T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TETRASİKLİN KONTROLÜ ALTINDA BAKTERİYAL HOK PROTEİNİ İLE İNDÜKLENEN MİTOFAJİNİN RFP-MİTO YARDIMI İLE TAKİBİ

Humeyra Şeyma ÜNLÜ

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Murat KASAP

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje ID:3101) Tarafından Desteklenmiştir

KOCAELİ

2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Tetrasiklin Kontrolü Altında Bakteriyal HOK Proteini ile İndüklenen Mitofajinin RFP-Mito Yardımı ile Takibi

Tez Yazarı: Humeyra Şeyma ÜNLÜ

Tez Savunma Tarihi: 19/06/2023

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KASAP

SINAV KURULU ÜYELERİ		
UNVANI	**ADI SOYADI**	**İMZA**
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN (ÜYE)		
ÜYE		
ÜYE		

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20…

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Tetrasiklin Kontrolü Altında Bakteriyal HOK Proteini ile İndüklenen Mitofajinin RFP-Mito Yardımı ile Takibi

Mitokondri, hücresel enerji homeostazını ve hücre ölümünü düzenleyen temel organeldir. Mitokondriyal ağ içerisinde hasarlanan mitokondrilerin, mitofaji adı verilen bir süreç ile temizlenmesi, hücrelerin sağlıklı olarak yaşamlarına devam edebilmeleri için büyük bir öneme sahiptir. Mitofajinin sadece mitokondriyal ağın sağlığını korumakla kalmayıp aynı zamanda bir bütün olarak hücre ve organizmanın sağlığını korumada da önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

Mitofajinin bilinmeyen moleküler ayrıntıları ve mekanizmaları hücre modelleri kullanılarak açığa çıkarılmaya çalışılmaktadır. Ancak günümüzde kullanılan mitofaji modellerinde, mitofajiyi tetiklemek için mitokondrinin yanı sıra tüm hücresel sistemi etkileyebilen kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Kullanılan bu ajanların mitofajiyi tetiklerken oluşturduğu diğer hücresel yan etkiler daha doğal bir model olmadığı için göz ardı edilmektedir. Dolayısı ile hali hazırdaki hücresel mitofaji modelleri ile yapılan çalışmaların doğal süreçlere ait mitofajiyi modellemekte yetersiz kalmaktadır.

Bu amaçla bakterilerde konak hücre ölümünü, bakteri zarında por oluşturarak sağlayan, HOK proteini bir çeşit mitofajiyi tetiklemek için kullanılacaktır. Bu çalışmada mitokondriyi boyayan RFP proteini ile birlikte HOK proteinini bir MTS sinyal dizisi aracılığı ile mitokondri iç zarına yönlendirecek ve Hek293T hücrelerinde tetrasiklin (Tet) kontrollü altında ifadesi sağlanacaktır. İfade edilen RFP-HOK proteinlerinden HOK'un mitokondri iç zarında por oluşturarak zar potansiyelini bozması ve mitofajiyi tetiklemesi, RFP proteininin ise mitokondriyi kırmızıya boyayarak mitokondride meydana gelecek morfolojik değişimi floresan mikroskobi ile gözlenebilir hale getirmesi beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: HOK, RFP, Mitofaji, Hek293T, İmmunfloresan mikroskobi

ABSTRACT

Monitoring of Mitophagy Induced by Bacterial HOK Protein Under Tetracycline Control by RFP-Mito

Mitochondria are the main organelles that regulate cellular energy homeostasis and cell death. Cleaning the damaged mitochondria in the mitochondrial network by a process called mitophagy is of great importance for the cells to continue their healthy lives. Mitophagy is thought to play an important role not only in maintaining the health of the mitochondrial network, but also in maintaining the health of the cell and organism as a whole.

Unknown molecular details and mechanisms of mitophagy are tried to be revealed using cell models. However, in mitophagy models used today, chemical agents that can affect the entire cellular system as well as mitochondria are used to trigger mitophagy. Other cellular side effects caused by these agents while triggering mitophagy are ignored because they are not a more natural model. Therefore, studies with current cellular mitophagy models are insufficient to model mitophagy of natural processes.

For this purpose, the HOK protein, which provides host cell death in bacteria by forming a pore in the bacterial membrane, will be used to trigger a kind of mitophagy. In this study, together with the RFP protein that stains the mitochondria, the HOK protein will be directed to the mitochondrial inner membrane via an MTS signal sequence, and tetracycline (Tet) will be expressed under control in Hek293T cells. Among the expressed RFP-HOK proteins, HOK is expected to disrupt the membrane potential and trigger mitophagy by forming a pore in the inner membrane of the mitochondria, while the RFP protein is expected to stain the mitochondria red and make the morphological change that will occur in the mitochondria observable by fluorescence microscopy.

Keywords: HOK, RFP, Mitophagy, Hek293T, Immunofluorescent microscopy

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca ufkumu açan, kalıplarımdan çıkmamı sağlayan, sabrıyla, sonsuz anlayış ve sevgisiyle yoluma ışık tutan, babacan tavırlarıyla düştüğümüzde kaldıran, çok sevgili yol göstericim kıymetli hocam Prof. Dr. Murat KASAP'a, şeffaf yaklaşımları ve samimiyetiyle hiçbir zaman desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a ve değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Aylin Kanlı'ya eğitim hayatıma ve kişisel gelişimime sağladıkları katkılar için sonsuz teşekkür ederim.

Kocaeli'nin bana yuva olmasını sağlayan, en zor zamanlarımda yanı başımda olan, tüm toyluklarımızla profesyonelliğe birlikte evrildiğimiz manevi kardeşlerim Fatma Zehra Özen, Elifcan Koçyiğit, Elif Akıncı ve Beliz Erdal'a sonsuz teşekkür ederim.

Tüm akademik ve hayat tecrübelerini paylaşmaktan sakınmayan, her zaman arkamda olduğunu bildiğim çok sevgili büyüğüm Dr. Mehmet Sarıhan'a, desteklerini esirgemeyen sevgili Dr. Merve Gülsen Bal Albayrak ve Dr. Candan Yılmaz Özdoğan'a değerli katkıları için teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman her kararımda yanımda duran, seçtiğim tüm yollarda benimle birlikte gelen, ilk ve daimî öğretmenim sevgili babacığım Abdülkadir ÜNLÜ'ye, sesiyle bile yüreğimdeki tüm yükü hafifleten sevgili anneciğim Hacer ÜNLÜ'ye, maddi ve manevi koşulsuz yanımda olduklarını bildiklerim sevgili ağabeyim Abdülkerim ÜNLÜ ve biricik kardeşim, ruh ikizim Betül ÜNLÜ'ye tüm kalbimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destek için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje ID:3101) teşekkür ederim.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Tetrasiklin Kontrolü Altında Bakteriyal Hok Proteini ile İndüklenen Mitofajinin RFP-Mito Yardımı ile Takibi" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

.../…/2023

Humeyra Şeyma ÜNLÜ

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜRLER ..... **iv**
ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ ..... **v**
SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **viii**
ŞEKİLLER ..... **x**
TABLOLAR ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Mitokondri **1**
1.2. Mitokondri Kaynaklı Hastalıklar **4**
1.3. Mitofaji **5**
1.3.1. Memeli Hücrelerinde Mitofaji **6**
1.4. Deneysel Mitofaji Çalışmaları **9**
1.5. Genel Mitofaji Yolakları **13**
1.6. i*n vitro* Mitofajik Ajanların Karşılaştırılması **13**
1.7. Bakteriyel HOK/SOK Sistemi **17**
1.8. Floresan Proteinler **18**
1.8.1. Yeşil Floresan Protein, GFP **18**
1.8.2. Kırmızı Floresan Protein, RFP **19**
2. AMAÇ **20**
3. YÖNTEM **21**
3.1. Eksprese Edilecek Protein Gen Dizilerinin Tasarımı **21**
3.2. RFP-Mito geninin PCR ile Çoğaltılması ve pCDNA4/TO Plazmitine Alt Klonlanması **22**
3.2.1. PCR ürününün Jelden Geri Kazanımı **24**
3.2.2. pCDNA4/TO Plazmitine Klonlama **24**
3.3. Transformasyon **27**
3.3.1. Hücrelerin Çoğaltımı ve Ligasyon ürününün doğrulanması **27**

3.4. Hücre Kültüründe Yapılan Çalışmalar 31

3.4.1. HEK293T TetR+ Hücre Hattının kültüre edilmesi 31

3.4.2. Hücrelerin Çözülmesi 31

3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması 31

3.4.4. Hücrelerin Dondurulması 31

3.4.5. Hücre Sayımı 32

3.5. Hek293T TetR+ Hücre Hattına pcDNA4/TO-RFP-Mito ve pcDNA4/TO MTS-HOK-GFP Plazmitlerinin Co-Transfeksiyonu 33

3.6. Tek koloni seçimi 34

3.7. Koloni Toplama 36

3.8. Seçilen Tek Kolonilerin Tetrasiklin ile İndüklenerek İmmün Floresan (IF) Mikroskopi ile Doğrulanması 39

BULGULAR 41

4.1. pTag-RFP-Mito Plazmitinin PCR ile Çoğaltılması 41

4.2. Transformasyon Sonrası Koloni Seçimi 41

4.3. Hücrelerin Çoğaltımı ve Ligasyon ürününün doğrulanması 42

4.4. Tek Kolonilerin Tetrasiklin ile İndüklenerek İmmün Floresan Mikroskopi ile Doğrulanması, Analiz Edilmesi 43

5. TARTIŞMA 47

6. ÖNERİLER 50

7. ÖZGEÇMİŞ 51

8. KAYNAKLAR 52

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP: Adenozin Difosfat

ANT: Adenin Nükleotit Translokatör

ATP:Adenozin Trifosfat

CCCP: Karbonil Siyanid M-Klorofenil Hidrazon

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

***Escherichia coli:* E. Coli**

ETS: Elektron Taşıma Sistemi

FBS: Fetal Bovin Serum

GABARAP: Gamma-Aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein

GFP: Green Fluorescent Protein

IF: İmmünofloresan

LB: Luria-Bertani

mDNA: Mitokondrial Deoksiribo Nükleik Asit

mL: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

mPT: Mitochondrial Permeability Transition

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

PH: Parkinson Hastalığı

RE: Restriksiyon Endonükleaz

RFP: Red Fluorescent Protein

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

TEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

UPS: Ubukitin Proteozom Sistemi

ΔΨm: Mitokondriyal Membran Potansiyeli

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. Hücre solunumun yapıldığı yer olan mitokondri şeması ve TEM görüntüsü (Reece ve ark., 2009)..... 1
Şekil 1. 2. Human Embriyonik Kidney hücresinde kırmızı floresan protein ile işaretlenmiş mitokondrilerin morfolojik görünümü. (Kasap, M. 2023. Henüz yayınlanmamış data). Hücre çekireği DAPI ile boyanarak işaretlenmiştir. Resim 100X lik objektif ile Olympus CKX41 marka inverted floresan marka mikroskop ile çekilmiştir..... 2
Şekil 1. 3. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri dört kompleksten oluşur: Kompleks I (NADH-koenzim Q redüktaz), Kompleks II (süksinat dehidrojenaz), Kompleks III (koenzim Q-sitokrom c redüktaz) ve Kompleks IV (sitokrom c oksidaz). Kompleks I, III ve IV, ATP sentazı tarafından ATP sentezi için IMM boyunca proton gradyanını oluşturur (Branca ve ark, 2020)..... 3
Şekil 1. 4. Mitokondriyal hastalık belirtilerinin değişkenliği. Mitokondriyal hastalıklar hem çocuklarda hem de yetişkinlerde ortaya çıkabilir ve beyin ve karaciğer veya pankreatik β-hücreleri ve işitme sistemi gibi birbiriyle belirgin bir işlevsel bağlantısı olmayan çoklu organlar dahil olmak üzere çeşitli organlarda ortaya çıkabilir. Bazen belirtiler kalp veya optik sinir gibi yalnızca bir dokuyu etkiler. Çocuklar bir fenotipten kurtulabilir ve daha sonra başka bir fenotip geliştirebilir- örneğin, Pearson sendromunda birincil tezahür, ekzokrin pankreas disfonksiyonu ve megaloblastik anemidir ve hayatta kalanlarda daha sonra beyin hastalığı gelişebilir. Tipik olarak, bu bozukluklar ilerleyicidir (Suomalainen ve Battersby., 2017)..... 5
Şekil 1. 5. Memeli hücrelerinde mitofajiye aracılık eden genler ve süreçler. Şekil, bu sistemlerde mitofaji için ana itici güçler olan ΔΨm'nin parçalanmasından/kaybından önce ve sonra her bir proteinin konumunu verir. Bax, apoptozun aktive edildiği ancak kaspazların inhibe edildiği hücrelerde mitofajiyi harekete geçirdiği gerçeğine dayanarak dahil edilmiştir (Aviva M. Tolkovsky, 2009)..... 6
Şekil 1. 6. PINK1'nın mitofoji'deki rolü (Sekine ve Youle, 2018) 10
Şekil 1. 7. Memeli hücrelerinde görülen PARKİN'den bağımsız alternatif mitofaji mekanizmasında rol aldığı düşünülen proteinler. (a) ULK1/2 yoluyla otofajinin aktivasyonu, TOR yolunun inhibisyonu ile indüklenir. (b) Otofagozom oluşumu, ULK1/2-ATG kompleksi ve Beclin1 ile Vps34'ü içeren PI3kinaz kompleksi tarafından düzenlenir. (c) Otofagozom zarının uzaması ve kapanması sırasında, sitosolik LC3-I, lipitlenmiş LC3-II üretmek için ATG4 tarafından bölünür. (d) LC3-II, otofagozom zarına alınır. (e) Komple otofagozom, içerik sindirimini sağlamak için lizozomla birleşir (Deas E., 2011) 11

Şekil 1. 8. (A) Parkin ekspresyonunun CCCP ile muamele edilmiş hücrelerde hücre sağ kalımı üzerindeki etkisini gösteren WST-1 analizi. (B) Parkin'nin 24 saatlik indüksiyon sonrasında SH-SY5Y ve HeLa hücrelerinde ekspresyonu. (C) CCCP ile muamele edilen hücrelerde Parkin ekspresyonunun hücre sağkalımı üzerindeki etkisi. [O] standart ortamdaki kontrol kültürü, [T] Parkin indüksiyonu için tetrasiklin ile indüklenmiş kültür, [T/C] tetrasiklin ile indüklenmiş ve CCCP eklenmiş kültür, [C] sadece CCCP eklenmiş kültür (Akpinar G., 2016). 12
Şekil 1. 9. Mitofajiyi tetikleyen sentetik kimyasal bileşikler, kesikli kırmızı kutular ile işaretlenmiş olan ajanlar projede önerdiğimiz model ile benzer olanlardır (Palikaras ve ark., 2020)..... 14
Şekil 1. 10. Mitokondrinin hücreden kaldırılmasını teşvik eden doğal kimyasal ajanlar, kesikli kırmızı kutular ile işaretlenmiş olan ajanlar projede önerdiğimiz model ile benzer olanlardır (Palikaras ve ark., 2020). 16
Şekil 1. 11. HOK/SOK sisteminin *E.coli* R1 plazmitine bağlı olarak çalışması. (https://en.wikipedia.org/wiki/Hok/sok_system) (Gerdes ve ark., 1986; Gerdes ve ark., 1986; Thisted ve ark., 1995). 17
Şekil 1. 12. HOK proteinine ait multimer formun Swiss Homoloji modellemesi yapılarak tahmin edilen muhtemel üç boyutlu yapısı (4 adet HOK proteinin oluşturduğu yapının A; üstten, B; yandan görünümü). Modelleme sırasında TM1070 proteini (PDB erişim no: 1nc7) template olarak kullanılmıştır. Şekilde gösterilen yapı HOK proteinine ait homotetramer bir yapıdır. Görüntüler PyMol kullanılarak tarafımızca elde edilmiştir. 18

Şekil 3. 1. HOK-GFP rekombinant plazmitin sanal klonlaması. 21
Şekil 3. 2. pCDNA4/TO MTS-RFP rekombinant plazmitin sanal klonlaması. 22
Şekil 3. 3. GeneRuler 1 kb DNA Ladder bantları 29
Şekil 3. 4. Hek293T TetR+ hücre hattına HEK293T TetR+_pCDNA4/TO-MTS-HOK-GFP RFP-Mito plazmitinin transfeksiyon işleminin şematik gösterimi..... 34
Şekil 3. 5. Seri dilüsyonları yapılan hücrelerin ilgili petrilere ekimlerinin yapılması 36
Şekil 3. 6. Tek koloni düşürmek için seri dilüsyon protokolü şematik gösterimi..... 37
Şekil 3. 7. Cam silindir ile koloni seçimi. 38
Şekil 3. 8. Hücrelerin petri kaplarına pasajlanması..... 39
Şekil 3. 9. İmmünfloresan boyama protokolüne ait akış şeması. 40

