizma olarak çalışır. Bu hızlı sağkalım mekanizmasına ek olarak PERK yolu, katlanmamış protein yükünü azaltan ATF4 aracılı transkripsiyon yoluyla otofaji, katlanma ve redoks metabolizması ile ilgili bir gen alt kümesini düzenler (Hetz, 2012). Uzun süreli ER stresi altında PERK sinyali hücre ölümünü tetikleyebilir. Sağkalım yanlısı ile apoptotik tepkiler arasındaki bu değişimden sorumlu olan ATF4 ile aktive edilen CHOP' un indüklenmesidir (Harding ve ark., 2000).

CHOP, insanda 169 amino asit tortusu içeren 29 kDa' luk bir proteindir. CHOP geni başlangıçta UV ışınımı ve alkile edici ajanlar gibi genotoksik stresin indüklediği genlerin aranmasında tanımlanmış ve bu nedenle GADD153 olarak adlandırılmıştır (Ghosh ve ark., 2012). CHOP hücrelerde çok düşük seviyelerde ekspresse edilir. Bununla birlikte, kuvvetli stres durumunda ekspresyonu artar. CHOP' un aşırı ekspresyonunun hücre döngüsü durmasına ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir. CHOP' un ER stres kaynaklı apoptozdaki rolü CHOP negatif farelerde gösterilmiştir. CHOP

negatif embriyonik fibroblastları ile yapılan bir çalışmada, hücrelerin ER stresi kaynaklı apoptoza kısmi direnç sağladığı ortaya konulmuştur (Zinszner ve ark., 1998). ER stresi sırasında UPR' nin üç kolu da CHOP' un transkripsiyonunu indükler. Bununla birlikte CHOP protein ekspresyonunun indüklenmesi için UPR' nin PERK-eIF2 α -ATF4 dalı esastır (Szegezdi ve ark., 2006).

CHOP' un proapoptotik rolünü açıklayan moleküler mekanizma bazı hedef genlerin transkripsiyonel düzenlenmesini içerir. Bunlardan biri GADD34' tür. GADD34 ekspresyonu, proteotoksisiteyi tetikleyebilecek protein sentezini destekleyerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır (Kojima ve ark., 2003). Aynı zamanda GADD34' ün CHOP aracılı aktivasyonu, translasyon inhibisyonunu tersine çevirerek ER bölmesinde katlanmış proteinlerin birikmesine katkıda bulunur ve proapoptotik proteinleri kodlayan mRNA' ların translasyonuna izin verir.

CHOP tarafından indüklenen en çok çalışılan hücre ölümü mekanizması, birçok BCL-2 ailesi üyesinin seviyelerinin düzenlenmesidir. ER stresi altında CHOP BCL-2 ekspresyonunu inhibe ederek hücreleri apoptoza duyarlı hale getirir (McCullough., 2001). Ek olarak, only-BH3 proteinleri olarak bilinen BCL-2 ailesinin bazı proapoptotik bileşenlerini indükler. BIM seviyeleri ER stres koşulları altında CHOP tarafından indüklenir (Puthalakath ve ark., 2007). Diğer raporlar PUMA ve NOXA' nın da CHOP ile indüklendiğini göstermektedir. Kardiyomiyosit modellerinde yapılan çalışmalar, ER stresi sırasında BAX' ın da indüklendiğini göstermektedir, CHOP eksikliği olan farelerin daha az apoptotik hücre ölümü ve BAX seviyelerinin azalması ile ilgili düşük kaspaz-3 aktivasyonuna sahip olduğunu gösterilmiştir (Fu ve ark., 2010).

CHOP' un bir başka olası etki mekanizması, ER' nin oksidatif durumunun modülasyonudur. CHOP' un aşırı ekspresyonu ERO1 α ' nın (endoplazmik retikulum disülfir oksidaz-1 α) indüksiyonu yoluyla glutatyonun tükenmesine ve ROS' un artmasına neden olur (Tavender ve Bulleid, 2010). ER' deki ROS artışı, ER stres koşullarında hücreleri apoptoza duyarlı hale getirebilir. Ek olarak CHOP' un indüklediği ERO1 α , inositol-1,4,5-trisfosfat reseptörünü (IP3R) aktive ederek ER' den kalsiyum salımına yol açar (Li ve ark., 2009). Sitoplazmik kalsiyumun artışı mitokondriyal geçiş gözeneklerinin açılmasını etkileyerek apoptoza katkıda bulunabilir.

IRE1 Sinyali ile İndüklenen JNK Apoptoz Yolu

Daha önce bahsedildiği gibi, IRE1 α / XBP1 yolu, protein katlanması ve kalite kontrolünde yer alan bir hedef gen alt kümesinin düzenlenmesi yoluyla sağkalım yanlısı bir yoldur. Bu sağkalım yanlısı fonksiyonun aksine diğer raporlar sürekli IRE1 α sinyalinin apoptoza da yol açabileceğini göstermiştir (Han ve ark., 2009) . IRE1 α , TRAF2' ye (TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2), ve ASK1' e (apoptoz sinyali düzenleyici kinaz 1) bağlanarak kompleks oluşturur ve ve ASK1' in aktivasyonuna yol açar. Aktive ASK1, JNK protein kinaz (c-Jun NH₂-terminal kinaz) ve mitokondriye bağımlı kaspaz aktivasyonuna yol açar. JNK aktivasyonunun, hücre ölümü programlarını BCL-2 ailesi proteinlerinin fosforilasyonu yoluyla etkilediği bilinmektedir (Davis, 2000). Ek olarak, bu yol sağkalım önleyici bir mekanizma olarak otofajinin indüklenmesinde de yer almaktadır (Ogata ve ark., 2006).

Kaspaz 12 Aktivasyonu

Kaspazlar, apoptoz ve enflamasyonda önemli rol oynayan endoproteaz enzimleri ailesidir. Aspartik asitten sonraki peptit bağımlı keserler. Kaspazlar başlangıçta aktif olmayan monomerik prokaspazlar olarak üretilir, apoptozun indüklenmesinden sonra aktif enzim formuna dönüşürler. Kaspazlar genel olarak başlatıcılar (kaspaz -2, -8, -9, -10), efektör veya uygulayıcılar (kaspaz -3, -6, -7) ve enflamatuar kaspazlar (kaspaz -1,-4,-5) olarak sınıflandırılmıştır (Rai ve ark., 2005). Kaspaz 12, ER membranına lokalize olmuş proapoptotik sistein proteazıdır ve ER stresi kaynaklı apoptozun önemli bir aracı olarak görev yapar.

Sitoplazmadaki Ca²⁺ konsantrasyonundaki artış, kalpini aktive eder. Daha sonra kalpain de ER yerleşik prokaspaz-12' yi parçalayarak aktive eder. Aktif kaspaz-12, kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açar ve apoptoz gerçekleşir. Kalpaine ek olarak kaspaz-7, ER stresi altında sitozolden ER membranının sitoplazmik tarafına geçmektedir ve kaspaz-12 ile etkileşime girerek aktivasyonuna yol açmaktadır (Rao ve ark., 2001).