Şekil 4. 1. pTag-RFP-Mito plazmitinden RFP gen dizisi PCR ile çoğaltılıp Etidyum Bromür içeren agaroz jellerde doğrulaması (M-marker, 1-Negatif Kontrol, 2-Pozitif Kontrol, 3-PCR ürünü, 4-PCR ürünü,5- PCR ürünü,6- PCR ürünü)..... 41
Şekil 4. 2. pCDNA4/TO-RFP-Mito rekombinant plazmidini taşıyan E.coli XL1Blue hücrelerine aktarımı yapılmış olup büyüyen kolonilerin seçilmesi (NK: Negatif Kontrol, K1: Koloni 1, K2: Koloni 2, K3:Koloni 3). 42
Şekil 4. 3. Agaroz jel elektroforezi ile rekombinant plazmitlerden kesilerek ayrıştırılan RFP-Mito gen bölgesinin gösterilmesi (M-Marker, 1-Kesilmemiş pCDNA4/TO plazmiti, 2-Koloni 1, 3- Koloni 2, 4-Koloni 3)..... 43
Şekil 4. 4. Mitokondri defragmantasyonunun ve mitofaji benzeri dağılımın HOK ifadesi sonrası HEK293T-TetR+ hücrelerde immünfloresan mikroskopi yardımı ile gösterilmesi. DAPI: çekirdek boyaması, RFP-Mito: Mitokondri iç zarının RFP-floresan proteini ile işaretlenmesi, MTS-HOK-GFP: GFP işaretli HOK proteininin mitokondri iç zarına yerleşmesi, Süperposed: RFP-Mito proteini ile MTS-HOK-GFP proteinlerine ait resimlerin üst üste çakıştırılması ile elde edilen imaj (ko-lokalizasyon). 44
Şekil 4. 5. Mitokondri defragmantasyonunun ve mitofaji benzeri dağılımın HOK ifadesi sonrası HEK293T-TetR+ hücrelerde immünfloresan mikroskopi yardımı ile gösterilmesi. DAPI: çekirdek boyaması, MTS-HOK-GFP: GFP işaretli HOK proteininin mitokondri iç zarına yerleşmesi, Süperposed: DAPI ve MTS-HOK-GFP proteinlerine ait resimlerin üst üste çakıştırılması ile elde edilen imaj..... 46

TABLOLAR

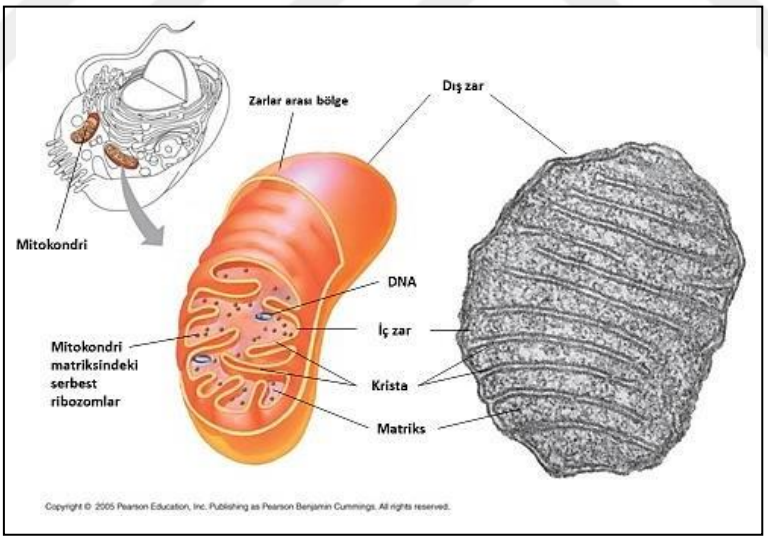
Tablo 1. Long PCR için reaksiyon ürünleri ve miktarları. 23
Tablo 2. PCR evrelerinin sıcaklık ve süreleri (Tm:62,2)..... 23
Tablo 3. 6x Yürütme boyası içeriği. 24
Tablo 4. HindIII restriksiyon enzimi ile RFP-Mito ve pCDNA4/TO plazmit kesimi için kullanılan ürün ve miktarları. 25
Tablo 5. İkinci kesim reaksiyon içerikleri. 26
Tablo 6. Ligasyon reaksiyon komponent ve miktarları. 27
Tablo 7. Seçilen 3 ligasyon kolonisinin NanoDrop spektrometre cihazında ölçülen konstrasyonları ve saflık değerlerini belirten 260/280 değerleri 28
Tablo 8. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve miktarları 29
Tablo 9. 50X TAE Stok Solusyon (pH 8,6)..... 29

1. GİRİŞ

1.1.Mitokondri

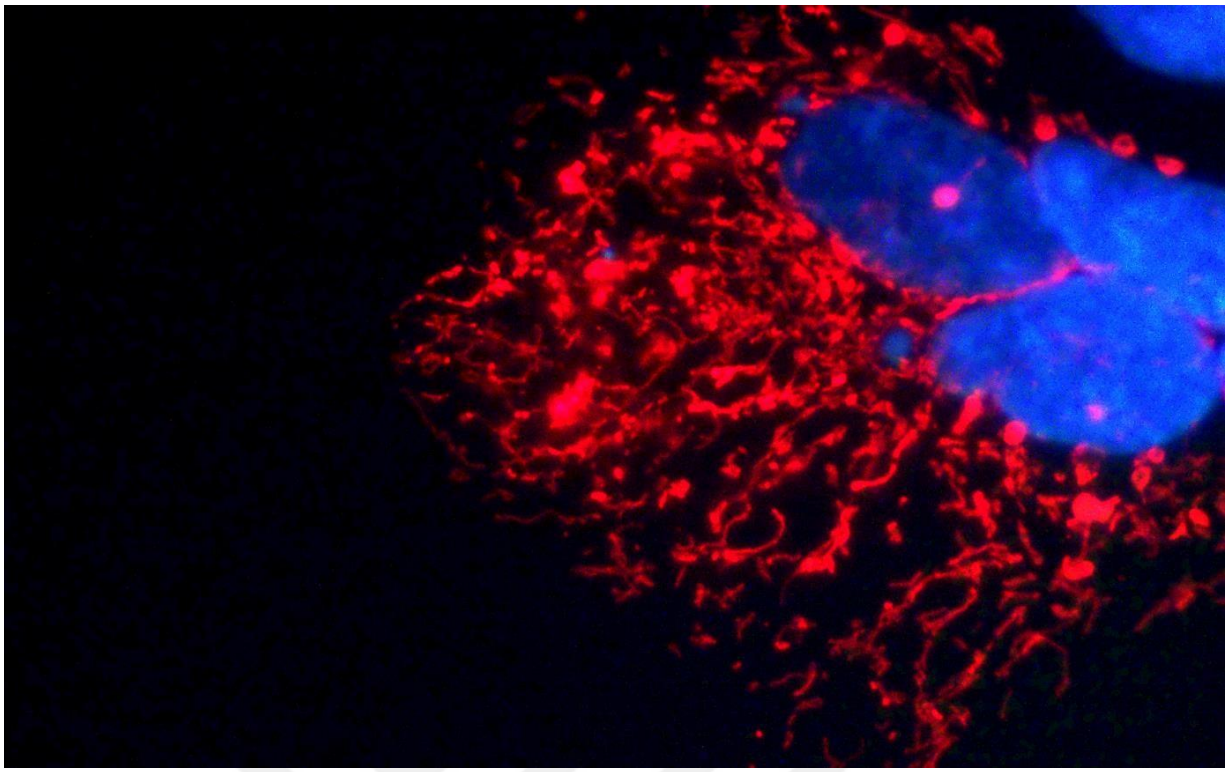
Mitokondri prokaryotik ve memeli hücrelerin alyuvarları hariç, hayvanlar ve bitkiler de dahil olmak üzere oksijenli solunum yapan tüm ökaryotik hücrelerde bulunur. Hücrelerdeki mitokondri sayısı hücrenin aktivitesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin, metabolik ihtiyacı fazla olan kas ve sinir hücrelerinde diğer hücrelere oranla mitokondri sayısı oldukça fazladır (Hamacher-Brady ve Brady, 2015).

Mitokondri, çift katlı fosfolipid zarla çevrili olup zara özgü proteinleri barındırır (Şekil 1). Dış zar düz iken iç zarda krista adı verilen kıvrımlar bulunur. İç zar, iki bölüme ayırılır. İlk bölmede, iç ve dış zarı birbirinden ayıran zarlar arsı boşluk yer alır. İkinci bölmede ise, mitokondri matriksi bulunur. Matriks mitokondriyal ve ribozomal DNA bulundurmasıyla birlikte bazı enzimleri de barındırır. Bu enzimler hücre solunum basamaklarını katalizler. İç zarda solunumda yer alan proteinler ve ATP sentezleyen diğer enzimler bulunur. Kristaların kıvrımlı bir yapıya sahip olması mitokondrinin yüzey alanını arttırarak hücre solunum verimini etkiler (Reece ve ark., 2009).



Şekil 1. 1. Hücre solunumun yapıldığı yer olan mitokondri şeması ve TEM görüntüsü (Reece ve ark., 2009).

Mitokondriler 1-10 µm uzunluğundadır ve bilinenin aksine hareketsiz silindir yapı sergilemedikleri ve bölünüp etkileşim halinde oldukları gösterilmiştir. Bu gözlemler canlı hücredeki mitokondrilerin Şekil 1.2'deki hücrede görüldüğü gibi, dallanmış tübüler bir ağ oluşturduğunu anlamaları konusunda bilim insanlarına ışık tutmuştur (Reece ve ark., 2009).

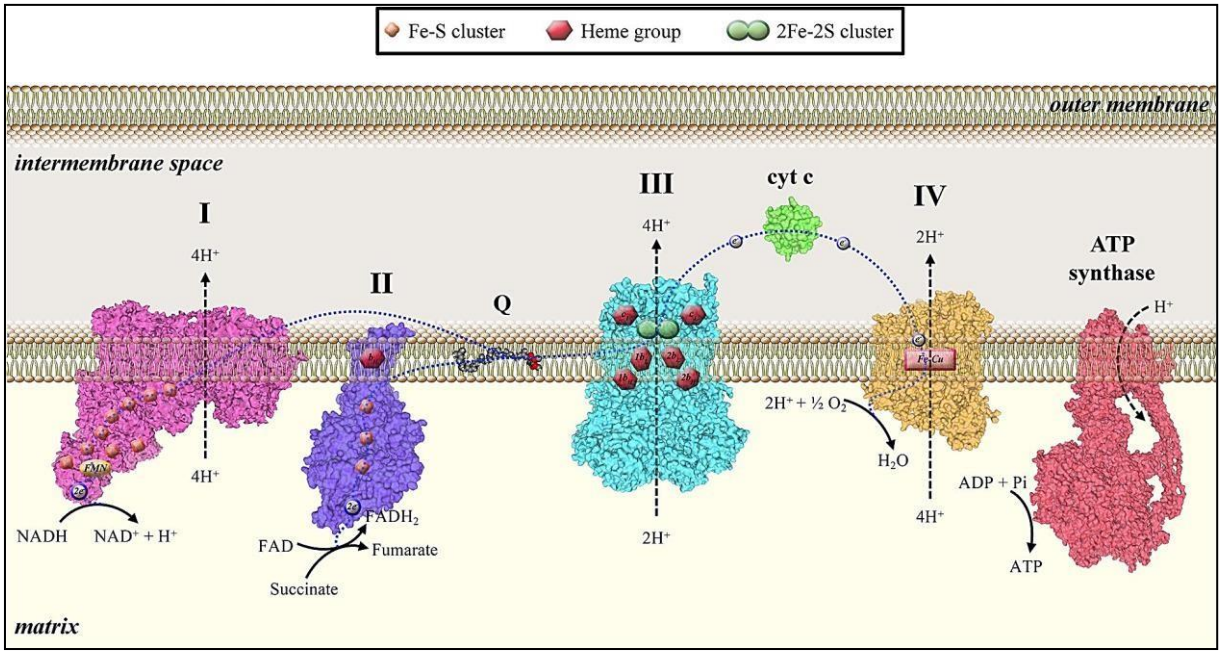


Şekil 1. 2. Human Embriyonik Kidney hücresinde kırmızı floresan protein ile işaretlenmiş mitokondrilerin morfolojik görünümü. (Kasap, M. 2023. Henüz yayınlanmamış data). Hücre çekireği DAPI ile boyanarak işaretlenmiştir. Resim 100X lik objektif ile Olympus CKX41 marka inverted floresan marka mikroskop ile çekilmiştir.

Mitokondri, çift zarla çevrili hücrenin bir alt bölmesidir ve hücresel homeostazda yakından ilişkilidir. Diğer işlevlerin yanı sıra, hücre içi sinyalleşme ve apoptoz, ara metabolizma ve amino asitlerin, lipitlerin, kolesterolün, steroidlerin ve nükleotitlerin metabolizmasında rol oynarlar. Mitokondrinin en önemli işlevlerinden biri olan hücresel enerji metabolizmasında temel bir role sahip olması ile birlikte yağ asidi β oksidasyonu, üre döngüsü ve ATP üretimi için son ortak yol olan solunum zinciridir (Koç ve Sarıca, 2003).

Mitokondriyal solunum zinciri, mitokondriyal iç zar üzerinde yer alan dört enzim kompleksinden oluşan bir gruptur (Şekil 1.3). Her kompleks, en büyüğü 40'tan fazla polipeptit bileşenli kompleks I olan birden fazla alt birimden oluşur. Karbonhidratların, proteinlerin ve yağların ara metabolizmasından üretilen indirgenmiş kofaktörler (NADH ve FADH2), elektronları kompleks I ve kompleks II'ye iletir. Bu elektronlar, kompleksler arasında, kompleksler III ve IV ve iki mobil elektron taşıyıcı, ubikinon (ubikinol, koenzim Q10) ve sitokrom c tarafından taşınan bir elektrokimyasal gradyan boyunca akar. Kompleks I-IV'ün elektron transfer işlevi, proteaz grupları barındıran alt birimler aracılığıyla gerçekleştirilir.

Serbest kalan enerji, mitokondriyal matristen zarlar arası boşluğa protonları (H+) pompalamak için I, III ve IV kompleksleri tarafından kullanılır. Mitokondriyal zar potansiyelinin (iç zar boyunca Na+, K+ ve Ca2+ gibi iyonların asimetrik dağılımı, gradyanın "kimyasal" kısmını oluşturur) büyük bölümünü oluşturan bu proton gradyanı, adenozin difosfat (ADP) ve inorganik fosfattan adenozin trifosfat (ATP) sentezlemek için kompleks V tarafından kullanılır. Genel sürece oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) denir. ATP, hücre içindeki esas olarak tüm aktif metabolik süreçler için kullanılan yüksek enerji kaynağıdır ve sitozolik ADP karşılığında mitokondriden salınması gerekir. Bu, çeşitli dokuya özgü izoformlara sahip olan adenin nükleotit translokatörü (ANT) tarafından gerçekleştirilir (Koç ve Sarıca, 2003).



Şekil 1. 3. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri dört kompleksten oluşur: Kompleks I (NADH-koenzim Q redüktaz), Kompleks II (süksinat dehidrojenaz), Kompleks III (koenzim Q-sitokrom c redüktaz) ve Kompleks IV (sitokrom c oksidaz). Kompleks I, III ve IV, ATP sentazı tarafından ATP sentezi için IMM boyunca proton gradyanını oluşturur (Branca ve ark, 2020).

Dolayısıyla solunum zinciri, hücrenin enerji gereksinimlerine cevap vermesi gereken ayrıntılı bir sistemdir. Bu gereksinimler sabit olabilse de (örneğin hepatositlerde), aynı zamanda kısa süreler içinde (iskelet kasında olduğu gibi) önemli ölçüde değişebilir.

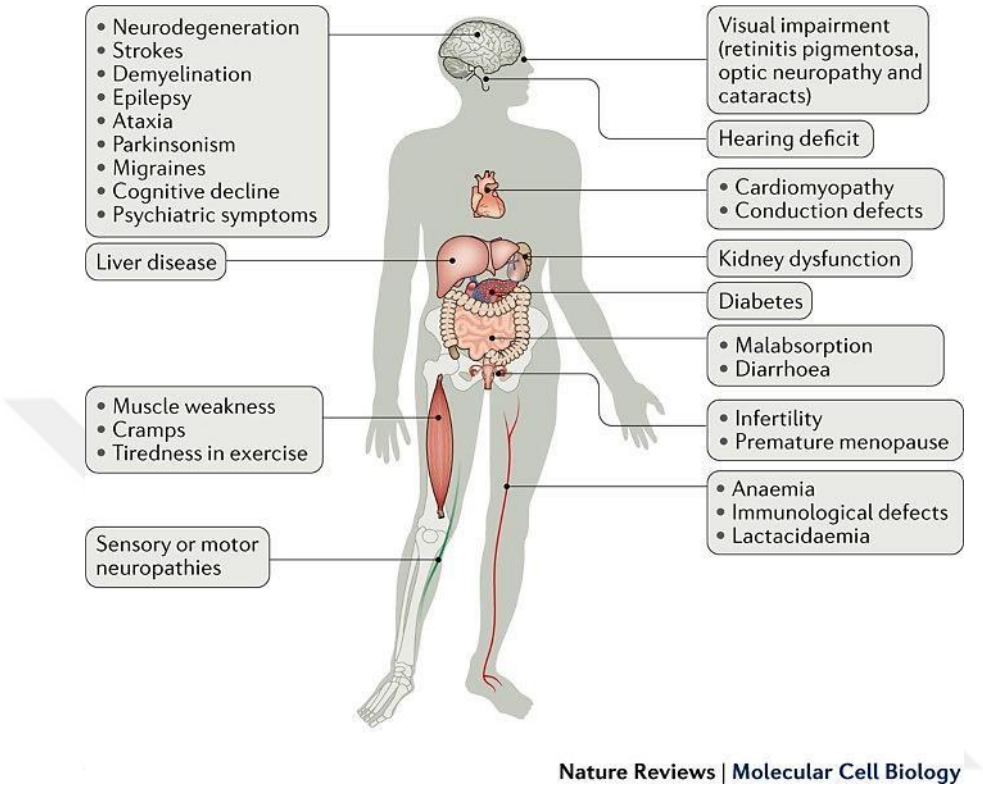
Mitokondri, hücresel biyoenerjinin temel kaynağı olduğu kadar, hücre içerisinde metabolik yolakların keşişim noktasında bulunan ve aynı zamanda hücre ölümünün (apoptozis) de düzenleyicilerinden biri olan özerk organeldir.