BAX/ BAK Aktivasyonu

BCL-2 protein ailesinin üyeleri apoptotik hücre ölümünün önemli düzenleyicileridir. BCL-2 ailesi 20 üyeden oluşur, hem proapoptik hem de antiapoptotik üyeler içerir. Ailenin antiapoptotik üyeleri BCL-2, BCL-XL, BCL-W ve

MCL-1 iken; BID, BIK, BIM, PUMA NOXA, BAD, BAX, BAK proapoptik proteinlerdir. Mitokondriyal aracılı apoptozda olduğu gibi ER stresıyla indüklenen apoptoz da BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. (Oakes ve ark., 2006). ER stres aracılı apoptozun birçok mekanizmanın BCL-2 ailesinin en az bir üyesini içerdiği gösterilmiştir. En iyi karakterize edilmiş proapoptotik BCL-2 aile üyeleri, BAX ve BAK' dır. BAX ve BAK apoptoza iki yolla etki etmektedir. Birinci yol; ER stresi sırasında BAX ve BAK, ER membranında konformasyonel değişikliklere ve oligomerizasyona maruz kalır. Bu da ER' den sitoplazmaya Ca^{+2} ' nin salınmasına yol açar (Zong ve ark., 2003). Sitololde Ca^{+2} konsantrasyonunun artması kalpaini aktive eder ve kalpain de prokaspaz-12' yi keser. Aktive olan kaspaz-12' de prokaspaz-9' u keser ve böylece kaspaz kaskadı aktive olmuş olur. İkinci yol; mitokondri tarafından sitozolik Ca^{+2} ' nin alınması mitokondriyal iç membran depolarizasyonuna ve sitokrom c salınımına yol açar. Bu da kaspaz-9' un aktivasyonuna yol açar. Kaspaz kaskadı uyarılır ve apoptoz gerçekleşir (Wei ve ark., 2001).

Çeşitli hücre tiplerinde 10' dan fazla BCL-2 aile üyesi BAX/ BAK aktivatörü olarak tanımlanmıştır. BIM, PUMA, NOXA, DP5, BID bunlardan bazılarıdır. Ortak bir BH₃ protein alanını paylaştığı için “only BH₃ proteinleri” olarak adlandırılan aktivatörler, transkripsiyonel upregülasyon veya fosforilasyon gibi translasyon sonrası olaylar ile devreye sokulur. Aktivasyon üzerine, mitokondriye translokasyon yaparlar ve BAX/ BAK' ı bağlar ve aktive ederler veya BAX/ BAK baskılayıcılarını inhibe ederler. Örneğin BID' nin proteolitik bölünme ile aktivasyonu mitokondriye translokasyona, BAX/ BAK' ın aktivasyonuna ve proapoptotik sitokrom c salınımına neden olarak kaspaz kaskadının aktivasyonuna ve apoptoza neden olur (Puthalakath ve ark., 2007).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Tam Kan, Serum ve Plazma Örnekleri

Yapılan çalışmalarda araştırmaya katılan gönüllülerden alınan EDTA' lı tam kan, plazma ve serum örnekleri kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Santrifüj cihazı (Jouan C4i, Cat no: 11177560), Dondurucu (-80 °C) (NUAIRE Ultra-Low Freezer, Model no: Nu-6420E), ELISA cihazı (SUNRISE-BASIC TECAN), Sonikatör (METU electromechanical, Serial No. 30607, Germany),Vorteks (Mindaus, VM3), mikropipetler, ependorf tüpler, 15 ml lik Falcon tüpler, EDTA'lı tam kan tüpleri, jelli biyokimya tüpleri.

3.1.3. Kimyasal Maddeler

NH₄Cl (Sigma), NaHCO₃ (Merck), EDTA (Carlo Erba Reagenti), Sükroz (Sigma), Tris HCl (Sigma), MgCl₂ (Merck), Triton X-100 (Merck), NaCl (Merck), KCl (Merck), Na₂HPO₄ (Merck) KH₂PO₄ (Panreac), HCl (Merck), Albümin Standard (Sigma), CuSO₄.5H₂O (Merck), Na-K tartarat (Merck), NaOH (Sigma), Folin Reagent (Sigma), Na₂CO₃ (Merck), FİCOLL çözeltisi (Biocoll Separating Solution Density: 1.077 g/ ml).

3.2. Metot

3.2.1. Araştırmanın Planlanması Ve Kan Örneklerinin Toplanması

“Fenilketonüri Hastalığında Endoplazmik Retikulum Stresinin Araştırılması” isimli tez çalışması için öncelikle Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' ndan B.30.2.ODM.0.20.08/1654-1729, 2018/250 karar nolu etik kurul onayı alındı. Araştırma; 1) kontrol grubu, 2) hiperfenilalaninemi hasta grubu 3) BH₄ yanıtı hasta grubu ve 4) klasik fenilketonürlü hasta grubu olmak üzere 4 grup olarak tasarlandı. Araştırma öncesi Power Curve One Way ANOVA programı ile yapılan power analizinde % 95 güç ile her gruba alınması gereken hasta sayısı en az 8 olarak bulundu. Hastalara rutin kontrolleri sırasında çalışma ile ilgili bilgi verilip, gönüllü olur formu ve çocuk olur formu onayı alındı.

Araştırmaya Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Metabolizma Kliniği'ne başvuran FKÜ tanısı almış 14 kişilik klasik FKÜ'lü hasta grubu, 8 kişilik BH₄ yanıtı FKÜ'lü hasta grubu, 9 kişilik hiperfenilalaninemili hasta grubu ile 10 kişilik sağlıklı kontrol grubundan olmak üzere toplam 41 kişi dahil edildi.

Çalışmaya katılanların her birinden üç tüp EDTA' lı tam kan ve bir biyokimya tüpünde kan örneği alındı. EDTA' lı tüpün birinin plazmasından metabolizma laboratuvarında HPLC cihazı ile fenilalanin ve tirozin düzeyi ölçüldü diğer iki tüp lökosit izolasyonunda kullanıldı. Biyokimya tüpüne alınan kan örneğinden elde edilen serumda seroloji laboratuvarında CRP düzeyleri ölçüldü.

3.2.2. Kullanılacak Reaktiflerin Hazırlanması

PBS (Fosfat Buffer Salin)

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HP0₄; 0,24 g KH₂P0₄ bir beherde 800 ml distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH 7.2' ye ayarlandı. Toplam hacim balon jodede 1 litreye tamamlandı.

RBC (Red Blood Cell) Lizis Buffer

10 x RBC lizis buffer için 8,02 g NH₄Cl; 0,84 g NaHCO₃; 0,37 g EDTA (disodyum tuzu) bir miktar suda çözülerek balon jodede 100 ml' ye tamamlandı. Kullanım sırasında 1/10 oranında seyreltildi.

WBC (White Blood Cell) Lizis Buffer

0,32 M sükröz, 10 mM Tris HCL, 5 mM MgCl₂, %1 Triton X-100' den oluşan çözelti kullanıldı.

3.2.3. Lökosit İzolasyonu

1. 15 ml'lik falcon tüpüne 2 ml ficoll çözeltisi eklendi.
2. Üzerine 2 ml tam kan dikkatlice pipetlendi.
3. 20 dakika 400 g' de santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra üst kısmı dikkatlice aspire edildi, lökositlerin bulunduğu ara yüz temiz bir falcon tüpüne aktarıldı.
5. Her bir hasta için iki kere lökosit izolasyonu yapılarak örnekler birleştirildi.
6. 6 ml soğuk PBS ile hücreler yıkandı.

7. Yıkanan hücreler 250 g' de 10 dk santrifüj edildi.
8. Süpernatant atıldı ve hücre pelleti 0,5 ml PBS çözeltinde süspansiyon edildi.
9. Hücre süspansiyonunun üzerine eritrosit kontaminasyonundan kurtulmak için 0,5 ml RBC lizis buffer konuldu. Vorteksle karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 250 g' de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
10. Kalan hücre pelletinin üzerine 350 µl lökosit (WBC) lizis buffer konularak karıştırıldı ve 15 dakika ultrasonikasyona tabi tutularak lökositler lizis edildi.
11. Lökosit lizatı ependorf tüplerde çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı.

3.2.4. GRP78 Ölçümü

GRP78 ölçümü USCNK Marka Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit For Heat Shock 70 kda Protein 5 (HSPA5) kullanılarak yapıldı.

Test prensibi: Standart ve örnekler HSPA5' e özgü bir biyotin-konjuge antikorla kaplı mikropate kuyucuklarına pipetlendi. Daha sonra, Horseradish Peroxidase (HRP) ile konjuge Avidin, her bir mikropate kuyusuna eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyondan sonra TMB substrat çözeltisi eklendi ve sonrasında sadece HSPA5, biotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyucuklarda renk değişikliği gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisinin eklenmesi ile sonlandırıldı ve renk değişikliği 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerdeki HSPA5' in konsantrasyonu standart eğriden hesaplandı. Sonuçlar ng/ mg protein olarak verildi.

3.2.5. CHOP Ölçümü

CHOP ölçümü USCNK Marka Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit For DNA Damage Inducible Transcript 3 (DDIT3) kullanılarak yapıldı.

Test prensibi: Standart ve örnekler DDIT3' e özgü bir biyotin-konjuge antikorla kaplı mikropate kuyucuklarına pipetlendi. Daha sonra, Horseradish Peroxidase (HRP)' ye konjuge Avidin, her bir mikropate kuyusuna eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyondan sonra TMB substrat çözeltisi eklendi ve sonrasında sadece DDIT3, biotin-konjuge antikor ve enzim-konjuge Avidin içeren kuyucuklarda renk değişikliği gözlemlendi. Enzim-substrat reaksiyonu sülfürik asit çözeltisinin eklenmesi ile

sonlandırıldı ve renk değişikliği 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerdeki DDIT3'ün konsantrasyonu standart eğriden hesaplandı. Sonuçlar ng/ mg protein olarak verildi.

3.2.6. Protein Miktarı Tayini

Protein miktarı tayini için Lowry (1951) metodu kullanıldı. Bu yöntemde alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturarak ve Cu^{+1} e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triptofan ve sistein aminoasitlerin fenolik grupları folin reaktifini indirgeyerek mavi-mor arası bir renk oluşumuna sebep olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 550 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Reaktiflerin Hazırlanışı:

1- A Solusyonu: %2 Na_2CO_3 : 2 gram Na_2CO_3 bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon joje içerisinde 100 ml' ye tamamlandı.

2- B Solusyonu: %1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon joje içerisinde 100 ml' ye tamamlandı.

3- C Solusyonu : %2 Na-K tartarat: 2,6596 gram Na-K tartarat bir miktar distile su ile çözüldükten sonra balon jodede 100 ml' ye tamamlandı.

4- Kompleks reaktif: Solusyon A, B, C' den 100:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

5- 2N NaOH: 8 gram NaOH tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra balon joje içerisinde 100 ml' ye tamamlandı.

6- 1N Folin Reaktifi: 2N folin stoğundan 50 ml alınıp distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

7- Albumin Standartı: 4 mg/ ml %30' luk sığır serum albumin ana stoğundan 0,067 ml alınıp 50 ml' ye tamamlandı ve elde edilen 4 mg/ ml albuminden seri dilüsyon yöntemi ile standartlar hazırlandı.

Örneklerden ve standartlardan 100 µl alınarak kapaklı cam tüplere konuldu. Kör tüpüne ise 100 µl distile su konuldu. Tüm tüplere 100 µl 2N NaOH eklendi. Tüpler 100 °C' de su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra su banyosundan alınarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Tüplere 1 ml kompleks reaktif (100:1:1 oranında %2 Na_2CO_3 ; %1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; %2 Na-K tartarat) eklenerek 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüplere 100 µl folin reaktifi ilave edilip tüpler karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30

dakika bekletildikten sonra absorbanslar 550 nm' de köre karşı okundu. Sonuçlar mg/ml protein olarak belirlendi.

3.2.7. İstatiksel Analiz

Verilerin istatiksel analizi SPSS 22 paket programı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk Normal Dağılıma Uygunluk Testi ile değerlendirildi. Fenilalanin ve CHOP ölçüm verilerinin normal dağılıma uymadıkları saptandı. Bu nedenle GRP78 ve tirozin verileri için bağımsız gruplarda parametrik One Way ANOVA testi kullanılırken, Fenilalanin ve CHOP verileri için bağımsız gruplarda nonparametrik Kruskal Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Merkezi ölçütler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Fenilalanin-GRP78 ve fenilalanin-CHOP korelasyon analizi için nonparametrik Spearman' s korelasyon testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