1.2. Mitokondri Kaynaklı Hastalıklar

Mitokondriyal hastalıklar, oksidatif fosforilasyonda meydana gelen hataların sebep olduğu ve mitokondriyal proteinlerde oluşan mutasyonlardan kaynaklı genetik temelli hastalıklardır. Mitokondriyal hastalıklar (Şekil 1.4), kalıtsal metabolik bozuklukların en bilinen türüdür ve kalıtsal nörolojik bozuklukların en yaygın biçimleri arasındadır.

Normal hücrelerde dahi mitokondriyal DNA'daki (mtDNA) mutasyonların, mitokondriden salınan reaktif oksijen türlerinin (ROS) mitokondrinin zamanla gelişen fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu fonksiyon bozuklukları mitokondriyi, Parkinson hastalığı (PH) gibi nörodejeneratif hastalıklarla olduğu kadar diğer pek çok farklı hastalıkla ilişkili en büyük risk kaynağı konumuna getirmektedir. Bu fonksiyonu bozularak hücre ve organizma için risk oluşturmaya başlayan mitokondriyi uzaklaştırmaya yönelik en radikal çözümlerden birisi mitokondrinin özelleşmiş bir otofaji olan mitofaji ile hücreden kaldırılmasıdır. Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ve mitofaji nörodejeneratif hastalıklardan, nöromüsküler hastalıklara, kardiyolojik bozukluklardan görme bozukluklarına pek çok hastalıkta merkezi bir yer tutmaktadır. Bir örnek olarak PH'da mitokondriyal hasarlanma incelendiğinde; mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun PH'nın erken evresinde ortaya çıktığı ve ayrıca Lewy cisimciklerinin enerji krizi ile desteklenerek bu duruma bağlı olarak yavaş yavaş geliştiği bilinmektedir. Hücreler PH örneğinde gözlenen bu bozuklukları ortadan kaldırmaya yönelik olarak farklı hücresel mekanizmaları devreye sokmaya çalışırlar. Bunlardan bir tanesi, yanlış katlanan proteinlere karşı olarak devreye soktuğu ubikuitin-proteasome sistemi (UPS) ve otofaji-lizozomal yoludur. UPS her ne kadar işlevsel bir mekanizma olsada, bazı durumlarda Lewy Body'lerin oluşumunu tetikleyen protein komplekslerinin ortadan kaldırılmasında yetersiz kalmakta ve hücreye hasar verebilen protein çökünütleri ubikuitin-proteazom sistemi tarafından parçalanamamaktadır (Verhoef LG., 2002; Xiong N., 2011). Bu durumlarda devreye otofaji-lizozomal yol girmektedir. Yaygın olarak otofaji diye adlandırılan makro-otofaji, uzun ömürlü sitozolik proteinlerin ve organellerin hücreden kaldırılmasından sorumludur (Xiong N., 2011). Benzer şekilde fonksiyonel bozukluğu olan mitokondrilerde özelleşmiş bir otofaji olan mitofaji ile hücreden kaldırılmaya çalışılır. Genel olarak bakıldığında, PH'nın, hem genetik hem de

toksin ile oluşturulan modelleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen deneysel kanıtlar, mitokondriyal disfonksiyonun PH'nın gelişiminde erken evrede ortaya çıktığını ve PH patogenezinde bir sonuç değil bir neden olduğunu göstermektedir (Lin MT., 2006; Martinez TN.,2012).



Şekil 1. 4. Mitokondriyal hastalık belirtilerinin değişkenliği. Mitokondriyal hastalıklar hem çocuklarda hem de yetişkinlerde ortaya çıkabilir ve beyin ve karaciğer veya pankreatik β-hücreleri ve işitme sistemi gibi birbiriyle belirgin bir işlevsel bağlantısı olmayan çoklu organlar dahil olmak üzere çeşitli organlarda ortaya çıkabilir. Bazen belirtiler kalp veya optik sinir gibi yalnızca bir dokuyu etkiler. Çocuklar bir fenotipten kurtulabilir ve daha sonra başka bir fenotip geliştirebilir- örneğin, Pearson sendromunda birincil tezahür, ekzokrin pankreas disfonksiyonu ve megaloblastik anemidir ve hayatta kalanlarda daha sonra beyin hastalığı gelişebilir. Tipik olarak, bu bozukluklar ilerleyicidir (Suomalainen ve Battersby., 2017).

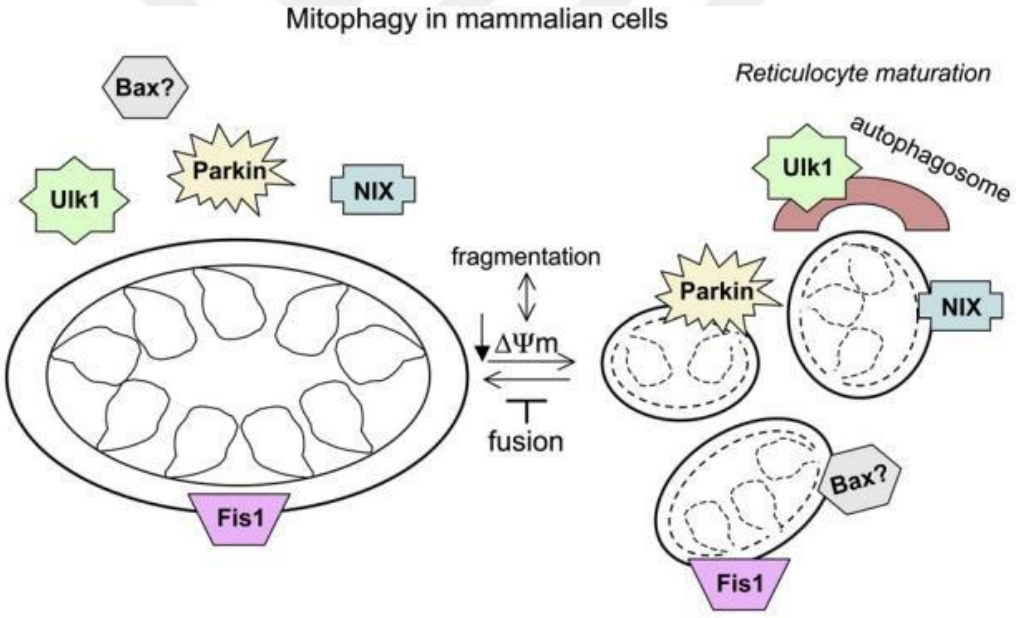
1.3. Mitofaji

Mitofaji terimi, mitokondrinin otofaji ile seçici olarak çıkarılmasını ifade eder (Lemasters, 2005). Bu terimin kullanımı, mitokondriyal geçirgenlik geçişinin (mPT: mitochondrial permeability transition) aktivasyonu ve mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\Psi m$) kaybından sonra hepatositlerde mitokondrinin kaderi hakkında yıllarca süren ayrıntılı

çalışmaları takip etti. Vücudun nitrojen açlığı algılayıcısı olan karaciğer, otofaji ile bağlantı kurmuştur (Lemasters ve ark., 1998). Karaciğerdeki otofagozomlarda mitokondri varlığı, klasik olarak mitokondri otofajisinin ilk kez gösterildiği yerdir (Ashford ve Porter, 1962).

1.3.1. Memeli Hücrelerinde Mitofaji

Memeli hücrelerinde ΔΨm kaybı, mitofajinin ortak bir özelliği gibi görünmektedir (Şekil 1.5). Lemasters ve meslektaşları, açlık sırasında GFP-LC3-pozitif otofagozomlar tarafından mPT, ΔΨm ve mitokondriyal yutulmayı görüntülemek için boyalar ve konfokal teknikler kullanmışlardır (Kim ve ark., 2007; Rodriguez-Enriquez, 2006). Hepatositler aç bırakıldığında ve otofajiyi aktive ederek glukagon ile tedavi edildiğinde, mitokondri yutulmadan önce siklosporinle inhibe edilebilir mPT'ye (Elmore ve ark., 2001) maruz kalmıştır. Bu da hasarlı mitokondrilerin otofagozomal uzaklaştırma için hedefler olduğunu düşündürmüştür.



Şekil 1. 5. Memeli hücrelerinde mitofajiye aracılık eden genler ve süreçler. Şekil, bu sistemlerde mitofaji için ana itici güçler olan ΔΨm'nin parçalanmasından/kaybından önce ve sonra her bir proteinin konumunu verir. Bax, apoptozun aktive edildiği ancak kaspazların inhibe edildiği hücrelerde mitofajiyi harekete geçirdiği gerçeğine dayanarak dahil edilmiştir (Aviva M. Tolkovsky, 2009).

Twig ve ark. (Twig ve ark., 2008), birkaç bireysel mitokondriyi fisyon ve füzyon turları yoluyla izleyerek mitofajide füzyon ve fisyonun rolünü test ettmişlerdir. Bir tur füzyon ve ardından fisyon geçiren mitokondrinin iki alt popülasyona ayrıldığını bulmuşlardır: yeniden kaynaşanlar ve asla yeniden kaynaşmayanlar. Yeniden kaynaşan mitokondri, füzyondan önce ΔΨm'yi geri kazanmış, ancak kaynaşmayanlar ΔΨm'yi azalmış ve bazıları GFP-LC3-pozitif otofagozomlarla lokalize olmuştur. Bu olayların floresan boyalar aracılığıyla ayrı ayrı izlenmesi sonucunda mitokondrinin otofagozomlara hapsedildiği ve lizozomal inhibitörler olan PepstatinA ve E64D'ye kısa bir maruz kalındığında, depolarize mitokondrinin LC3-pozitif yapılara tercihli olarak yerleştiği görülmüştür. Depolarizasyon, otofajiden çok önce meydana geldiğinden ve sürdürüldüğünden, araştırmacılar OPA1'e odaklanarak yeniden füzyonu önleyen geri döndürülemez bir olay aramışlardır. OPA1 aşırı eksprese edildiğinde, otofagozomlarda azaltılmış bir mitokondri fraksiyonu bulunmuş, bu da sinyal olarak OPA1'in kaybına işaret etmekedir. Aynı şekilde, Fis1 veya Drp1'in devrilmesi otofajiyi azaltmıştır. Bu bulgulardan yola çıkılarak mitofajinin, makrootofaji yoluyla gerçekleştiği görülmüştür. Gerçekleşen mitofaji hangi mitokondrinin yutulduğu açısından açıkça seçici olmasına karşın otofagozomların, çevreleyen sitoplazma olmadan yalnızca mitokondri içerip içermediği anlaşılamamıştır. Fisyon olmadığında, kusurlu mitokondri birikir ve glikoza yanıt olarak insülin sekresyonu azalır. Aynı değişikliklerin otofaji yokluğunda (fisyon yerine) meydana gelip gelmediği henüz bilinmemektedir. İlginç bir şekilde, otofaji eksikliği olan Atg5−/− MEF'in Atg5+/+ MEF'den daha az mitokondriyal solunuma sahip olduğu belirtilmiştir, ancak bunun otofaji eksikliği olan hücrelerin genel bir özelliği olup olmadığı açık değildir (Aviva M. Tolkovsky, 2009).

Mitokondriyal hasar ve mitofaji arasındaki bir başka bağlantı, Youle'nin laboratuvarında Parkin proteininin de yer aldığı bir çalışmadan gelmektedir (Narendra ve ark., 2008). Parkin, Park2 geni tarafından kodlanan bir ubikuitin ligazdır ve üzerindeki mutasyonlar Parkinson hastalığının ailesel bir juvenil formu (erken başlayan formu) ile ilişkilendirilmiştir (Kitada ve ark., 1998). Parkin ve Pink1 arasında bir bağlantı kaydedilmiştir. Pink1 mitokondride yerleşik olan ve Parkinson hastalığıyla ilişkili olan bir protein kinazdır (Hatano ve ark., 2004; Rohe ve ark., 2004) ve mitokondriyal fisyon/füzyonda rol almaktadır (Deng ve ark., 2008; Park ve ark., 2006; Poole ve ark., 2008; Yang ve ark., 2008). Narendra ve ark. (Narendra ve ark., 2008), ayrıştırıcılar (CCCP) ile ΔΨm'yi düşürdüklerinde mitokondrinin parçalandığını ve Parkin'in sitoplazmadan mitokondriye yeniden yerleştiğini gördüler. 48 saat içinde mitokondriyal belirteçler Tom20, sitokrom c ve Pink1'i bağlayan TRAP1 kaybolmuştur. Elektron mikroskopi

ile, sitoplazmada çok sayıda lizozom belirdiği görülürken mitokondrilerin ortadan kaybolduğu belirlenmiştir. Mitokondriyal eliminasyonun özgüllüğü o ortamdaki hiç dokunulmadan kalan peroksizomların varlığı ile anlaşılmıştır. Mitokondrinin otofajik olarak uzaklaştırıldığına dair kanıt, mitokondrinin GFP-LC3- pozitif yapılar içinde ortaya çıkması ve saptanabilir mitokondri içermeyen hücrelerin yüzdesinin 24 saat sonra ağırlıkça yaklaşık %30'dan lizozomal inhibitör bafilomisin A1 veya Atg5−/− MEF ile tedavi edilen hücrelerinde ağırlıkça yaklaşık %3'e düşmesidir. İlginç bir şekilde, apoptotik olmayan canlı hücrelerin yüzdesi, glikoz içeren bir ortamda azalmamış, ancak galaktoz içeren ortamında, mitokondri içermeyen hücreler 3 gün içinde ölmüştür. Parkin alımına başka hangi tür uyaranların yol açtığını ve Drp1 ve kalsinörinin parçalanma sürecine dahil olup olmadığını görmek de ilgi çekicidir (Gomez ve ark., 2008).

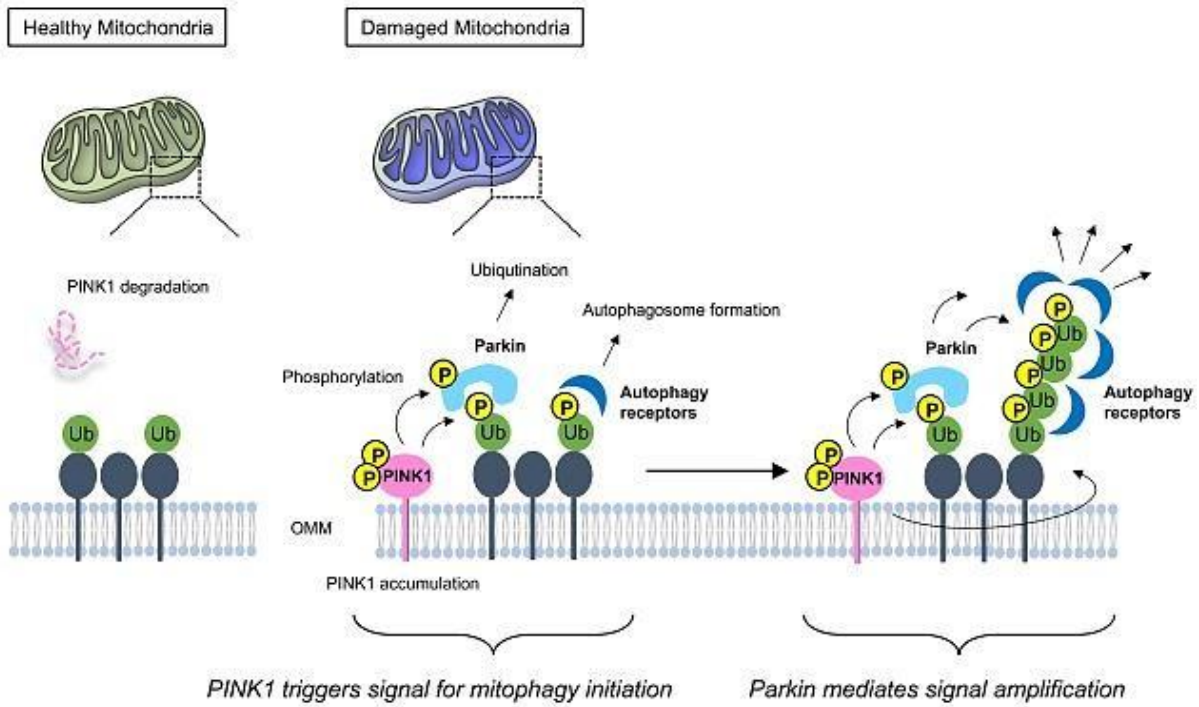
Veriler, mitokondriyal fisyonun mitofaji için gerekli olduğunu öne sürse de, Gomez ve arkadaşları (Gomez ve ark., 2008), fizyona neden olma kabiliyetinde mutasyona uğramış bir Fis1 (Fisα1) formunun aşırı ekspresyonunun, mitokondriyal otofajiyi teşvik etmede en azından ağırlıkça Fis1 kadar etkili olduğunu bulmuşlardır. ΔΨm kaybının, iki Fis1 formunun mitofajiyi indüklemesini sağlayan ortak özellik olduğu sonucuna varırlar. Ayrıca, memeli sistemlerinde yapılan çalışmaların çoğunun ortak bir özelliği olan, tüm hasarlı mitokondrilerin tam otofaji eksikliğine dikkat çektiler. Bununla birlikte, tüm mitokondri kohortunun zaman içinde kaybolduğu durumlar vardır. Mitokondrilerin, apoptoza girmeye teşvik edilen ancak kaspaz inhibitörleri kullanılarak ölmeleri önlenen nöronlardan kaybolduklarında parçalandığını ve ΔΨm kaybettikleri anlaşıldı (Fletcher ve ark., 2000; Xue ve ark.,2001). Mitokondriyal DNA da dahil olmak üzere çok sayıda mitokondrinin çıkarılması, otofaji aracılı bir olaya işaret eden (lümen alkalileşmesine neden olarak lizozomal proteolitik aktiviteyi önleyen) Bafilomisin A1 ile kısmen önlendi.