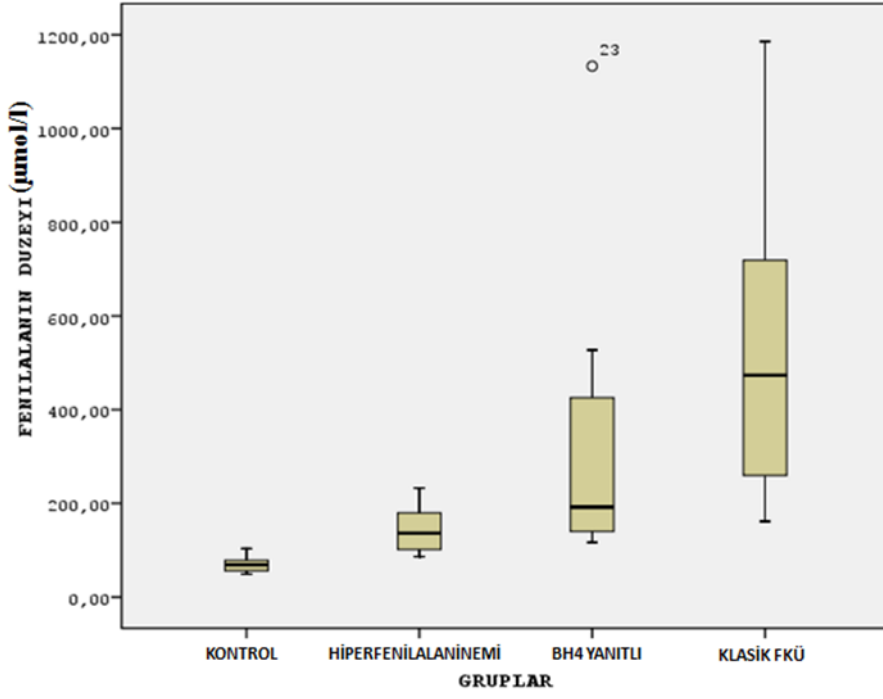
4. BULGULAR

Phe düzeyleri HPA grubuna kıyasla klasik FKÜ grubunda ($p=0.026$) ve kontrol grubuna kıyasla BH₄ yanıtı FKÜ ve klasik FKÜ gruplarında istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.006$, $p<0.001$). GRP78 ve CHOP değerleri için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p=0,065$, $p=0,203$). Korelasyon analizinde fenilalanin-GRP78 verileri arasında zayıf negatif korelasyon bulundu ($r=-0,362$, $p=0,020$). Fenilalanin-CHOP verileri arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı ($r=-0,038$, $p=0,812$). Veriler Tablo 2 ve Şekil 12, 13, 14' de ayrıntılı olarak verilmiştir.

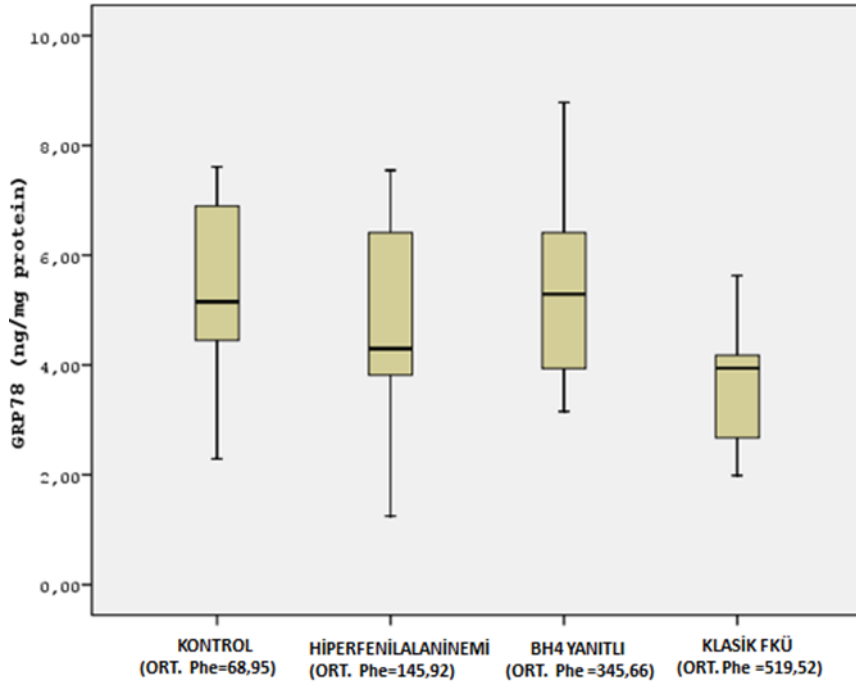
Tablo 2. Araştırma gruplarında Phe, Tyr, GRP78 ve CHOP düzeyleri

GRUPLAR	Kontrol	HPA	BH ₄ yanıtı	Klasik FKÜ
Phe ($\mu\text{mol/l}$)	68,959 \pm 16,863 ^{ab}	145,925 \pm 51,060 ^c	345,660 \pm 346,597 ^b	519,525 \pm 219,579 ^{ac}
Tyr ($\mu\text{mol/l}$)	72,150 \pm 11,527	75,297 \pm 23,614	79,956 \pm 35,684	78,897 \pm 57,442
GRP78 (ng/mg protein)	5,345 \pm 1,658	4,625 \pm 2,187	5,402 \pm 1,829	3,715 \pm 1,075
CHOP (ng/mg protein)	0,251 \pm 0,090	0,265 \pm 0,121	0,369 \pm 0,160	0,256 \pm 0,207

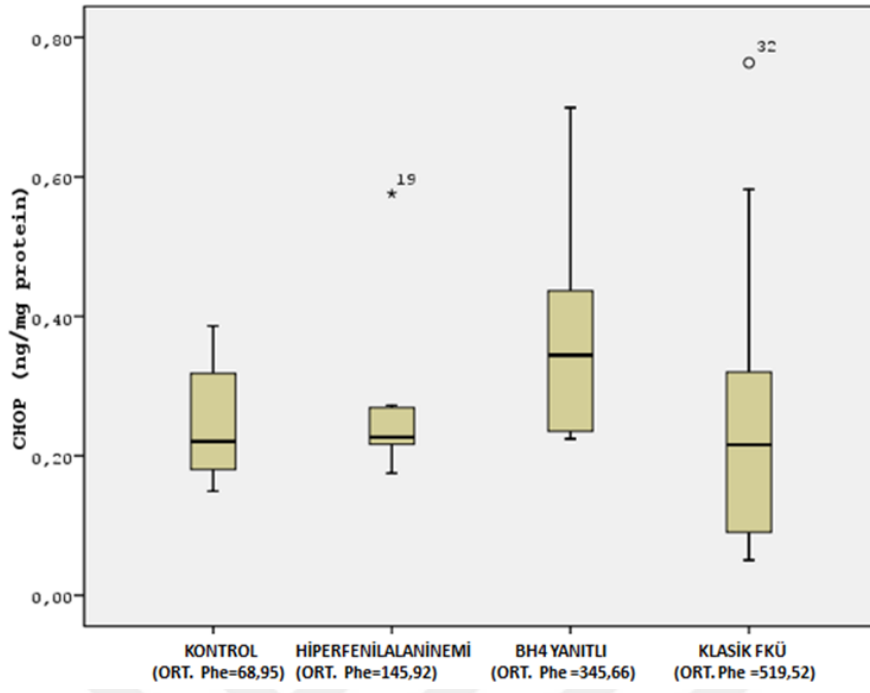
^a: Kontrol-Klasik FKÜ ($p<0.001$), ^b: Kontrol-BH₄ yanıtı ($p=0.006$), ^c: HPA-Klasik FKÜ ($p=0.026$) grupları arasında Phe düzeyleri için anlamlı fark vardır.



Şekil 12. Araştırma gruplarına göre fenilalanin düzeyleri



Şekil 13. Araştırma gruplarına göre GRP78 düzeyleri



Şekil 14. Araştırma gruplarına göre CHOP düzeyleri

5. TARTIŞMA

PAH genindeki mutasyonlar ya da kofaktör sentezi veya geri dönüşümündeki kusurlar nedeniyle meydana gelen amino asit metabolizması bozukluğu FKÜ, nöronları sitotoksik fenilalanin seviyelerine maruz bırakarak çocukluk çağında zeka geriliğine yol açmaktadır. FKÜ, nöropatolojik olarak nöronal hücre kaybı, beyaz madde anormallikleri ve azalmış sinaptik yoğunluk ile karakterizedir. Nöropatolojik etki yüksek fenilalanin konsantrasyonunun “toksisitesinden” kaynaklanıyor olabilir, buna karşın altta yatan mekanizma halen belirsizliğini korumaktadır.

Endoplazmik retikulumun verimli çalışması çoğu hücrede aktivite ve hayatta kalma için esastır. ER işlevine müdahale eden koşullar hücrede katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine yol açar. ER transmembran reseptörleri PERK, ATF6 ve IRE1 ER stresini tespit ederek normal ER fonksiyonunu geri kazanmak için katlanmamış protein cevabını (UPR) başlatır (Szegezdi ve ark., 2006). Katlanmamış proteinlerin toplanması üzerine GRP78, üç ER stres reseptöründen ayrılarak aktivasyonlarına izin verir. UPR yolları, protein sentezini durdurarak, katlama kapasitesini artırarak ve protein agregatlarının yıkımını başlatarak ER fonksiyonunu geri kazanmayı amaçlar. Stres çözülemezse ER aracılı apoptoz yolları indüklenir. Başta PERK yolu olmak üzere UPR’ nin üç yolu tarafından da aktive edilen CHOP, ER stres aracılı apoptozun önemli göstergelerinden biridir. GRP78 ve CHOP normal şartlarda hücrelerde çok düşük seviyelerde ekspresse edilir. Bununla birlikte, kuvvetli stres durumunda ekspresyonları artar. Bu genlerin ekspresyonlarının artması ile hücredeki strese cevap tespit edilebilmektedir.

Nörodejenerasyon, hasar görmüş nöron hücrelerinin bozulduğu ve sonunda öldüğü süreçleri ifade eder. Parkinson, Alzheimer ve Huntingdon hastalıkları dahil olmak üzere çoğu nörodejeneratif bozukluk yanlış katlanmış proteinlerin veya mutasyona uğramış gen ürünlerinin hücre içi veya ekstraselüler agregasyonlarının birikmesi ile karakterizedir (Muchowski ve ark., 2005). Bu hastalıklarda UPR’ nin aktivitesinin, protein agregatları veya arttırılmış oksidatif stres ve diğer toksik ürünler tarafından hafifletildiği düşünülmektedir (Soto, 2003). Fonksiyonel olmayan UPR, hücrede daha fazla protein birikimine neden olarak ER stresine ve hastalığın şiddetlenmesine neden olur. Nörodejenerasyonun gözlemlendiği fenilketonüride de benzer patofizyolojiler önemli rol oynuyor olabilir. Hastalıktaki toksik fenilalanin seviyeleri

ER' de birikerek ER' de stresine neden olabilir ve nöropatolojik etki ER stres ile indüklenen apopitozdan kaynaklanıyor olabilir.

Tüm bu bilgiler ışığında fenilketonüri hastalığında ER stresinin aydınlatılması gereken bir konu olduğunu düşündük. Bu çalışmada tedavi gören fenilketonürlü hastalardan klasik FKÜ' lü, hiperfenilalaninemili, BH₄ yanıtı hasta grupları ve sağlıklı çocuklardan oluşan kontrol grubu olmak üzere dört grup oluşturduk. Öncelikle hasta ve kontrol gruplarının plazmasında fenilalanin ve tirozin düzeylerini ve enfeksiyon ihtimalini dışlamak için CRP düzeylerini belirledik. Katılımcıların tam kanından izole ettiğimiz lökositlerde ER stres belirteçleri GRP78 ve CHOP düzeylerinin ölçümünü ELISA yöntemi ile gerçekleştirdik. Bununla birlikte hasta ve kontrol gruplarının GRP78 ve CHOP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Ayrıca ilginç bir şekilde fenilalanin ve GRP78 arasında zayıf negatif korelasyon tespit ettik.

Yaptığımız literatür taramasında fenilketonüri hastalığında ER stres ve ER stres aracılı apopitoz yolları ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak fenilalaninin indüklediği intrinsik ve ekstrinsik apopitoz yollarını inceleyen bir kaç çalışma mevcuttur.

2007 yılında yapılan bir çalışmada, serebral kortikal nöronların fenilalanine maruz kaldıklarında mitokondri aracılı apopitoz geçirdiği gösterilmiştir (Zhang ve Gu, 2007). Ayrıca Phe' nin RhoA aktivasyonunu indüklediği, RhoA/ Rho ile ilişkili kinaz sinyal yolağının fenilalanin kaynaklı nöronal apoptoziste önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.

2010 yılında yapılan bir çalışmada beyin kaynaklı büyüme faktörünün (BDNF) nöronları Phe' ye bağlı apopitozdan koruduğu gösterilmiştir. Öncelikle fenilalaninin RhoA/ Rho ile ilişkili kinaz yolu yoluyla mitokondri aracılı apoptozu aktive ettiği gösterilmiş, RhoA aktivasyonunun ve miyosin hafif zincir fosforilasyonunun BDNF ile ön muamele ile inhibe edildiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2010).

2013 yılında ekstrinsik ölüm yolu araştırılmış, Phe' nin nörotoksik seviyeleri altındaki kortikal nöronlardaki her apoptotik yolu bloke etmek için spesifik inhibitörler kullanılmıştır. Kaspaz-8 inhibitörü Z-IETD-FMK, Phe (0.9 mM, 18 saat) ile muamele edilmiş nöronlarda apoptozu kuvvetle zayıflatmıştır. Bu da Fas reseptör aracılı hücre ölümü reseptör yolunun Phe toksisitesine dahil olduğunu göstermektedir. Ek olarak Phe hücre yüzeyindeki Fas ekspresyonunu ve Fas/ FasL kompleksinin oluşumunu önemli

ölçüde arttırmıştır. Bir anti-Fas antikoru kullanarak Fas/ FasL sinyalinin bloke edilmesinin, Phe' nin neden olduğu apoptozu belirgin şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu deneyler, Fas ölüm reseptör yolağının Phe' nin indüklediği apoptoza katkıda bulunduğunu ve ölüm reseptör yolağının inhibisyonunun FKÜ hastalarında nöroproteksiyon için yeni bir hedef olabileceğini göstermektedir (Huang ve ark.,2013).

PAH enzimidaki patojenik mutasyonların çoğunun yanlış katlanma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. (Underhaug ve ark., 2012). 2012 yılında mutant PAH üzerinde yapılan çalışmalarda her ne kadar in vitro fibril oluşumu açıkça gözlenirse de, diğer protein katlanma defektlerinde zararlı olan amiloid veya diğer fibril birikimleri FKÜ için rapor edilmemiştir ve yanlış katlanmış PAH mutantlarının hücresel kalite kontrol sistemi tarafından etkin bir şekilde bozulduğu görülmüştür (Sarkissian ve ark., 2012). Bu nedenle hastalık temel olarak protein birikimlerinin ikincil sonuçları olmadan spesifik enzimatik aktivite eksikliğinin sonucu olabilir. Dolayısıyla ERAD ilişkili protein yıkımı ve otofaji süreçleri bu hastalarda kusursuz işliyor olabilir. Bu nedenle de hücrede ER stresine yol açmıyor olabilir.