Son olarak, genlere ek, memeli hücrelerinde kinazlar tarafından sinyal verilmesinin de mitofajiye aracılık ettiği bildirilmiştir (Matsui ve ark., 2005). 1-Metil-4-Fenilpiridinyum (MPP+), in vivo Parkinson hastalığı semptomlarına neden olan 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin'in (MPTP) toksisitesine aracılık eden bir mitokondriyal toksindir. Zhu ve ark. kültürdeki nöroblastoma hücrelerine MPP+ ekledi, bu çok sayıda otofajik vakuol oluşturdu (Zhu ve ark., 2007-2012). Bu aktiviteye iki mitokondri proteininin (piruvat dehidrojenaz E2 ve bir p110 proteini) kaybı eşlik etti, bunların kaybı MEK/ERK sinyal yolunun inhibitörleri tarafından bloke edildi ve ERK2 mitokondride lokalize oldu. İnhibitörler ayrıca LC3II üretimini, vakuol sayısını bloke etti ve immünokimya ile tespit edilen mitokondriyal kaybın yaklaşık %50'sini tersine çevirdi. ΔΨm'deki azalmalar ve ultrastrüktürel hasar önlenmedi, bu

da ERK sinyalinin otofajiyi uyarmada mitokondriyal hasarın aşağısında hareket ettiği kanısına varılmasına sebep oluyor. Otofaji, nöronlarda mitokondrinin oksidatif hasarını otofaji ve hücre ölümü ile ilişkilendiren diğer çalışmalara uygun olarak, birincil dopaminerjik nöronlarda da aktive edildi (Barsoum ve ark., 2006). Koenzim Q eksikliğine yanıt olarak insan hücrelerinde başka bir mitofaji tetikleyicisi rapor edildi (Rodriguez-Hernandez ve ark., 2009). Mitofajiye aracılık eden bir kinazın tanımlanması, mitofajik yoldaki aşağı akış hedeflerinin aydınlatılmasına yol açabilir.

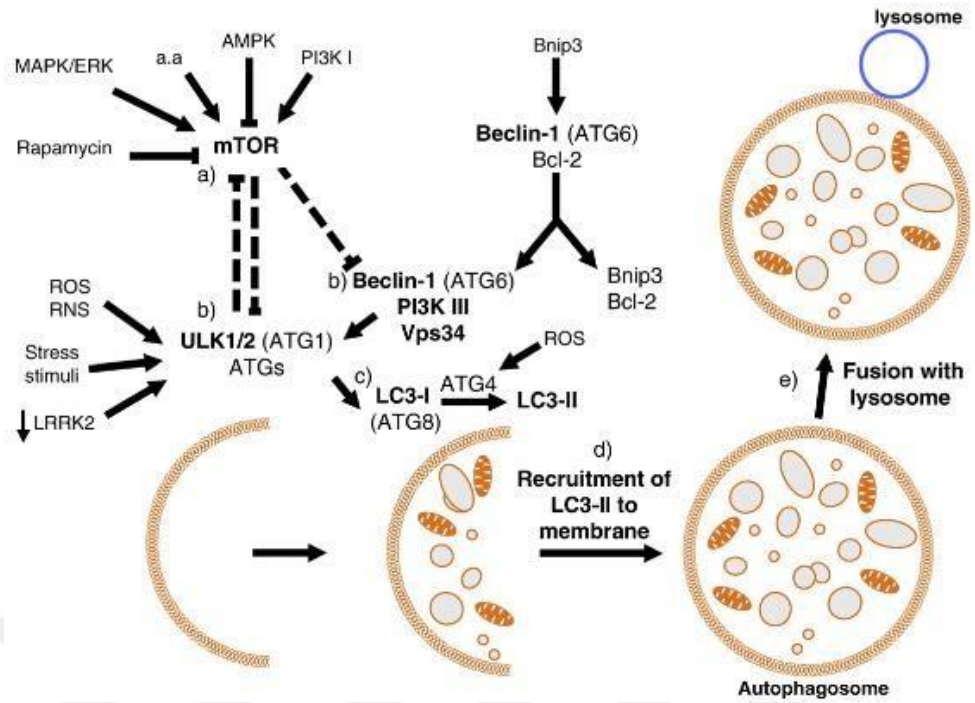
1.4. Deneysel Mitofaji Çalışmaları

Sağlıklı memeli hücrelerinde doğal mitofaji oldukça nadir gözlenen bir olaydır. Dolayısıyla mitofaji mekanizmaları araştırılırken mitofajinin dışarıdan tetiklenmesi hücresel stres oluşturan bir ajan kullanılarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Elektron transfer sistemi (ETS) kompleks inhibitörleri, iyonoforlar, hücresel demir eksikliği veya sinyal yolağı inhibitörleri/aktivitörleri kullanılarak mitofaji tetiklenebilmektedir. Hücresel modeller literatürde çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadır (Allen FG., 2013). *in vitro* çalışmalarda PH ilişkili mitokondriyal disfonksiyon irdelendiğinde, PARKIN ve PINK1 proteinlerinin ön plana çıktığı görülmektedir (Narendra D., 2008). PINK1 proteininin mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda nasıl davrandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Whitworth ve Pallanck,2017; Mouton-Liger F.,2017). Sağlıklı bir hücrede, sentezlenen PINK1'in N-ucu mitokondriyal iç zarda kesilerek proteozomal parçalanmaya gönderilir. Hücrede mitokondriyal hasar olduğunda ise PINK1'nın kesilmesi durdurulur ve PINK1 mitokondriyal zar üzerinde birikmeye başlar. PINK1 bir kinaz olduğu için burada dimer oluşturarak aktifleşir ve substratlarını fosforile etmeye başlar. Fosforile olan proteinler arasında Parkin ve Parkin'in substratı olan ubikutinde bulunmaktadır. Fosforilasyon ile aktif hale getirilmiş PARKIN hasarlı mitokondriye, çok sayıda fosforile olmuş ubikutin ekler (Şekil 1.6). Bu şekilde işaretlenen hasarlı mitokondri otofogazom aracılığı ile hücreden kaldırılır (Pickrell ve Youle, 2015). Eğer hasarlı mitokondri sayısı hücrenin baş edemeyeceği kadar ise ilgili hücre apoptoza giderek ölür.



Şekil 1. 6. PINK1'nın mitofoji'deki rolü (Sekine ve Youle, 2018).

Mitofajide PARKIN ve PINK1'nın yanı sıra görev alan başka proteinlerin de varlıkları bilinmektedir (Şekil 1.7). Bu proteinlerin mitofajideki rollerini belirleyebilmek için araştırmacılar hücre kültürü ve hayvan modellerinden yararlanmışlardır. Bu amaç doğrultusunda oluşturulan hücresel PH modellerinin çoğunlukla hedefi mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu ve mitofajiyi taklit etmek olmuştur.



Şekil 1. 7. Memeli hücrelerinde görülen PARKİN'den bağımsız alternatif mitofaji mekanizmasında rol aldığı düşünülen proteinler. (a) ULK1/2 yoluyla otofajinin aktivasyonu, TOR yolunun inhibisyonu ile indüklenir. (b) Otofagozom oluşumu, ULK1/2-ATG kompleksi ve Beclin1 ile Vps34'ü içeren PI3kinaz kompleksi tarafından düzenlenir. (c) Otofagozom zarının uzaması ve kapanması sırasında, sitosolik LC3-I, lipitlenmiş LC3-II üretmek için ATG4 tarafından bölünür. (d) LC3-II, otofagozom zarına alınır. (e) Komple otofagozom, içerik sindirimini sağlamak için lizozomla birleşir (Deas E., 2011).

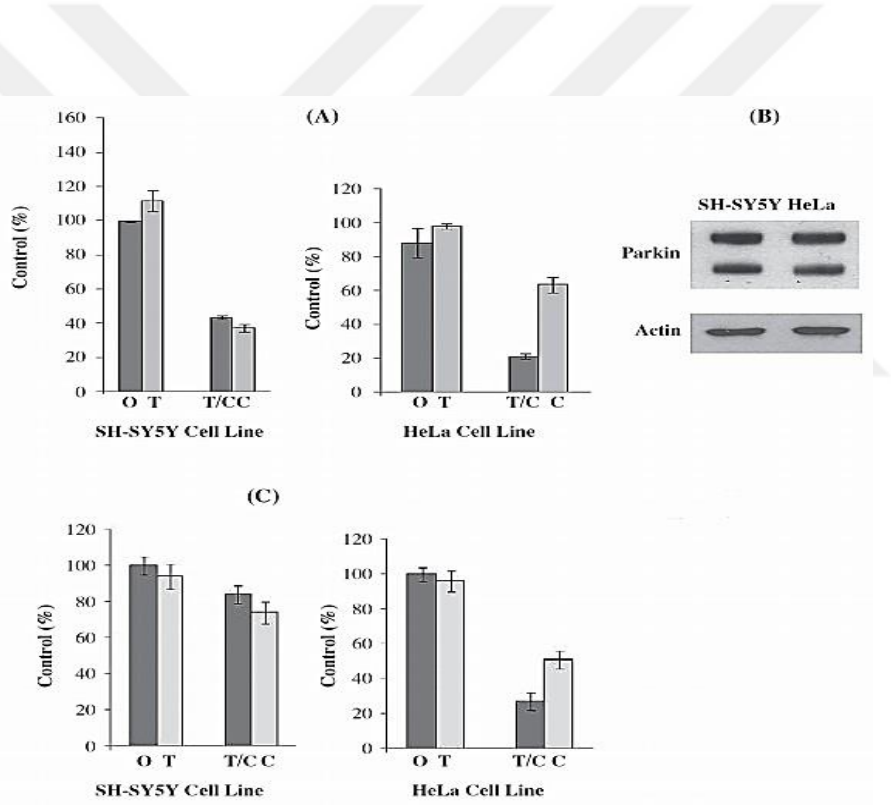
Narendre ve arkadaşları tarafından yapılan CCCP tabanlı mitofaji çalışmasında elde edilen veriler PARKIN ile birlikte PINK1 proteininin de mitofajideki rolünü ortaya çıkarmış ve böylece CCCP ile muamele edilen hücrelerin PH için iyi bir mitofaji modeli olabileceği ileri sürülmüştür (Narendra DP.,2010). Ancak model her ne kadar ilgi çekici bir model olsada, modelin evrensel bir model olup olamayacağına dair soru işaretleri bulunmaktadır (Seibler P., 2011; Van Laar VS., 2011; Cai Q., 2011; Rakovich A., 2013; Ashrafli G., 2014 ve Akpinar G., 2016). Özellikle CCCP'nin her hücre hattında aynı göstermemesi ve *in vivo* ortamda mitofajinin başarısız olması aşağıdaki soruların sorulmasına neden olmuştur. Bu sorular;

• Parkin'in mitokondriye taşınımı evrensel mitokondriyal stres cevabı oluşturmakta mıdır?

• Farklı hücre tipleri, mitokondriyal strese karşı farklı mekanizmalarla mı cevap vermektedir?

• Beyin kökenli hücrelerde veya nöronlarda farklı hücreler arası bir mekanizma aktive olmakta mıdır?

Bu açıdan bakıldığında özellikle Van Laar ve arkadaşlarının yaptığı çalışma şüpheleri doğrular yöndedir. Van Laar ve arkadaşları PINK1/Parkin aracılı Mitofajiyi primer kortikol nöronlarda araştırmış ve bu nöronlarda CCCP'nin Parkin'i mitokondriye yönlendirmediğini ve mitofajiyi indüklemediğini göstermiştir (Van Laar VS., 2011). Laboratuvarımızda yapılanı çalışmalarda ise bu datayı destekleyici veriler elde edilmiş, CCCP ile indüklenen mitofajinin farklı hücre tiplerinde farklı cevaplar oluşturduğunu gösterilmiştir (Kasap M., 2017; Akpinar G., 2016). Yapılan deneylerde, beyin kökenli SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde CCCP mitofajiyi indüklemezken, servikal kökenli HeLa hücrelerinde ve böbrek kökenli Hek 293T hücrelerinde ise indüklediği ortaya konulmuştur (Şekil 1.8). Bu nedenlerle mitofaji dinamiklerini *in vitro*'da indükleyebilecek ve doğal mitofaji süreçlerini/etkilerini en iyi şekilde yansıtabilecek yeni bir evrensel modele ihtiyaç vardır.



Şekil 1. 8. (A) Parkin ekspresyonunun CCCP ile muamele edilmiş hücrelerde hücre sağ kalımı üzerindeki etkisini gösteren WST-1 analizi. (B) Parkin'nin 24 saatlik indüksiyon sonrasında SH-SY5Y ve HeLa hücrelerinde ekspresyonu. (C) CCCP ile muamele edilen hücrelerde Parkin ekspresyonunun hücre sağkalımı üzerindeki etkisi. [O] standart ortamdaki kontrol kültürü, [T] Parkin indüksiyonu için tetrasiklin ile indüklenmiş kültür, [T/C] tetrasiklin ile indüklenmiş ve CCCP eklenmiş kültür, [C] sadece CCCP eklenmiş kültür (Akpinar G., 2016).

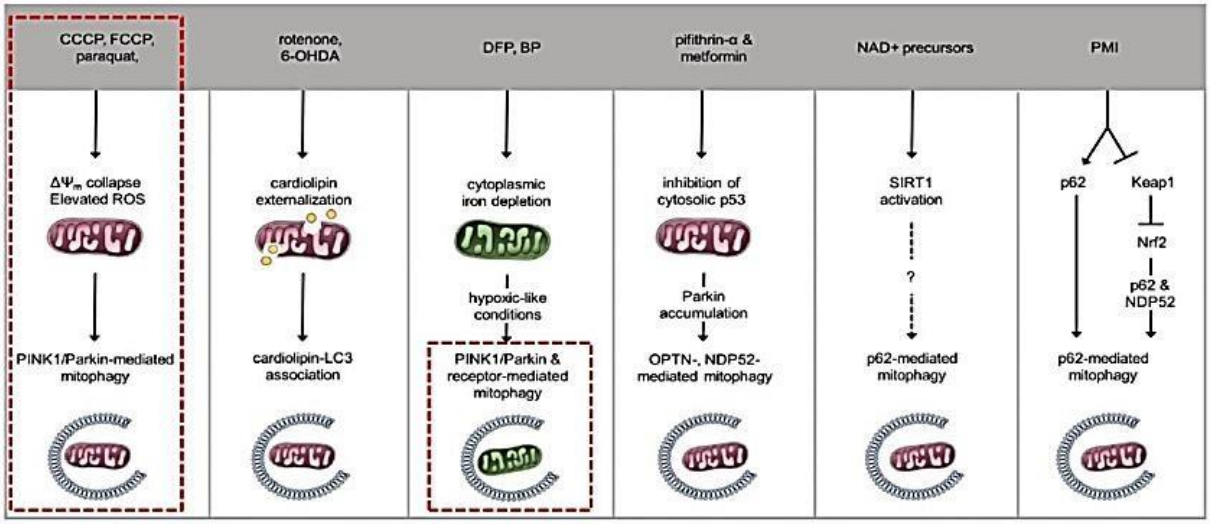
1.5. Genel Mitofaji Yolakları

Genel Mitofaji Yolakları Yapılan çalışmalar hücrelerde mitofaji tetiklendikten sonra iki genel yolak üzerinden ilerlediğini göstermektedir. Bunlardan birincisi mitokondri zarları üzerinde bulunan "reseptörler aracılığı" ile gerçekleşen mitofajidir (receptor mediated). Diğer mekanizma ise "reseptör aracılığı ile olmayandır" (non-receptor mediated veya PINK1/Parkin). Mitofaji olayı bu yollardan herhangi biri başlatıldıktan sonra, tetiklenme mekanizmalarından bağımsız olarak, bu mitokondrilerin çevresinde otofagosomun oluşmasını sağlayan bir izolasyon zarı üzerinde gelişmektedir. Bu otofagosoma dönüşecek olan izolasyon zarı LC3 (microtuble-associated protein 1A/1B light chain 3) ve GABARAP (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein) proteinleri mitofajiye giden mitokondrinin etrafını sarmalar. Reseptör aracılı gerçekleşen mitofajide, dış mitokondriyal membran üzerinde bulunan BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) ve NIX (Nip3 like protein X) reseptörleri, hipoksi durumunda taşıdıkları LIR motifi sayesinde LC3 ve GABARAP proteinleriyle etkileşerek mitofajiyi gerçekleştirirler. Yine hipoksik durumda mitofajiyi tetikleyen bir diğer mitokondriyal dış membran reseptörü FUNDC1'dir (FUN14 Domain Containing 1). FUNDC1'de yine LC3 ile etkileşmektedir (Hamacher-Brady ve Brady, 2016). İyi çalışılmış bu mitokondriyal dış zar reseptörlerinin yanında yine mitofajide rol oynayan başka reseptörler de (prohibitin 2, BCL2L13, FKBP8 ve AMBRA1) bulunmuştur (Murakava ve ark., 2015; Bhujabal ve ark., 2017; Di Rita ve ark., 2018). Daha önce de bahsedildiği gibi; reseptör aracılığı ile olmayan mitofaji mitokondriyal zar potansiyelinin bozulması ile tetiklenmekte ve PINK1/Parkin'nin başını çektiği hücresel yolak ile gerçekleştirilmektedir (Narendra ve diğ., 2008).

1.6. i*n vitro* Mitofajik Ajanların Karşılaştırılması

Fonksiyonu bozulmuş mitokondrilerin seçici olarak ortadan kaldırılmasında baş vurulan mitofaji, deneysel olarak farklı sentetik kimyasal bileşiklerle veya doğal kimyasal ajanlar ile taklit edilebilir (Şekil 1.9 ve 1.10). Deneysel olarak tetiklenen mitofaji, kullanılan ajana göre farklı mitofajik yolakların test edilmesini sağlar. Bu şekilde oluşturulan hücresel mitofajik modeller ile, mitokondrinin rol aldığı farklı hücresel durumlar ve hastalıkların moleküler mekanizmaları çalışılabilmektedir. Genel olarak bakıldığında, mitokondriyal dinamikler, biyogenez, biyoenerji, otofajik yapının oluşumu ve taşınması dahil olmak üzere mitokondriyal homeostazın birçok yönü, fonksiyonu bozulmuş mitokondrinin ortadan kaldırılmasını teşvik etmek için PINK1 / Parkin yolunda birleşmektedir (Pickles ve ark., 2018; Harper ve ark., 2018). Bu sebepten dolayı farklı doğal ve doğal olmayan ajanların tetiklediği mitofaji modelleri

içerisinde zar potansiyelini bozan ajanlar burada tartışılmıştır. Tez kapsamında özellikle sıklıkla kullanıldıkları için PINK1/PARKİN yolağını aktive eden kimyasal ajanlar üzerinde durulmuştur (Şekil 1.9 ve 1.10'da kesikli kırmızı kareler içerisinde işaretlenen). Mitokondriyal "uncoupler" lar olan karbonil siyanür m-klorofenil hidrazon (CCCP) ([(3-klorofenil) hidrazono] malononitril) ve karbonil siyanür-4- (triflorometoksi) fenilhidrazon (FCCP), elektron taşıma zincirindeki elektron taşıyıcılarının normal aktivitesi sırasında mitokondriyal zarlarda oluşturdukları porlar aracılığıyla proton gradyanının bozulmasını neden olarak oksidatif fosforilasyonu inhibe ederler (Narendra ve ark., 2008; Narendra ve ark., 2010; Gatliff ve ark., 2014). Bu iki toksinde zar potansiyelini bozup PINK1/Parkin yolağını aktive ederek mitofayi tetiklerler. Demir şelatörleri olan deferiprone (DFP) ve 2',2-bipyridyl (BP) hipoksik koşulları taklit ederek mitofajiyi tetiklerler. Yapılan çalışmalar DFP'nin mitofaji için Parkin aktivasyonu gerektirmediğini gösterse de, BP'nin PINK1/Parkin üzerinden mitofajiyi yürüttüğü bilinmektedir (Allen ve ark., 2013).



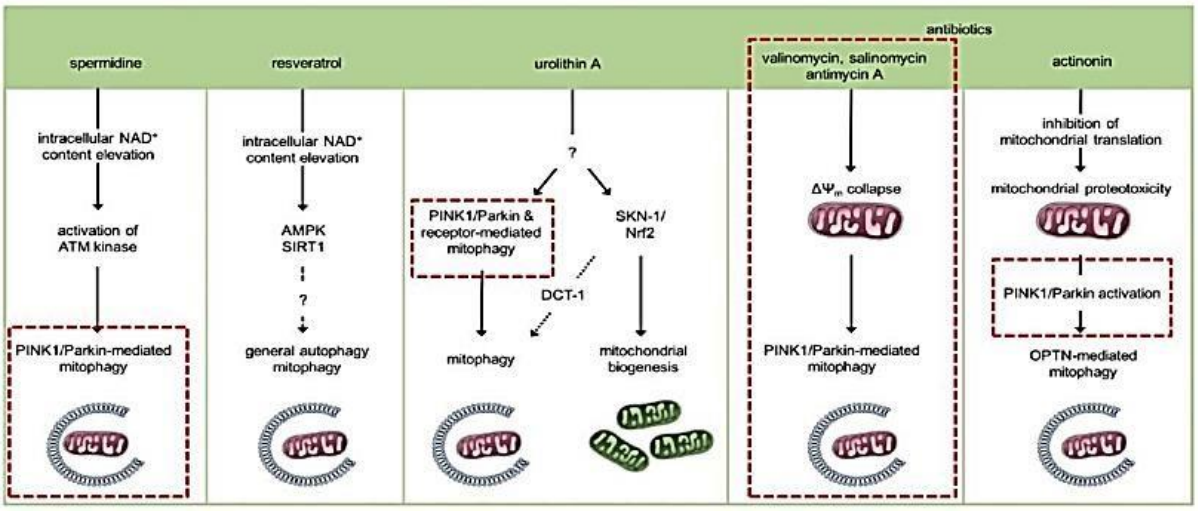
Şekil 1. 9. Mitofajiyi tetikleyen sentetik kimyasal bileşikler, kesikli kırmızı kutular ile işaretlenmiş olan ajanlar tez çalışmasında önerilen model ile benzer olanlardır (Palikaras ve ark., 2020).

Doğal küçük moleküllerden olan polyaminlerin hücrede çoğalmadan büyümeye, enerji hemostazından immün yanıtın oluşmasına pek çok fizyolojik olayı etkilediği ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalar polyamin konsantrasyonundaki azalma ile yaşlanma ve gelişen patolojiler arasında ilişkiyi göstermiştir (Markaki ve ark., 2018). Bir polyamin olan spermidine'nin otofajiyi NAD+ içeriğinin artması ile stimüle ederek hücre koruyucu etki gösterdiği ve bu vasıta ile de hayat süresini uzattığı ortaya konulmuştur (Eisenberg ve ark.,

2009; Eisenberg ve ark., 2016). Spermidine takviyesinin insan fibroblast hücrelerinde ATM (ataxia telengiectasia mutated) kinazın aktivasyonu üzerinden PINK1/Parkin yolağını kullanarak mitofajiyi gerçekleştirdiği deneysel olarak gösterilmiştir (Qi ve ark., 2016). Ürolitinler, bağırsak mikrobiyotası tarafından tüketilmeleri üzerine üretilen ellagitannin türevleridir (Espin ve ark., 2017). İnsan vücudundaki ellagitanninlerin en bol metaboliti olan ürolitin A'nın (UA) özellikle nematodlarda ve kemirgenlerde mitofajiyi tetiklediği gösterilmiştir (Ryu ve ark., 2016). UA ile etkileşimin Beclin 1, PINK1, p62/SQSTM1 ve BNIP3/NIX üzerinden mitofajiyi düzenlediği bu sayede mitokondriyal fonksiyonu koruduğu ileri sürülmektedir (Ryu ve ark., 2016). UA'nın kullanımı bir mitofajik model olarak ele alınmasa da PINK1/Parkin mekanizmasını tetikliyor olduğu düşünülmektedir.

Mitofajiyi tetikleyen bir diğer doğal ajan grubu antibiyotiklerdir. Valinomisin ve salinomisin mitokondriyal potasyum (K+) homeostazını değiştirerek, mitokondrinin fonksiyonunu bozmakta ve PINK1/Parkin yolağını aktive etmektedirler (Georgakopoulos ve ark., 2017; Allen ve ark., 2013). Bir kompleks III inhibitörü olan antimisin A ise ROS miktarının artarak membran depolarizasyonuna dolayısıyla yol açmakta ve bu durum yine PINK1/Parkin üzerinden mitofajiyi tetiklemektedir (Georgakopoulos ve ark., 2017). Bir diğer antibiyotik olan aktinonin ise özellikle mitokondriyal translasyonu durdurarak, zamana bağlı olarak mitokondriyal ribozom, rRNA ve mRNA'ların azalmasını sağlayarak mitokondrinin işlevsiz hale gelmesini sağlar. Bu sayede PINK1/Parkin yolağını kullanarak organelin mitofajiye uğramasını sağlar (Burman ve ark., 2017; Sun ve ark., 2015). Bu antibiyotikler mitofaji modeli oluşturmada sıklıkla kullanılmadıkları için ve bilinen benzer yolakları kullandıkları için tez kapsamında detaylı tartışılmamışlardır.

Enerji metabolizmasının veya mitokondri fonksiyonun sentetik ve doğal kimyasal ajanlarla bozulması ile tetiklenen mitofajiye dair aydınlatıcı sonuçlar elde edilmesine rağmen, doğal ortamda gelişen mitofaji stimülasyonu henüz *in vitro* bir model olarak değerlendirilememiştir. Uygun özellikte hücre veya hayvan modellerini kullanarak farklı hücresel popülasyonlarda mitofajinin regülasyonunun çözülmesi, bu mekanizmanın altında yatan moleküler değişimleri anlayışta eşi benzeri görülmemiş bir ilerlemeye yol açacaktır. Ayrıca, *in vitro* ve *in vivo* mitofaji modellerinin gelişmesi, mitokondrinin rol aldığı hastalıkların etiyolojisine ve translasyonel araştırmalarına ışık tutacaktır. Önümüzdeki yıllarda, elde edilen bu bilgiler ışığında, mitofajinin insan fizyolojisi üzerindeki etkisi, mitokondriye bağlı patolojilere karşı terapötik etkinliklerini araştıran klinik çalışmalarla değerlendirilecektir.

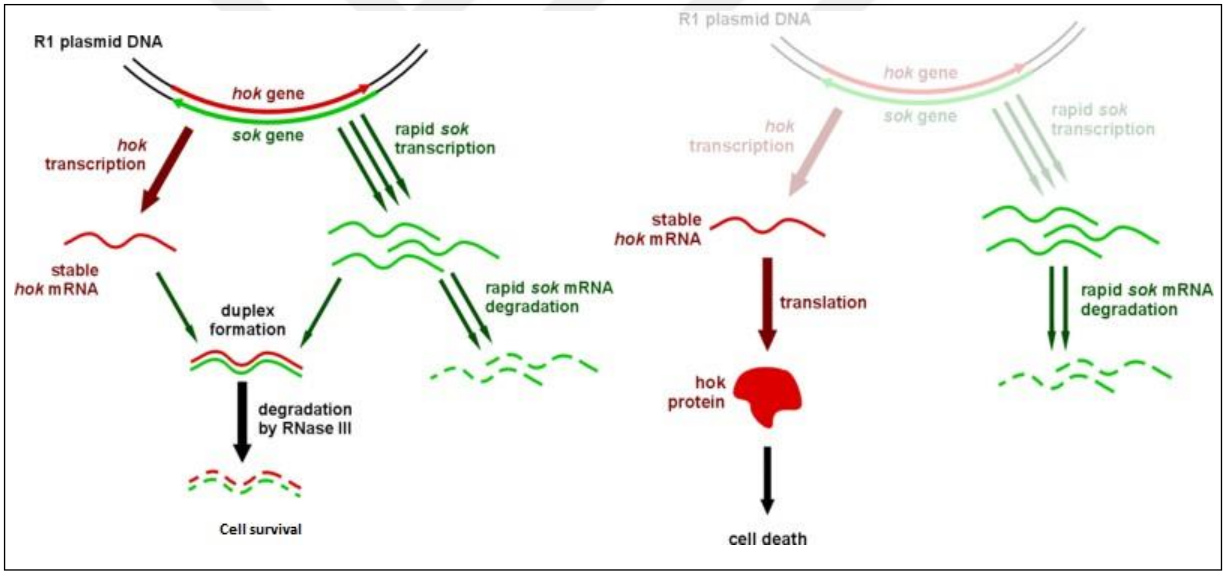


Şekil 1. 10. Mitokondrinin hücreden kaldırılmasını teşvik eden doğal kimyasal ajanlar, kesikli kırmızı kutular ile işaretlenmiş olan ajanlar tez çalışmasında önerilen model ile benzer olanlardır (Palikaras ve ark., 2020).

Doğal ve doğal olmayan ajanların mitofaji araştırmalarında yaygın olarak kullanılması, bu ajanların istenmeyen bazı özelliklerinin, günümüzdeki modellerden elde dilen sonuçların gerçeği ne kadar yansıttığının sorgulanmasına yol açmakta ve kullanımlarının sınırlandırılmasının önemini vurgulamaktadır. Özellikle kullanılan bu ajanların bir hücredeki mitokondriyal popülasyonun tamamı üzerindeki etki göstermeleri, anında tüm mitokondrilerin membran potansiyellerini bozmaları, enerji krizi oluşturarak hücreyi hızlıca apoptoza götürmeleri, mitofajinin hücresel modellenmesi açısından önemli sorunlara neden olmaktadır (Wang ve ark., 2012). Ayrıca bu ajanların mitofajiyi tetikleyebilmek için sürekli olarak hücre kültürüne dışarıdan takviye edilmesinin gerekliliği, hücrenin mitokondriyal içeriğin tamamının hızla bozulmasına neden olabilmektedir (Narendra ve ark., 2008). Bunlarla birlikte, bu ajanlarla ilgili belki de en ciddi yan etki, bu ajanların protonoforik aktivitelerinin sadece mitokondriyal zarlara özgün olmamasıdır. Diğer hücresel zarlara (plazma zarındaki bozulmalar, lizozomal fonksiyon bozuklukları ve iyon kanalı uyarımı gibi) verdikleri hasarlar ile hücre homeostazını bozmaları, bu ajanların çok etkin yan etkileri olarak karşımıza çıkmaktadır (Georgakopoulos ve ark., 2017). Bu istenmeyen özellikler mitokondriyal metabolizmanın değerlendirilmesine müdahale etmekte ve bu ajanların oluşturduğu modellerin mitokondriyal yolaklar ile olan ilişkilisini sınırlamaktadır.

1.7. Bakteriyel HOK/SOK Sistemi

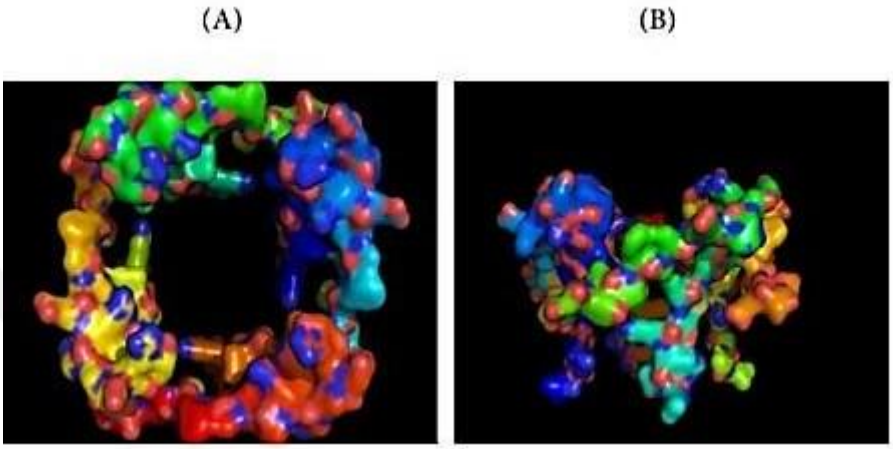
Escherichia coli R1 plazmidi üzerinde keşfedilen ve burada plazmitsiz hücrelerin post-segregasyonel öldürülmesi yoluyla bir hücre popülasyonundaki plazmit kopyalarını muhafaza ederek hareket eden (Gerdes ve ark., 1986) sistemde HOK (konak öldüren) tip I toksin; iç zarı hedefleyen ve hücre ölümüne yol açan 52 amino asitlik küçük bir hidrofobik proteindir. Sok (öldürmenin baskılanması) antitoksini, transkripsiyon sonrası seviyede HOK üretimini engelleyen bir RNA'dır (Thisted ve ark.,1992; Gerdes ve ark., 1986). Sistem, HOK kodlama dizisi (CDS) ile örtüşen ve HOK çevirisi için gerekli olan üçüncü bir gen olan mok'tan (öldürmenin modülasyonu) oluşur (Şekil 1.11) (hok: hostkilling-bakteri içerisindeki yarı ömrü 20 dk olan toksin, sok: supression of host killing- bakteri içerisindeki yarı ömrü 30 sn olan RNA antitoksin, mok: modulation of killing- HOK ifadesi için gerekli olan dizi) (Pedersen ve Gerdes, 1999; Thisted ve ark.,1992; Gerdes ve Wagner, 2007).



Şekil 1. 11. HOK/SOK sisteminin *E. coli* R1 plazmitine bağlı olarak çalışması. (Https://en.wikipedia.org/wiki/Hok/sok_system) (Gerdes ve ark., 1986; Gerdes ve ark., 1986; Thisted ve ark., 1995).

Bakterideki sistemde, R1 plazmidini taşıyan bakteride, küçük antisens RNA molekülü olan antitoksin (SOK), toksini (HOK) kodlayan mRNA'ya bağlanarak yıkımına sebep olur. Böylelikle toksinin ifadesi gerçekleşmez ve bakteri yaşamına devam eder (Page ve Peti, 2016; Unterholzner SJ., 2013; Brantl S., 2012). Eğer sok sentezini gerçekleştirecek R1 plazmit yoksa, hücre içerisinde bölünme sonrası bulunan sok mRNA'sı kısa ömründen dolayı hızla yıkılır, toksin HOK'a ait mRNA ise uzun yarı ömrü dolayısıyla translasyona uğrayıp hok proteinini sentezler. HOK proteini hidrofobik bir proteindir ve hücre zarı yüzeyine yerleşerek multimerize

olduğu bilinmektedir. Bu multimerizasyon sonucu zar üzerinde porlar oluşturabileceği tahmin edilen Hok'un, zar potansiyelini düşürerek ve zar depolarizasyonunu sağlayarak bakteri hücrelerini öldürdüğü ileri sürülmüştür (Thisted T., 1995; De La Cueva-Méndez G., 2007; Unterholzner SJ., 2013). Tez kapsamında yapmış olduğumuz üç boyutlu modelleme çalışmasında HOK'un multimer formunun por oluşturabileceğine dair bilgiler elde edilmiştir (Şekil 1.12).