FKÜ hastalarındaki nöropatolojik etkiler hastalar Phe' den kısıtlı diyet ile tedavi edilmediğinde belirgindir. Tedavi bu etkilerin iyileştirilmesine olanak sağlar. Çalışmamıza katılan hastalar erken tanı almış, diyet tedavisini sürdüren ve Phe düzeyleri rutin olarak kontrol edilen hastalardır. Bu nedenle uygulanan diyet tedavisi sebebiyle iyi tolere edilen Phe düzeylerine sahip olabilirler ve bu da hücrelerde ER strese ve ER stres aracılı apoptoza yol açmıyor olabilir.

Bunlara ilaveten biz araştırmamızı lökositlerde yaptığımız için fenilalaninin beyindeki yansımaları farklı olabilir. Bu nedenle FKÜ hastalarında ER stresinin rolünün tam olarak aydınlatılabilmesi için hastalar ilk tanı aldığı anda elde edilen lökositlerle yapılacak çalışmalar ya da fenilketonüri hastalığı oluşturulmuş deney hayvanlarının beyin dokuları ile yapılacak araştırmalar bu konunun aydınlatılması için büyük katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada fenilketonürlü hastaların kanlarından izole ettiğimiz lökositlerde GRP78 ve CHOP düzeyleri için kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını, fenilalanin ve GRP78 arasında negatif zayıf bir korelasyon olduğunu tespit ettik. FKÜ tedavisinde hücreyi toksik etkilerden korumak için kan Phe düzeylerinin 600 µmol/ l' nin altında tutulması gerekmektedir. Tez çalışmamızda, diyet tedavisi gören FKÜ hastalarda belirlenen Phe düzeyleri lökositlerde ER strese yol açmıyor olabilir. Bununla birlikte fenilketonüri hastalığında ER stresinin tam rolünün aydınlatılabilmesi için araştırmanın hastalara ilk tanı konulduğunda ve diyet tedavisine başlanmadan alınan lökositlerde veya deneysel hayvan modellerinde beyin dokusu kullanılarak yapılması ve daha ileri ölçüm tekniklerinin kullanılmasının daha fazla fayda sağlayacağı açıktır.

KAYNAKLAR

- Acosta PB, Matalon KM. Nutrition management of patients with inherited disorders of aromatic amino acid metabolism. *Nutrition Management of Patients with Inherited Metabolic Disorders*. Jones and Bartlett Publishers 2010;119-74.
- Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 2007;27:53-66.
- Alves CC, Franca AS, Oliveira LS. Evaluation of an adsorbent based on agricultural waste (corn cobs) for removal of tyrosine and phenylalanine from aqueous solutions. *Biomed Res Int*. 2013;978256. doi:10.1155/2013/978256
- Anderson PJ, Wood SJ, Francis DE, Coleman L, Anderson V, Boneh A. Are neuropsychological impairments in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels? *Dev Neuropsychol* 2007;32:645-668.
- Anjema K, Venema G, Hofstede FC, et al. The 48-hour tetrahydrobiopterin loading test in patients with phenylketonuria: evaluation of protocol and influence of baseline phenylalanine concentration. *Mol Genet Metab* 2011;104:60-63.
- Atwal RS, Xia J, Pinchev D, Taylor J, Epand RM, Truant R. Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum Mol Genet* 2007;16:2600–2615.
- Balch WE, BALCHmoto RI, Dillin A. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 2008;319:916–919.
- Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet*. 1953;265:812–813.
- Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenyl-ketonuric child. *Acta Paediatr* 1954;43: 64-77.
- Blau N, Bonafé L, Blaskovics M. Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism. in: Blau N Duran M Blaskovics M Gibson KM *Physicians' guide to the laboratory diagnosis of metabolic disease*. Springer. 2005;89-106.
- Blau N, Bélanger-Quintana A, Demirkol M. Optimizing the use of sapropterin BH(4) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2009;96:158-163.
- Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U & Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab* 2011;104:2-9.

- Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet* 2010;376:1417–1427.
- Burnett JR. Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/ Phenoptin) , an orally active synthetic form of BH4 for the treatment of phenylketonuria. *J Drugs* 2007;10: 805–813.
- Burton BK, Grange DK, Milanowski A. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inher Metab Dis* 2007;30:700-707.
- Carrara M, Prischi F, Nowak PR. Crystal structures reveal transient PERK luminal domain tetramerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *EMBO J.* 2015;34(11):1589–1600.
- Ceglarek U, Müller P, Stach B, Bührdel P, Thiery J & Kiess W. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. *Clin Chem Lab Med* 2002;40: 693-697.
- Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics.* 2000;105:89–103.
- Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours *Clin. Chem* 1998;44:2405-2409.
- Contreras J, Alonso E & Fuentes LE. HPLC for confirmatory diagnosis and biochemical monitoring of cuban patients with hyperphenylalaninemias. *MEDICC Rev* 2015;17:23-28.
- Davis R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000;103:239–252.
- Demirkol M, Gizewska M, Giovannini M. Follow up of phenylketonuria patients. *Mol Genet Metab* 2011;104:31-39.
- Ding Z, Harding CO, Thöny B. State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab* 2004;81:3-8.
- Eastman JW, Sherwin JE, Wong R, Liao CL, Currier RJ, Lorey F, Cunningham G. Use of the phenylalanine: tyrosine ratio to test newborns for phenylketonuria in a large public health screening programme *J. Med Screen* 2000;7:131-135.
- Eletto D, Dersh D, Argon Y. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21:479–485.
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 1999;286:1882-1888.

- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495–516.
- Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 1999;68(2):103-125.
- Etzel MR. Manufacture and use of dairy protein fractions. *J Nutr* 2004;134:996-1002
- Fang B, Eisensmith RC, Li XH. Gene therapy for phenylketonuria: phenotypic correction in a genetically deficient mouse model by adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *Gene Ther* 1994;1:247-254.
- Feillet F, van Spronsen FJ, MacDonald A, Trefz FK, Demirkol M, Giovannini M, BelangerQuintana A, Blau N. Challenges and pitfalls in the management of phenylketonuria. *Pediatrics* 2010;126:333-341.
- Fitzpatrick P.F. Allosteric regulation of phenylalanine hydroxylase. *Biochem* 2012;519:194–201.
- Fitzpatrick P.F. The aromatic amino acid hydroxylases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 2000;74:235–294.
- Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life*. 2013;65(4):341-349.
- Folling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Pediatr Suppl* 1994;407:4–10.
- Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 1365–1375.
- Fu H, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K. Minamino Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload *Circulation* 2010;122:361-369.
- Fu XL, Gao DS. Endoplasmic reticulum proteins quality control and the unfolded protein response: The regulative mechanism of organisms against stress injuries. *Biofactors* 2014;40:569–585.
- Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens R C. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J. Biol. Chem* 1998;273:16962–16967.
- Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*. 1992;355:33–45.