Şekil 1. 12. HOK proteinine ait multimer formun Swiss Homoloji modellemesi yapılarak tahmin edilen muhtemel üç boyutlu yapısı (4 adet HOK proteinin oluşturduğu yapının A; üstten, B; yandan görünümü). Modelleme sırasında TM1070 proteini (PDB erişim no: 1nc7) template olarak kullanılmıştır. Şekilde gösterilen yapı HOK proteinine ait homotetramer bir yapıdır. Görüntüler PyMol kullanılarak tarafımızca elde edilmiştir.

Benzer membran potansiyeli değişikliği ve depolorizasyon Parkinson Hastalığında'da ki disfonksiyonel mitokondrilerin zarlarında da gözlenmekte ve Parkinson Hastalığının oluşum mekanizmalarından biri olarak kabul görmektedir.

1.8. Floresan Proteinler

Floresan proteinler, biyoloji ve biyoteknolojide çok önemli olan, genetik olarak kodlanmış, kolayca görüntülenen raportörlerdir.

1.8.1. Yeşil Floresan Protein, GFP

GFP (Yeşil Floresan Protein), Pasifik sahillerinde bulunan Aequoria victoria denizanasından izole edilmiştir ve ilk araştırmalar 1960'lı yıllarda başlamıştır (Shimomura ve ark.1962). Rekombinant DNA teknolojisinde sıklıkla kullanılan GFP geni işaretleyici gen olarak ilk E. Coli bakterisinde gösterilmiştir (Chalfie ve ark, 1994).

GFP 238 aminoasitden oluşan bir moleküldür. Yapısal olarak bakıldığında GFP β-fıçı yapıya sahiptir ve 509 nm dalga boyunda yeşil parlak ışık vermektedir. Bunun yanında kırmızı ve mavi gibi farklı dalga boylarında ışıma veren floresan proteinlerde bulunmuştur.

1.8.2. Kırmızı Floresan Protein, RFP

Kırmızı floresan protein (RFP), Discosoma mercanından izole edilmiştir (Campbell ve ark., 2002) ve DsRed olarak adlandırılmıştır. Uyarıldığında kırmızı-turuncu floresan renk veren ir florofordur. Yönlendirilmiş mutagenez kullanılarak çeşitli varyantlar geliştirilmiştir.

RFP yaklaşık 25,9kDa'dır. 558 nm dalga boyunda kırmızı-turuncu ışık verir.

2. AMAÇ

Bir takım kimyasal ajanların mitofajiye nasıl sebep olduğu hücre kültürü çalışmaları ile gösterilmiştir. Ancak kullanılan kimyasallar hücrede farklı pek çok yolağı etkilemekte ve mitofaji haricinde farklı mekanizmaların devreye girmesiyle elde edilen sonuçların mitofaji ile ilişkilendirilmesinde zorluklar çıkarmaktadır (off-target effects).

Bu tez çalışmasında, zar depolarizasyonu yaptığı bilinen bakteriyel HOK/SOK sisteminde görev alan HOK geni kullanılacaktır. HOK proteini hidrofobik bir proteindir ve hücre zarı yüzeyine yerleşerek multimerize olduğu bilinmektedir. Bu multimerizasyon sonucu zar üzerinde porlar oluşturabileceği tahmin edilen HOK'un, zar potansiyelini düşürerek ve zar depolarizasyonunu sağlayarak bakteri hücrelerini öldürdüğü ileri sürülmüştür (Thisted T.,1995; de la Cueva-Méndez G., 2007; Unterholzner SJ., 2013).

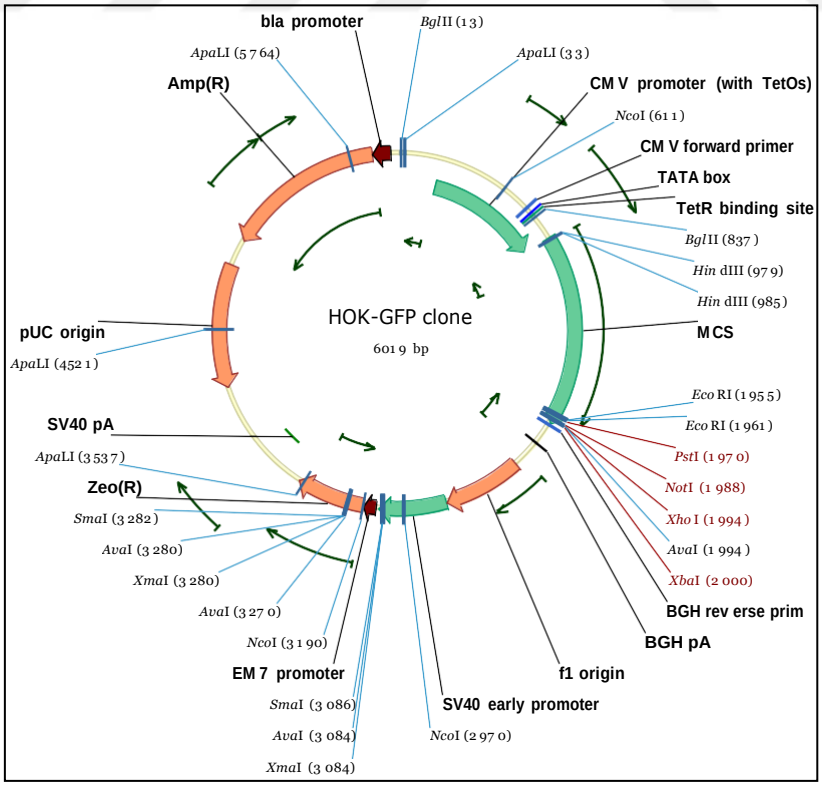
Bu çalışmada, oluşturulacak modelin Hek293T $TetR^+$ hücreleri ile tetrasiklin kontrollü bir sistem oluşturulması hedeflenmektedir. Gerçekleştirilecek ko-transfeksiyonda HOK proteininin mitokondriye lokalize olduğunu göstermek için HOK proteini GFP ile etiketlenmiştir. Mitokondriye yönlendirilen RFP proteini ise HOK'un meydana getireceği morfolojik değişimleri gözlemlemek için sisteme dahil edilmiştir. Bu amaçla Hek293T TetR+ hücrelerine hem RFP-Mito geni hem de MTS-HOK-GFP geni transfekte edilecektir. Bu model ile HOK ve RFP geni Tetrasiklin kontrolünde istenildiğinde başlatılıp ve gerekli görüldüğünde durdurulmuştur. Böylelikle mitofaji başlangıcından itibaren sürecin her aşaması daha detaylı olarak incelendi ve ilişkili moleküler mekanizmalar ortaya konuldu.

3. YÖNTEM

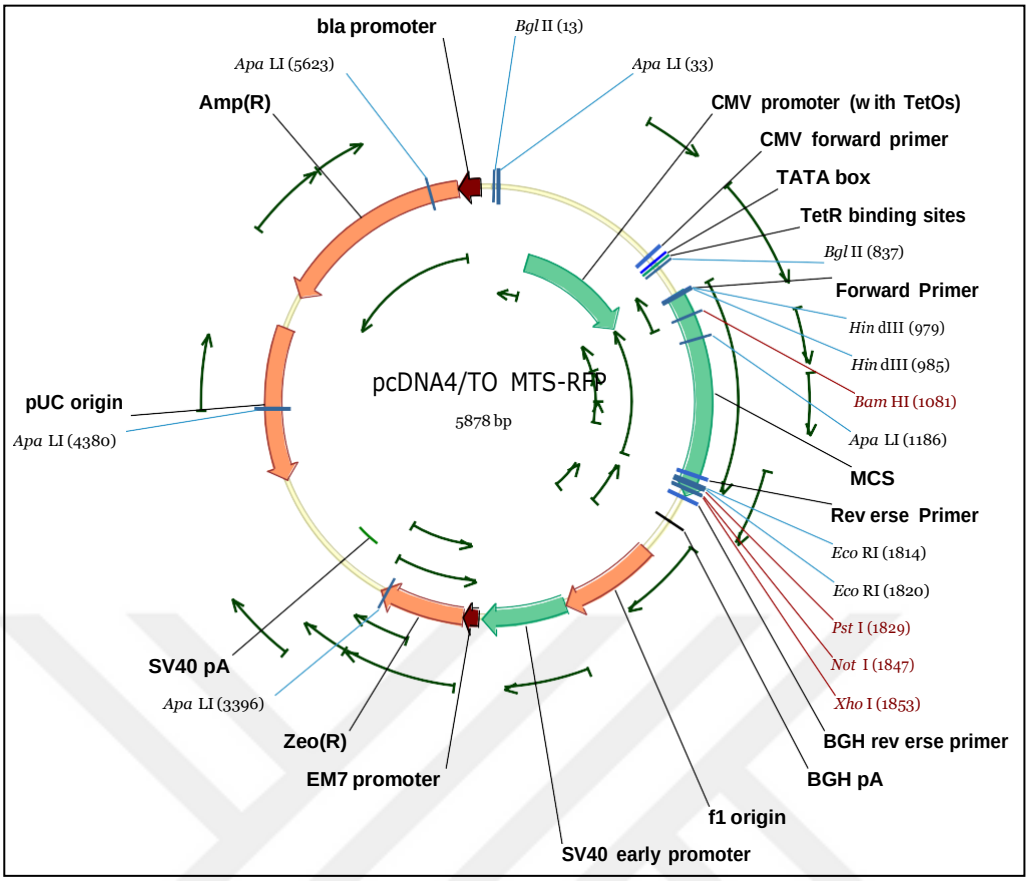
3.1. Eksprese Edilecek Protein Gen Dizilerinin Tasarımı

Tez kapsamında laboratuvarımızda TÜBİTAK 1001 kapsamında yürütülen 'Bakteriyal Kökenli Hok Proteini Kullanarak Yeni Bir Hücresel Mitofaji Modelinin Geliştirilmesi' başlıklı projeden elde edilen ve daha öncesinden tasarlanan pCDNA4/TO_MTS-HOK-GFP ve pTAG-RFP-Mito plazmitleri kullanılmıştır. HOK proteinini kodlayan plazmit tasarımı yapılırken HOK mitokondriye yönlendirilmiştir. HOK proteinine etiketlenen GFP floresan proteini HOK proteininin mitokondriye lokalize olduğunu görebilmek için kullanılmıştır (Şekil).

pTAG-RFP-Mito (Evrogen Inc., Rusya) ise HOK proteinin mitokondride meydana getirdiği depolarizasyonu takip edebilmek için mitokondriye yönlendirilmiş kırmızı floresan proteini kodlayan plazmit konstraktıdır. Tez kapsamında bu vektör üzerinden RFP-Mito gen dizisi PCR ile çoğaltılarak, detayları aşağıda verildiği şekilde pCDNA4/TO vektörüne alt klonlama yoluyla aktarılmıştır. Böylece, hem HOK-GFP (Şekil 3.1) konstraktı hem de RFP-Mito konstraktı tetrasiklin altında indüklenebilir bir hale sokulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3. 1. HOK-GFP rekombinant plazmitin sanal klonlaması.



Şekil 3. 2. pCDNA4/TO MTS-RFP rekombinant plazmitin sanal klonlaması.

3.2. RFP-Mito geninin PCR ile Çoğaltılması ve pCDNA4/TO Plazmitine Alt Klonlanması

Laboratuvar envanterimizde bulunan pTag-RFP-Mito (Evrogen, Rusya) plazmitinden 835 baz çiftine sahip RFP gen dizisi forward primeri-HindIII ve reverse primeri-EcoR1 kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile çoğaltılmıştır. Elde edilen HindIII ve EcoRI kesim bölgelerine sahip RFP gen dizisi, pCDNA4/TO plazmiti içerisine klonlanmıştır.

Bu amaçla pTag-RFP-Mito (820 ng/ul) plazmiti içerisinden RFP geninin çoğaltılması için Tablo 1'de belirtilen koşullarda ve döngüde (Tablo 2) PCR reaksiyonu kurulmuştur. Mutasyon riskinin azaltılması için 'Long PCR' yöntemi kullanılarak reaksiyon kurulmuştur.

Tablo 1. Long PCR için reaksiyon ürünleri ve miktarları.

MADDE	**MİKTAR (µl)**
dH_2O	86
10x Taq-buffer	15
dNTP mix (2 mM)	15
MgCl2 (25 Mm)	15
Kalıp DNA (10 ng)	1,2
Forward primer (5,53nmol)	6,25
Reverse primer (4,67 nmol)	6,25
Long PCR Enzim karışımı	2,25
Toplam hacim	**150** (6 reaksiyon için)

Tablo 2. PCR evrelerinin sıcaklık ve süreleri (Tm:62,2)

BASAMAK	**SICAKLIK (^OC)**	**ZAMAN (dakika)**	**DÖNGÜ SAYISI**
1. Denatürasyon	94 94	5	1
2. Birleşme	57	30 s 30 s	35
3.Uzama	72 72	1	
4.Son Uzama	4	20 ∞	1 1

Yukarıdaki tablolarda yer alan şartlara göre hazırlanan reaksiyon ürünleri %1 konsantrasyon yoğunluğuna sahip EtBr içeren Agaroz jele 5 µl PCR ürünü ve 3 µl 6x yükleme tamponu (Tablo 3) ile birlikte kuyucuklara yüklendi. PCR ürünlerinin doğruluğunu anlayabilmek için ise 1 kb DNA marker kullanıldı.

Tablo 3. 6x Yürütme boyası içeriği.

6x Yürütme Boyası
30% (v/v) glycerol
0.25% (w/v) bromophenol blue
0.25% (w/v) xylene cyanol FF

Agaroz jel eletroforez siztemi ile 100 V güçte 30 dakika yürütülen PCR ürünleri doğrulandıktan sonra ürünleri tekrardan %1 konsantrasyona sahip etidium bromürsüz agaroz jelde yürütüp, jelden geri kazanım protokolü uygulandı.

3.2.1. PCR ürününün Jelden Geri Kazanımı

%1'lik ETbr'süz agaroz jele örnekler yüklendi ve referans noktasından steril bistüri ile kesildi. Kesilen jel parçaları daha küçük parçalara bölünerek iki axygen tüpe220 mg ve 230 mg olarak tartıldı.

Roche High Pure PCR Pruduct Purification kiti ile jelden geri kazanım protokolü aşağıdaki gibi uygulandı.

DNA 50µl -50 µl şeklinde iki mikro santrifüj tüpüne bölündü ve totalde 100 µl distile su ile toplandı.

Nükleik asit konsantrasyon ölçümü 40,7 ng/ml geri kazanım olduğunu gösterdi.

3.2.2. pCDNA4/TO Plazmitine Klonlama

PCR tekniği ile çoğaltılan RFP gen dizisi (835bp) pcDNA4/TO (5078bp) vektörü içerisine HindIII ve EcoRI restriksiyon kesim bölgeleri kullanılarak klonlanmıştır.

3.2.2.1. Birinci Enzim Kesimin Kurulması

HindIII restriksiyon enzimi ile hem PCR ürünü olan RFP-Mito hem de pCDNA4/TO plazmiti ayrı tüplerde tek enzim kesimine tabi tutulmuştur (Tablo 4).

Tablo 4. HindIII restriksiyon enzimi ile RFP-Mito ve pCDNA4/TO plazmit kesimi için kullanılan ürün ve miktarları.

	PCR Ürünü	**pCDNA4/TO**
Kalıp DNA (1000 µg)	25 µl	0,74 µl
Enzim (10 U/µL)	1,5 µl	1 µl
Buffer (10X)	3 µl	2 µl
dH_2O	0,5 µl	16,26 µl
Total	30 µl	20 µl

Kesimler 37 °C'de gece boyu yapıldı.

3.2.2.2. Kesimlerin Sodyum Asetat ile Çöktürülmesi

İnkübasyon bitiminde kesim ürünlerinin elde edilmesi ve EcoR1 ile ikinci kesiminin kurulabilmesi için Sodyum asetat çöktürmesi yapılmıştır. Sodyum asetat çöktürme protokolü aşağıdaki gibidir.

1) Kesim ürünleri üzerine 3M sodyum asetat eklendi ve daha sonra distile su ile hacim tamamlandı.
2) Ardından mikrosantrifüj tüp 1,5 ml çizgisine kadar %100 saf etil alkol eklendi. -20°C dolapta 4 saat bekletildi.
3) Bekleme sonrası 16000xg'de +4°C'de 40 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pellet üzerine %80'lik soğuk etil alkol eklendi. Tekrar santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırılarak kalan tüpün dibinde kalan DNA 5 dk oda sıcaklığında kurutulduktan sonra üzerine Tablo 5'de detayları verilen ikinci kesim reaksiyonu kuruldu.

Tablo 5. İkinci kesim reaksiyon içerikleri.

	PCR Ürünü	**pCDNA4/TO**
Enzim (10 U/µL)	0,5 µl	0,5 µl
Buffer (10X)	2 µl	2 µl
Kalıp DNA (çöktürme sonunda kalan DNA)	Çökelti	Çökelti
dH_2O	17,5 µl	17,5 µl
Total	20 µl	20 µl

Kesimler 37 °C ‘de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.2.2.3. Jelden Geri Kazanım

Gece boyu inkübasyona bırakılan ikinci kesim ürünleri %1 yoğunluğa sahip etidyum bromürlü agaroz jelde yürütülüp doğrulandıktan sonra tekrardan etidyum bromürsüz jelde yürütülerek gen ve plazmitin ligasyonu için “Roche High Pure PCR Product Purification(cat no:11732676001) ile jelden geri kazanım protokolü uygulanarak izolasyon sağlandı.

İzole edilen DNA’ların NanoDrop spektrofotometre ile konsantrasyonu ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları aşağıdaki gibidir.

- Gen: 4,25 ng/µl
- Plazmit: 2,4 ng/µl

Elde edilen ürünler sodyum asetat çöktürmesine tabi tutulup gen ve vektör aynı tüp içerisinde birleştirilerek ligasyon kurulmuştur.

3.2.2.4. Ligasyon

Gen ve plazmit arasındaki ligasyonunu gerçekleştirebilmek için aşağıdaki Tablo 6’daki reaksiyon komponentleri karıştırılmıştır.

Tablo 6. Ligasyon reaksiyon komponent ve miktarları.

Ürün	**Miktar (µl)**
10x T4 DNA Ligaz (1000 U)	1
10x T4 DNA Ligaz Buffer (10X)	1
RFP-Mito + pCDNA4/TO	Pellet
ATP	0,25
DTT	Pipet ucu
dH_2O	8
Total	10

Ligasyon reaskiyonunun gerçekleşebilmesi için reaksiyonun kurulduğu tüp 16°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

3.3. Transformasyon

PcDNA4/TO-RFP-Mito ligasyon ürününden 2 µl alınarak elektroporasyon yöntemi kullanılarak elektrokompotent E. coli XL1Blue hücrelerine aktarımı yapılmıştır. Elektroporasyon adımları aşağıdaki sıra ile gerçekleştirilmiştir.

1. 50 µl'lik %20 gliserol içeriği bulunan elektrokompetan E.coli XL1Blue suşu ile 2 µL ligasyon karışımı karıştırılarak Elektroporatör cihazında (Eppendorf, Electroporator 2510, USA) 1780 volt akıma maruz bırakıldı.
2. Aktarım yapılan elektrokompetan hücreler üzerine 300 µl kadar SOB (super optimal broth) eklendikten sonra 37 °C'de çalkalamalı etüvde 1 saat inkübe edildi.

3. Elde edilen transforme hücrelerin seçimlerinin yapılabilmesi için 1:1000 oranında ampisilin içeren LB Agar katı besiyeri ortamına baget ile yayma ekimleri gerçekleştirildi.

4.37°C etüvde koloni oluşumu için gece boyu bırakıldı.

3.3.1. Hücrelerin Çoğaltımı ve Ligasyon ürününün doğrulanması

Ampisilin (Sigma EC200-709-7) antibiyotiğine karşı direnç gösterebilen suşların seçilimi sonrasında, agar katı besi ortamında üreme gösteren 3 koloni seçildi ve 37 °C'deki çalkalamalı etüvde 2ml'lik ampisilinli LB (Sigma Lot: BCBN9308V) sıvı besiyerinde gece boyu üremeye bırakıldı. Ertesi gün, santrifügasyon ile elde edilen hücre peletlerinden QIAprep Spin Miniprep Plasmid Kit (Lot:151036440) yardımıyla aşağıdaki yöntem uygulanarak plazmit izolasyonu yapıldı.

1) Besiyerini uzaklaştırmak ve hücre pelletini elde etmek için 3550 rpm 20 dakika oda sıcaklığında santrifuj yapıldı.
2) Pellet 250µl Resuspansion tamponu ile çözülerek axygen tüpe alınmıştır. Çözelti üzerine hücrelerin patlamasını sağlamak amacı ile 250µl Lysis Buffer P2 eklenmiş, mikrosantrifüj tüpü 10 kez ters-düz edilerek enzim aktivitesi için 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3) İnkübasyon süresinden sonra enzim aktivitesi durdurmak için 350µl Neutralization Buffer N3 eklenmiş, mikrosantrifüj tüpü 8-10 defa ters-düz edilerek 15000xg 10 dakika oda sıcaklığında santrifuj yapılmıştır.
4) Süpernatant QIAprep 2.0 Spin Colums kolon üzerine alınmıştır. Kolon, DNA'yı tutması ve diğer kompotentleri atık olarak uzaklaştırması sistemine dayalı çalışmaktadır. Ardından 10000xg oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj yapılarak kolonun altında kalan tampon atıkları uzaklaştırılmıştır.
5) Kolon üzerine 500µl Binding Buffer PB eklenmiş ve santrifüj yapılmıştır.
6) Kolon üzerine 750µl Wash Buffer PE eklenmiş ve santrifüj yapılarak kolonun altında kalan buffer atıkları uzaklaştırılmıştır.
7) Kolon 1,5ml'lik steril yeni mikrosantrifüj tüpe alınmıştır. Elüsyon aşaması için kolon üxerine 50µl dH_2O eklenerek santrıfüj yapılmıştır ve kolona tutunan DNA kolondan indirilmiştir. Nanodrop Spektrofotometres cihazında elde edilen klonun konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Seçilen 3 ligasyon kolonisinin NanoDrop spektrometre cihazında ölçülen konstrasyonları ve saflık değerlerini belirten 260/280 değerleri.

Koloni İsmi	**Ölçüm sonucu**
K1	76,1 ng/µl
K2	50,08 ng/µl
K3	88,8 ng/µl

Ligasyon ürünlerinin doğrulanması amacıyla ilgili gen dizisinin ve plazmitin uzunluklarının tespiti için 500ng kalıp kullanılarak HindIII ve EcoR1 restriksiyon kesim enzimleri Tablo 8'de verilen miktarlar ve kompotentler ile 37°C'de 4 saat kesime tabi tutulmuştur.

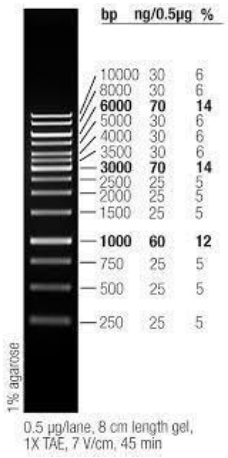
Tablo 8. Kullanılan restriksiyon enzimleri ve miktarları

Kullanılan Enzimler	Miktar (µl)
HindIII Restriksiyon enzimi	0.5 µl
EcoR1 Restriksiyon enzimi	2 µl
10X R Buffer	2 µl
Ultra saf su	Hacmi 20 µl tamamlama

Kesim sonucunda ürünler %1,5'lük Etidyum Bromürlü Agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jelin hazırlamak için stok 50X TAE Buffer (Tablo 9), 1X TAE tampon haline getirilmiştir. %1 oranında agaroz jel için TAE Buffer ile Agaroz (Prona Lot:094502PR) yeterli miktarda çözülmüş ve içerisine 1µl etidyum bromür (EtBr) eklenmiştir. Jelde oluşan bantlaşmaların doğruluğunu ve yoğunluğunu yorumlayabilmek için GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific #SMO311 Lot:00456176) kullanılmıştır. Şekil 3.3'de 1kb gene markerin bant hizaları gösterilmiştir.

Tablo 9. 50X TAE Stok Solusyon (pH 8,6)

50X TAE Stok Solusyon
242 g Tris Base (MW=121.1)
57.1 mL Glacial Acetic Acid
18.61 g Disodyum EDTA
dH_2O



Şekil 3. 3. GeneRuler 1 kb DNA Ladder bantları

Jel analizi sonucunda doğrulanan plazmitleri içeren bakteri klonları 50µg oranında ampisilin içeren 100ml LB Broth sıvı besiyeri içerisinde büyütülmüş ve QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit (Lot:151036440) kullanılarak aşağıdaki protokol uygun plazmit izolasyonu yapılmıştır.

1) Besiyerini uzaklaştırmak ve hücre pelletini elde etmek için kültür 50ml'lik steril falkona toplanmış ve 3550 xg 20 dakika 4°C'de santrifuj yapılmıştır.
2) Pellet 10ml Resuspansion Buffer P1 ile çözülmüş ve steril 50ml'lik Falkon tüpe alınmıştır.
3) Santrifüj tüpü içerisine 10ml Lysis Buffer P2 eklenmiş ve ters düz yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
4) İnkübasyon sonrasında falkon içerisine 10ml Neutralization Buffer P3 eklenmiş ve ters düz yapılmıştır.
5) Hazırlanan lizat kiti içerisinden çıkan QIA filter Maxi Cartridges filtreli kolon içerisine aktarılmıştır. Kolonun altında bulunan tıpa kapatılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır.
6) Süre bitiminde hücresel atıkların kolon üzerinde kalması sistemine dayanarak QIA Filter Plungers ile basınç uygulanarak lizat 50ml'lik steril falkon içerisine filtre edilmiştir.
7) Falkona toplanan filtrelenmiş lizat üzerine endotoksinlerin uzaklaştırılması için 2.5ml ER Buffer eklenmiş ve ters düz edilerek 30 dakika buz üzerine inkube edilmiştir.
8) Bekleme sırasında QIAGEN Tip filtreli kolon 10ml Equilibration Buffer QBT ile dengelenir.
9) Şartlanan kolona inkubasyonu biten lizat eklenmiştir. Yer çekimi kuvveti ile akanlar atılmış, plazmit DNA'sının kolona tutunması sağlanmıştır.
10) Hücre atıkların uzaklaştırılması için kolon 2 defa 30 ml QC Buffer ile yıkanmıştır.
11) Kolona tutunan plazmit DNA'sı 15ml Elute Buffer QN ile 50ml'lik steril falkona toplanmıştır.
12) Elute edilen örnek üzerine 10ml izopropanol eklenerek 15000 xg 30 dakika 4C'de santrifüj yapılmıştır.
13) Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmış ve DNA pellet olarak elde edilmiştir.
14) Pellet üzerine 5ml %70 Etil Alkol eklenmiş ve 15000 xg 10 dakika 4C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılmış ve DNA pellet olarak elde edilmiştir.

15) Elde edilen pellet uygun hacimde Endotoksin-free TE tampon ile süspanse edilmiştir. İzolasyon sonrası NanoDrop nükleik asit konstrasyon değeri 1824,8 ng/µl olarak ölçülmüştür.

3.4. Hücre Kültüründe Yapılan Çalışmalar

3.4.1. HEK293T TetR+ Hücre Hattının kültüre edilmesi

HEK293T TetR+ hücre hattı ThermoScientific firmasından temin edilmiş, laboratuvarımıza ulaşan hücreler aşağıda detayları verildiği şekilde çözülüp tavsiye edilen doğrultuda kültüre edilmiştir.

3.4.2. Hücrelerin Çözülmesi

Saklama alınan hücrelerin çözülmesi için sıvı azot tankından çıkarılan vial 37°C'deki su banyosunda %80'i çözülünceye kadar tutulmuştur. Sonrasında hızlı davranılarak önceden steril santrifüj tüpünde hazırlanmış %20 Tetrasiklin içermeyen FBS'li yüksek glukozlu (%4,5) DMEM besiyeri ile süspanse edilmiştir. Ardından hücreler 1500 xg'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra elde edilen hücre peleti önceden hazırlanmış olan besiyeri (%10 Tetrasiklin indüklenmiş FBS, 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin, 2 mM L-Glutamin, 5µg/ml Blastasidin içeren DMEM) ile çözülerek 100cm'lik hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Kültür kapları, 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona alınmıştır.

3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması

İnkübasyon süresince kültür kaplarında büyüyen hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıklarında 3 kat daha geniş alana geçilecek şekilde pasajlanmıştır. Bu işlem için hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1 ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyonu petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C'de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır. Süre sonunda hücreler 10ml PBS solüsyonu ile toplanarak steril santrifüj tüpüne alınmış ve 1500xg'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak elde edilen hücre peleti taze hazırlanan besiyeri ile süspanse edilip uygun yeni petri kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücreler 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO_2'li etüvde inkübasyona alınmıştır.

3.4.4. Hücrelerin Dondurulması

Devam çalışmalarda da kullanılabilmesi için pasajlamalar sırasında fazla olan hücreler stok oluşturulmak üzere yaklaşık %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında dondurulmuştur. İlk olarak %20 Tetrasiklin indirgenmiş FBS, %70 hücrelerin içerisinde büyüdükleri filtre edilmiş besiyeri, %10 DMSO içeren dondurma besiyeri hazırlanmış ve ardından dondurma işlemi

başlatılmıştır. Bu işlem için hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyon homojenize olacak şekilde petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C'de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır. Süre sonunda hücreler 10 ml PBS solüsyonu ile toplanarak steril falkon tüpe alınmış ve 1500rpm oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak elde edilen hücre pelleti hazırlanan dondurma besiyeri ile süspanse edilmiş ve kriyotüplere alınmıştır. Etiketlenen kriyotüpler uygun donma ortamının sağlanabilmesi için Mr. Frosty dondurma kabına (Thermoscientific, ABD) konarak bir gece boyunca -80 °C'de donmaya bırakılmış ve ertesi gün gerektiğinde kullanılmak üzere sıvı azot tankına aktarılmıştır.

3.4.5. Hücre Sayımı

Tripan mavisi hücre sayımı metodu, canlı hücrelerin yüksek molekül ağırlığına sahip olan tripan mavisi'ni (872,88 g/mol) (Sigma, Almanya) hücre içine almamaları esasına dayanılarak yapılmaktadır. Bu kapsamda boyayı içerisine almış olan hücreler ölü olarak sayılırken, boyayı dışlamış olan hücreler canlı olarak sayılmaktadır. Yapılan sayımlar sırasında Thoma Sayım Lamı kullanılmıştır. Sayım sahası içerisinde tercihen 30 kadar canlı hücre kalabilecek şekilde uygun dilüsyonların yapılması ve sayımların bu şekilde gerçekleştirilmesine özen gösterilmiştir. Sayım protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

1) Hücrelerin üzerindeki besi yeri steril bir falkon içerisinde toplandı.
2) Yüzeye tutunmuş haldeki hücreler, 2-5 ml kadar PBS (fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi) ile yıkandı.
3) 3. Yıkama amacı ile kullanılan PBS falkon tüp içerisine alındı.
4) Tutunma yüzeyini kaplayacak kadar Tripsin-EDTA (Gibco, ABD) eklendi ve kültür kabı 5 dakika kadar inkübasyona bırakıldı.
5) İnkübasyon sonunda tutunma yüzeyine iyice vurularak hücrelerin kalkması sağlandı.
6) Hücrelerin toplanması amacı ile kalkan hücreler üzerine 2-5 ml kadar PBS eklendi. Pipetle iyice vurularak hücreler toplandı ve yine aynı falkon tüp içerisine alındı.
7) 1500 xg'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi.
8) Üst sıvı atıldıktan sonra hücreler 250 µl taze besi yerinde iyice süspanse edildi.

9) Bu homojenattan sayım amacı ile 50 µl örnek alındı.

10) Alınan örnek, uygun dilüsyon oranında tripan mavisi ile karıştırıldıktan sayım yapıldı.

11) Sayım sırasında, boyayı dışlamış (canlı) olan hücreler ile boyayı almış (ölü) olan hücre sayıları not edildi.

12) Sayım sonucunda elde edilen hücre konsantrasyonunun hesaplanması amacı ile aşağıdaki formül kullanıldı:

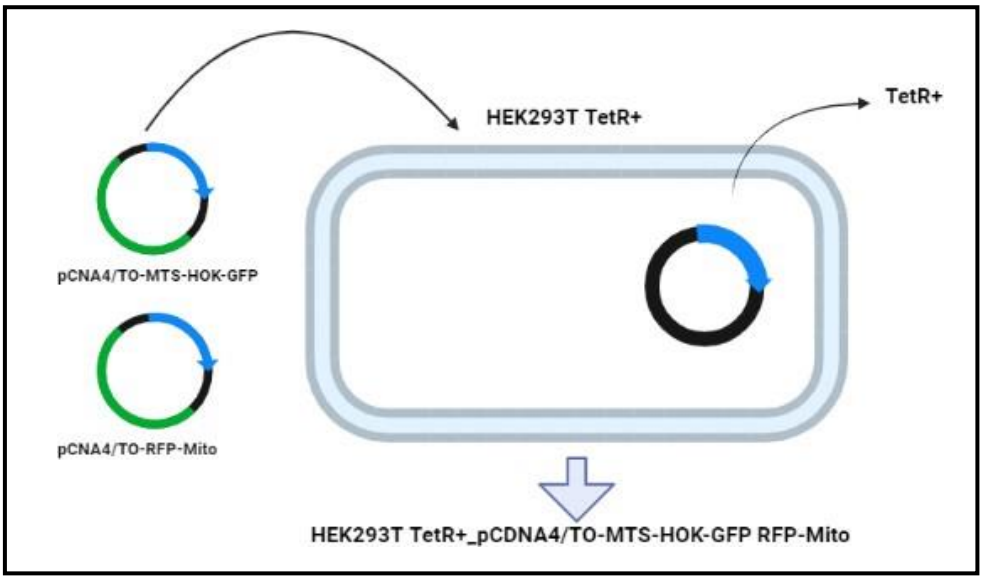
13) Mikroskop ile görüntülenerek canlı hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayısı hesaplanmıştır:

$$\text{1 ml'deki Hücre Sayısı} = \text{Thoma Lamı içerisindeki sayılan Hücre Sayısı} \times \text{Dilüsyon oranı} \times 10000$$

3.5. Hek293T TetR+ Hücre Hattına pcDNA4/TO-RFP-Mito ve pcDNA4/TO MTS-HOK-GFP Plazmitlerinin Co-Transfeksiyonu

Hek293T TetR+ hücreleri çözülüp birkaç pasaj geçirildikten sonra hücre yoğunluğu (%70) ve morfolojisinin uygun olduğu görülmüştür. RFP-Mito ve HOK-GFP proteinlerinin tetrasiklin altında kontrollü ekspresyonunu sağlayabilmek için hücreye Neon Tranfeksiyon Sistemi ve protokolü ile rekombinant plazmitin aktarımı gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyonun şematik gösterimi Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3. 4. Hek293T TetR+ hücre hattına HEK293T TetR+_pCDNA4/TO-MTS-HOK-GFP RFP-Mito plazmitinin transfeksiyon işleminin şematik gösterimi

Neon transfeksiyon işlem için aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

1) Uygun yoğunlukta ve morfolojide olan hücreler besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez PBS tamponu ile yıkanmıştır.
2) Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1 ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyon homojenize olacak şekilde petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C'de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır.
3) İnkübasyon sonrası Tripsin EDTA aktivitesi Tetrasiklin ile indirgenmiş FBS ile durdurularak hücreler sayımı yapılmıştır. Sonucunda 1.3x107 hücre/ml olacak şekilde hücre ayrı bir steril 15 ml'lik falkon tüpe alınmış ve 1500 xg oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak elde edilen hücre pelleti 2 kez PBS ile yıkanmıştır.
4) Yıkamaların ardından tekrar santrifüj sonrası elde edilen hücre pelleti 100 µl Resuspansiyon Buffer R tamponu ile çözülmüştür. Bu sırada pipet istasyonundaki Neon tüp içerisine 3ml Electrolytic Buffer E2 konulmuştur.
5) Steril axygen tüpte süspanse edilen hücreler üzerine hazırlanan uygun miktardaki (30-50ng) rekombinant plazmit DNA'sı eklenmiş ve yavaşça pipetaj yapılarak homojenize edilmiştir.
6) Neon tip pipete takılarak plazmit-hücre karışımı çekilmiş ve pipet istasyonuna oturtularak Hek293T hücreleri için uygun olan programda transfeksiyon gerçekleştirilmiştir.
7) Transfekte edilen hücreler önceden hazırlanmış antibiyotiksiz besiyeri (%10 Tetrasiklin indüklenmiş FBS, 2 mM L-Glutamin içeren DMEM) ortamına alınmış ve ekim yapılarak 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
8) Ertesi gün seçilimin sağlanabilmesi için besiyeri ortamına 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin, Blastasidin (5µg/ml) ve Zeosin (50µg/µl) eklenmiştir.