- Ghosh AP, Klocke BJ, Ballestas ME, Roth KA. CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress, PLoS ONE 2012; 7: e39586.
- Gilbert H J, and Jack G W. The effect of proteinases on phenylalanine ammonia-lyase from the yeast *Rhodotorula glutinis*. Biochem. J 1981;199:715 – 723.
- Glembotski CC. The role of the unfolded protein response in the heart. J Mol Cell Cardiol 2008;44:453–459.
- Görlach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmicreticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. Antioxid Redox Signal 2006;8(9-10):1391-1418.
- Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963;32:338–343.
- Güttler F. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. Acta Paediatr 1980;280:1-80.
- Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton JP, Xu W, Hagen A, Backes BJ, Oakes SA, Papa FR. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates Cell 2009;138: 562-575.
- Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. Nat. Cell Biol 2013;15(5):481-490.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell 2000;6:1099-1108.
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. Mol Cell 2000;5:897–904.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic reticulum-resident kinase. Nature 1999;397:271–274.
- Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. Nature 2011;475(7356):324-332.
- He Y, Sun S, Sha H. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. Gene Expr. 2010;15(1): 13–25.
- Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell Biol 2012;13: 89-102.

- Higgins CE, Gross S S. Tetrahydrobiopterin: An Essential Cofactor for Nitric Oxide Synthases and Amino Acid Hydroxylases. *Nitric Oxide (Second Edition) Biology and Pathobiology* 2010; 169-209
- Ho G, Christodoulou J. Phenylketonuria: translating research into novel therapies. *Translational Pediatr* 2014;3(2):49-62
- Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, Scheper W. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol* 2009;174:1241–1251.
- Hoskins JA and Gray J. Phenylalanine ammonia-lyase in the management of phenylketonuria: the relationship between ingested cinnamate and urinary hippurate in humans. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1982;35: 275 – 282.
- Hoskins JA, Jack G, Wade HE, Peiris RJ, Wright EC, Starr DJ, Stern J. Enzymatic control of phenylalanine intake in phenylketonuria. *Lancet* 1980;23: 392 – 394.
- Huang X, Lu Z, Lv Z, Yu T, Yang P, Shen Y, Ding Y, Fu D, Zhang X, Fu Q, Yu Y. The Fas/Fas ligand death receptor pathway contributes to phenylalanine-induced apoptosis in cortical neurons. *PLoS One.* 2013;8(8):e71553.
- Huften SE, Jennings IG, Cotton RG. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem J.* 1995;311:353–366.
- Hussain SG, Ramaiah KVA. Endoplasmic reticulum: stress, signalling and apoptosis. *Current Science* 2007;93:1684-96.
- Hyun MW, Yun YH, Kim JY, Kim SH. Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase. *Mycobiology.* 2011;39(4):257–265.
- Ishida Y, Nagata K. Hsp47 as a collagen-specific molecular chaperone. *Methods Enzymol* 2011;499:167–182.
- Jervis GA. Studies on phenylpyruvic oligophrenia: the position of the metabolic error. *J Biol Chem.* 1947;169:651–6.
- Joseph B, Dyer CA. Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem* 2003;86: 615–626.
- Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes Basel* 2013;4(3):306–333.
- Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002;110: 1389–1398.

- Kaufman S. Phenylketonuria: biochemical mechanisms. Plenum Press 1977;1–132.
- Kaufman S. The phenylalanine hydroxylating system. *Mol. Biol* 1993;67:77-264.
- Kim W, Erlandsen H, Surendran S, Stevens RC, Gamez A, Michols-Matalon K, Tying SK and Matalon R. Trends in Enzyme Therapy for Phenylketonuria *Molecular Therapy* 2004;10:220-224
- Kobe B, Jennings IG, House CM, Michell BJ, Goodwill KE, Santarsiero BD, Stevens RC, Cotton RGH, Kemp BE. Structural basis of autoregulation of phenylalanine hydroxylase. *Nature Struct Biol* 1999;6(5): 442– 448.
- Kojima E, Takeuchi A, Haneda M, Yagi A, Hasegawa T, Yamaki K, Takeda K, Akira S, Shimokata K. The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice *FASEB J* 2003;17:1573-1575.
- Konecki DS, Wang Y, Trefz FK, Lichter-Konecki U, Woo SL. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 1992;31:8363–8368.
- Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii, K, Matsubara Y & Narisawa, K. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* 1999;135:375-378.
- Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005;35:373–381.
- Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, Tabas I. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis *J. Cell Biol* 2009;186:783-792.
- Lin T, Lee JE, Kang JW, Shin HY, Lee JB, Jin DI. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Unfolded Protein Response (UPR) in Mammalian Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. *Int. J. Mol Sci.* 2019; 20: 409.
- Longo N, Harding CO, Burton BK. Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: an open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2014;384:37-44.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265-275
- Määttänen P, Gehring K, Bergeron J, Thomas DY. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2010;21:500-511.

- MacDonald A, Rocha JC, van Rijn M. Nutrition in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011;104:10-18.
- Macleod EL, Ney DM. Nutritional Management of Phenylketonuria. *Ann Nestle Eng* 2010;68:58-69.
- Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*. 2011;54(4):795–809
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state *Mol. Cell. Biol* 2001; 21:1249-1259.
- Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med* 2011;13:697-13707.
- Mitchell JJ, Wilcken B, Alexander I. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria: the New South Wales experience. *Mol Genet Metab* 2005;86:81-85.
- Modan-Moses D, Vered I, Schwartz G. Peak bone mass in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:202-208.
- Mori K. Signalling pathways in the unfolded protein response: Development from yeast to mammals. *J Biochem* 2009;146: 743–750.
- Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:11–22.
- Muntau AC, Leandro J, Staudigl M, Mayer F, Gersting SW. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *J Inherit Metab Dis*, 2014;37: 505-523.
- Nelson DL, Cox M. *Lehninger, Principles of Biochemistry*. 3rd Edition; New York, 2000;1200.
- Ney DM, Gleason ST, van Calcar SC. Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey. *J Inherit Metab Dis* 2009;32:32-39.
- Nishikawa SI, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *Journal of biochemistry* 2005; 137(5):551-555.
- Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:367–401.
- Oakes SA, Lin SS, Bassik MC. The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr Mol Med* 2006;6:99–109.

- Ogata M, S. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, M. Taniguchi, I. Tanii, K. Yoshinaga, S. Shiosaka, J.A. Hammarback, F. Urano, K. Imaizumi Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress *Mol. Cell. Biol* 2006;26:9220-9231.
- Oldendorf WH, Szabo J. Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. *Am J Physiol.*1976;230:94– 98.
- Opladen, T, Hoffmann GF & Blau N. An international survey of patients with tetrahydrobiopterin deficiencies presenting with hyperphenylalaninaemia. *J Inherit Metab Dis* 2012;35: 963-73.
- PAH Gene, phenylalanine hydroxylase. Genetics Home Reference.2008 <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PAH#location>. Erişim tarihi:16.06.2019
- Pardridge WM. Blood-brain barrier amino-acid transport: clinical implications. In: Cockburn F, Gitzelmann R, eds. *Inborn Errors of Metabolism in Humans*. Lancaster MTP Press Limited; 1982:87–99.
- Penrose L, Quastel JH. Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J.* 1937;31:266–274.
- Pey A.L, Stricher F, Serrano L, Martinez A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:1006–1024.
- Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell.* 2007;129(7):1337-1349.
- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2005;4:138–144.
- Rao PV, Moore K, and Towers G. Degradation of aromatic amino acids by fungi. II. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago hordei*. *Can. J. Biochem.* 1967;45: 1863 – 1872.
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001;276:33869–33874.
- Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH. Plasma cell differentiation requires the transcription factor xbp-1. *Nature* 2001;412:300–307.

- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(7): 519-529.
- Rossia L, Pierigè F, Carducci C, Gabuccia C, Pascucci T. Erythrocyte-mediated delivery of phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria in BTBR-Pahenu2 mice *ScienceDirect* 2014;194:37-44
- Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2002;22:10690–10698.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23:2861–2874.
- Sarkissian CN, Gámez A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol Genet Metab* 2005;86: 22-26.
- Sarkissian CN, Ying M, Scherer T, Thony B, Martinez A. The mechanism of BH(4) - responsive hyperphenylalaninemia - as it occurs in the ENU1/2 genetic mouse model. *Hum. Mutat.* 2012;33(10):1464–1473.
- Schroder, & Kaufman, RJ (The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;74:739– 789
- Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver C R, Beaudet A L, Valle D, Sly W S. *The Metabolic and Molecular bases of Inherited Disease* McGraw-Hill 2001;1667–1724.
- Scriver CR. The PAH gene phenylketonuria and a paradigm shift. *Hum. Mutat.* 2007;28:831–845.
- Selye H. The nature of stress. *Basal Facts* 1985;7: 3-11.
- Shefer S, GS Tint, D Jean-Guillaume. Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res* 2000;6:549-563.
- Singh RH, Rohr F, Frazier D. Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med.* 2014;16(2):121–131.
- Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Belló-Klein A, Giugliani R, Deon M, Vargas CR. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1740(1):68-73.

- Sitta A, Manfredini V, Biasi L, Treméa R, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat Res.* 2009;679(1-2):13-6
- Strisciuglio P, Concolino D. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites* 2014;4(4):1007–1017.
- Sun FC, Wei S, Li C, Chang W, Chao YS, Lai YK. Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem. J.* 2006;396: 31–39.
- Surtees R, N Blau Neurochemistry of phenylketonuria *Eur J Pediatr* 2000;159:109-113.
- Suzuki C K, Bonifacino JS, Lin AY, Davis MM, and Klausner RD. (. Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP. *J. Cell Biol* 1991;114:189–205.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006;7:880–885.
- Szegezdi E, Macdonald DC, Ní Chonghaile T, Gupta S, Samali A. Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296:941–953.
- Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci* 2003;4: 49–60
- Tavender TJ, Bulleid NJ. Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum *Antioxid. Redox Signal* 2010;13:1177-1187.
- Tezel B, Dilli D, Bolat H, et al. The development and organization of newborn screening programs in Turkey. *J Clin Lab Anal* 2014;28:63-9.
- Thöny B, Ding Z, Martinez A. Tetrahydrobiopterin protects phenylalanine hydroxylase activity in vivo: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia. *FEBS Lett* 2004;577: 507-511.
- Thöny B, N Blau. Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydroalase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase genes *Hum Mutat* 2006;27:870-878.
- Thöny B. Long-term correction of murine phenylketonuria by viral gene transfer: liver versus muscle. *J Inherit Metab Dis* 2010;33: 677-680.
- Underhaug J, AubiO, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase misfolding and pharmacological chaperones. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(22):2534-2545.

- Urano F, Bertolotti A, Ron D. Ire1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 2000;113:3697–3702.
- Vajro P, Strisciuglio P, Houssin D, Huault G, Laurent J, Alvarez F. Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. *N Engl J Med* 1993;329:363.
- van Calcar SC, MacLeod EL, Gleason ST, et al. Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1068-1077.
- van Spronsen FJ, Enns GM. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2010;99 Suppl 1:S90-5.
- van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ. Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J Inherit Metab Dis* 2009;32(1):46-51.
- van Spronsen, FJ. Phenylketonuria: a 21st century perspective. *Nat Rev Endocrinol*, 2010;6:509-514.
- Vassilakos A, Michalak M, Lehrman MA, Williams DB. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 1998;37:3480–3490.
- Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, Mitchell J, Smith WE, Thompson BH, Berry SA. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet Med* 2014;16:188-200.
- Waisbren SE, Chang P, Levy HL, Shifrin H, Allred E, Azen C, de la Cruz F, Hanley W, Koch R, Matalon R, Rouse B. Neonatal neurological assessment of offspring in maternal phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 1998;21(1):39-48.
- Waisbren SE, Rohr F, Anastasoae V, Brown M, Harris D, Ozonoff A, Petrides S, Wessel A, Levy HL. Maternal Phenylketonuria: Long-term Outcomes in Offspring and Postpregnancy Maternal Characteristics. *JIMD Rep* 2015;21:23-33.
- Walter P, Ron D The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011;334(6059):1081-1086.
- Wang M, Kaufman R.J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 2016;529:326–335.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292:727–730.

- Werner ER, Blau N, Thony B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem. J* 2011;438:397–414.
- Williams DB. Beyond lectins: The calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 2006;119: 615–623.
- Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Y Dev Cell* 2007; 13(3):365-376.
- Yang Y, Li Z. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol Cells.* 2005;20:173–182.
- Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. ATF6 activated by proteolysis directly binds in the presence of NF-Y (CBF) to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell* 2000;20:6755–6767.
- Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 2007;274:630–658.
- Yoshida Y, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, Ito Y, Matsuoka K, Yoshida M, Tanaka K, Tai T. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains, *Nature* 2002;418:438-442.
- Zaffanello M, Zamboni G, Maffei C, Tato L. Neonatal birth parameters of positive newborns at PKU screening as predictors of false-positive and positive results at recall-testing *J. Med. Screen* 2003;10:181-183.
- Zhang Y, Gu X, Yuan X. *Eur J Neurosci.* Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho-associated kinase pathway in cortical neurons. 2007; 25(5):1341-1348.
- Zhang Yongjun, jing Zhao, Jing Wang, Xianting Jiao Brain-Derived Neurotrophic Factor Inhibits Phenylalanine-Induced Neuronal Apoptosis by Preventing RhoA Pathway Activation *Neurochemical Research* 2010; 35(3):480–486.
- Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 2003;162:59–69.
- Zschocke J Phenylketonuria mutations in Europe *Hum Mutat* 2003;21:345-356.

EK 1: Etik Kurul Onay Formu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/1654-1729

04 .07.2018

Sayın Prof. Dr. Ramazan AMANVERMEZ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Fenilketonüri Hastalığında Endoplazmik Retikulum Stresinin Araştırılması başlıklı OMÜ KAEK 2018/250 Karar nolu Biyokimya çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 25.05.2018 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof. Dr. Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kadriye BARDAK

Doğum Yeri : Şarkışla

Doğum Tarihi : 16/09/1977

Medeni Hali : Bekar

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) : Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi/ Kimya Bölümü
(1995-1999)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi
(2000- 2003)
:Ondokuz Mayıs Üniversitesi(2006-Halen)

E-posta : kadriye.bardak@omu.edu.tr