Transfekte edilen hücrelerin seçiliminin sağlanması için Blastasidin (5µg/ml) ve Zeosin (50µg/µl) hücre besiyeri ortamına eklenmiştir. Hücreler 37°C'deki nemlendirilmiş %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

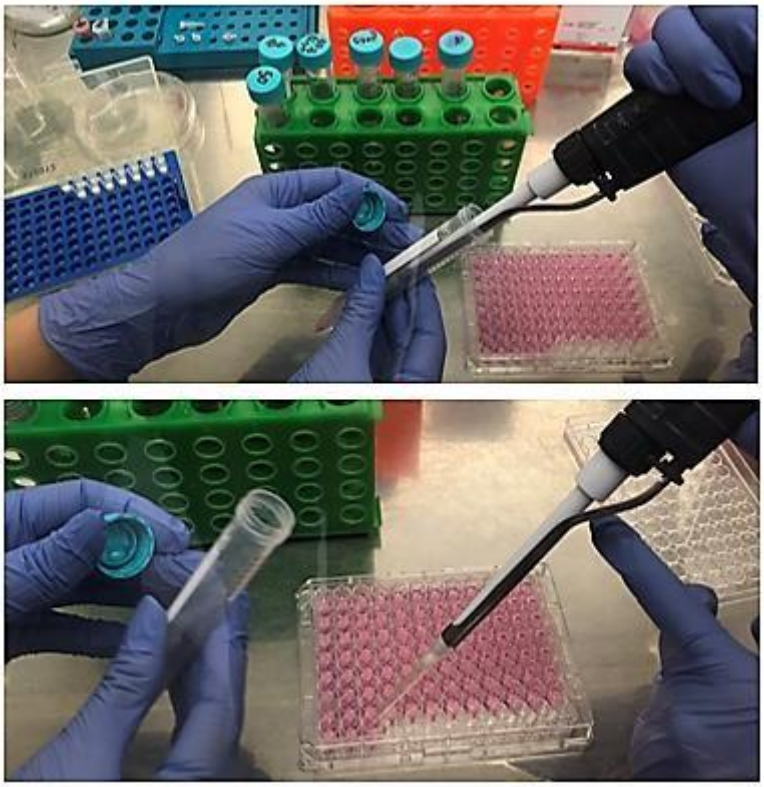
3.6. Tek koloni seçimi

Hücrelerin seçilimleri esnasında PBS ile yıkamalar ve besiyeri değişimleri yapılarak ölü hücreler kültür ortamında uzaklaştırılmıştır. Petri kabında kolonilerinin birbirleri ile tek koloni

seçilimi yapılmayacak kadar bağlantıda olduğu mikroskop ile görüntülenmiştir. Bu nedenle tek stabil koloniler elde etmek amacıyla Seri Dilüsyon Protokolü aşağıdaki aşamalar takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Şekil 3.6'da şematik gösterimi verilmiştir.

Tek koloni düşürmek için seri dilüsyon protokolü için aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

1) Kültür ortamından besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır.
2) Yüzeye tutunan hücrelerin kaldırılması için yaklaşık 1 ml Tripsin/EDTA (%0,05) solüsyon homojenize olacak şekilde petri yüzeyine eklenmiş ve 37°C'de 4 dakika süre ile inkübasyona alınmıştır. Süre sonunda hücreler 10 ml PBS solüsyonu ile toplanarak steril falkon tüpe alınmış ve 1500 xg oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir.
3) Üst sıvı atılarak elde edilen hücre pelleti 2 ml PBS ile süspanse edilmiştir. Ardından tripan blue boyası ile hücre sayımı yapılmıştır.
4) Ana stok için gerekli olan 100000 hücre/ml steril falkon tüpe alınarak 10 ml'ye taze besiyeri eklenerek tamamlanmıştır.
5) Ana stoktan 5 ml alınıp üzerine 5 ml taze besiyeri eklenerek 50000 hücre/ml elde edilmiştir.
6) Ardından 50000 hücre/ml içeren falkon tüpten 1 ml alınıp 9 ml taze besiyeri eklenerek 5000 hücre/ml elde edilmiştir.
7) Elde edilen 5000 hücre/ml içeren falkon tüpten 100 µl alınıp 9900 µl taze besiyeri eklenerek 50 hücre/ml elde edilmiştir. Bu oran ise 96-kuyucuklu petride 5 hücre/kuyu olacak şekilde hesaplanmış ve bir sonraki dilüsyon için gerekli miktar ayrılarak kalan hücreler 96-kuyucuklu petriye ekimi yapılmıştır. 37°C'deki %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
8) Son olarak 50 hücre/ml içeren falkon tüpten 1 ml alınıp 9ml taze besiyeri eklenerek 5 hücre/ml elde edilmiştir. Bu oran ise 96-kuyucuklu petride 0.5 hücre/kuyu olacak şekilde hesaplanmış ve 96-kuyucuklu petriye ekimi yapılmıştır. 37°C'deki %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5).
9) 5000 hücre/ml olan falkon tüpten 5 ml alınarak 100 mm boyutundaki petri kabına eklenmiştir. Oradan tekrardan 1 ml alınıp hacim 5 ml'ye tamamlanarak bu işlem 3 defa daha tekrarlanarak seyreltme işlemi tamamlanıp tekli koloni düşürme amaçlanmıştır. Petri kapları 37°C'deki %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

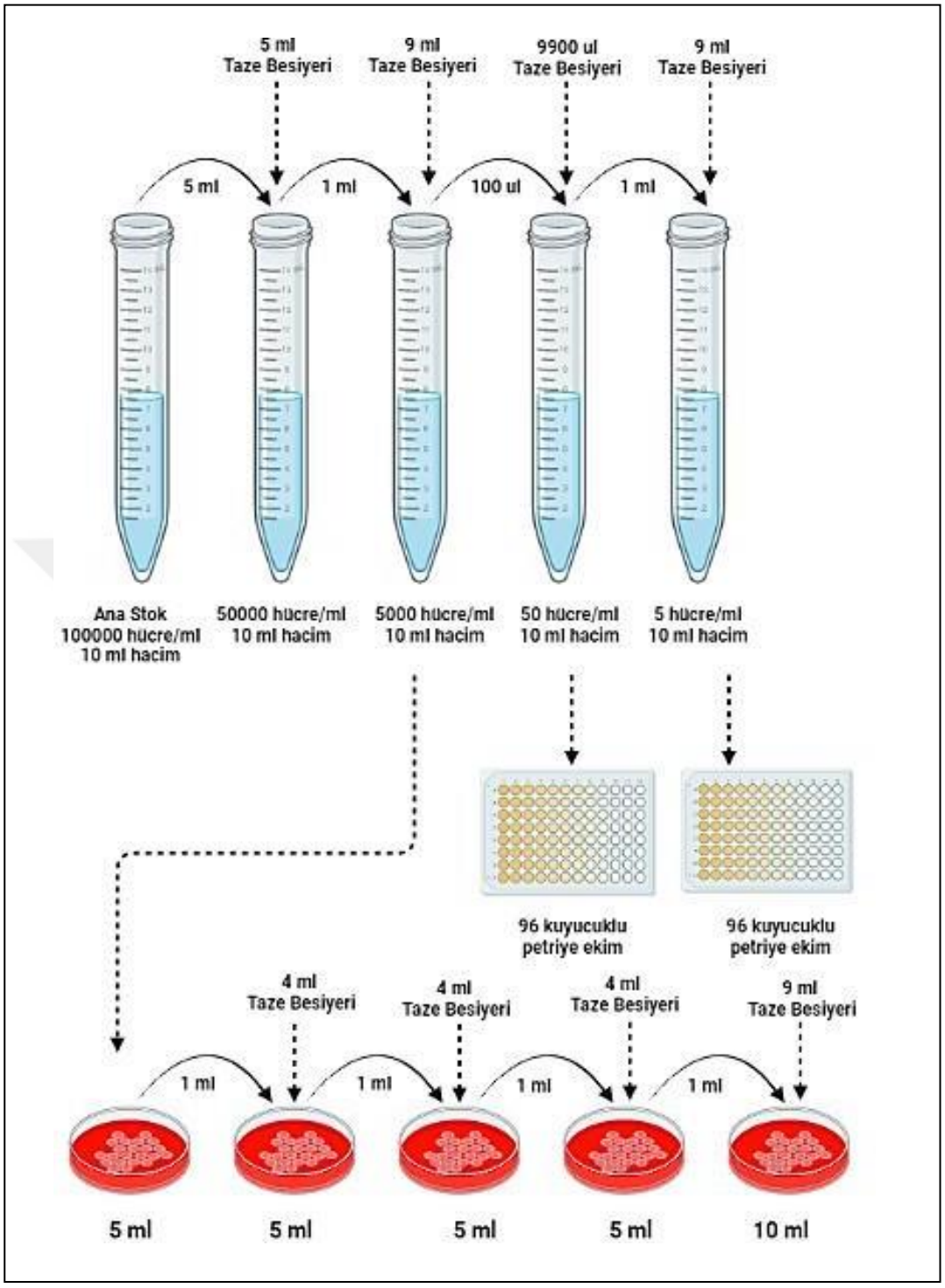


Şekil 3. 5. Seri dilüsyonları yapılan hücrelerin ilgili petrilere ekimlerinin yapılması

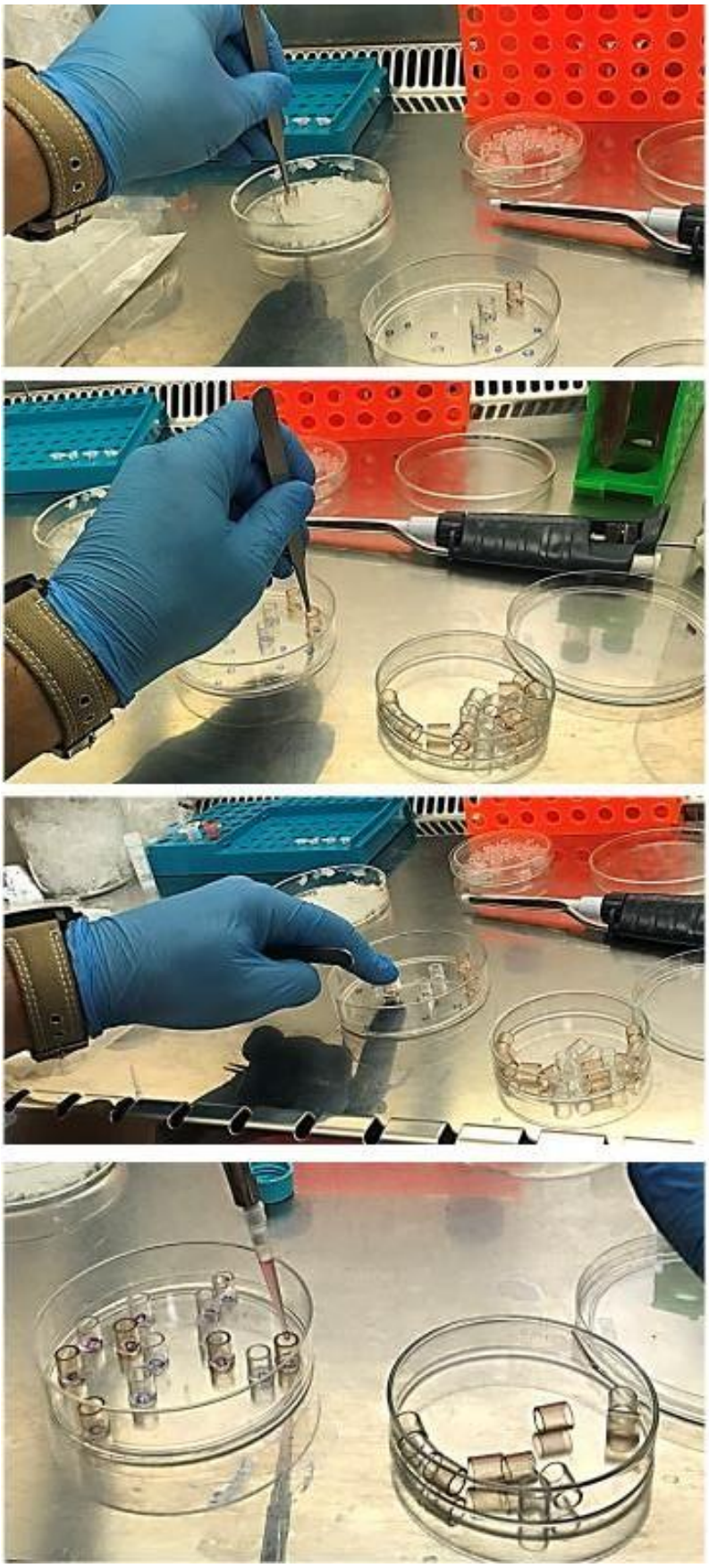
3.7. Koloni Toplama

Yapılan seri dilüsyon sonrası istenilen büyüklükte olan 100 mm'lik petri kabındaki koloniler monoklonal koloni oluşturması için cam silindir ile seçilerek 96 kuyucuklu petrilere ekim yapılmıştır. Cam silindir ile tekli koloni seçimi aşağıdaki gibi yapılmıştır.

1. 100 mm'lik petride tek tek büyüyen koloniler seçilmiş ve işaretlenmiştir.
2. Mineral yağı ile yapışkanlık kazanan cam silindirin ortasındaki boşluk işaretlenen kolonilerin tam üzerine gelecek şekilde petrinin zeminine oturtulmuştur.
3. Koloniler tripsinize edildikten sonra santrifüj yapılmadan 96 kuyucuklu petriye ekilmiştir (Şekil 3.7).
4. Petri kabı 37°C'deki %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

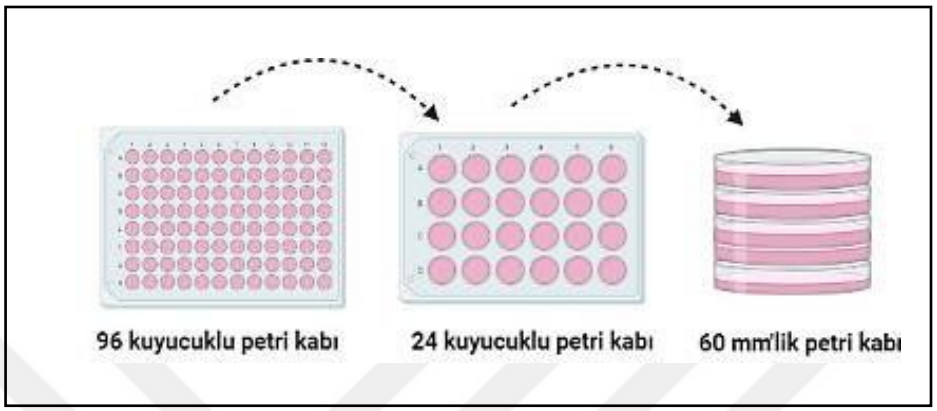


Şekil 3. 6. Tek koloni düşürmek için seri dilüsyon protokolü şematik gösterimi



Şekil 3. 7. Cam silindir ile koloni seçimi.

İnkübasyon sonrası yeterli büyüklüğe ulaşan koloniler işaretlenmiştir. İşaretlenen koloniler önce 24 kuyucuklu petriye daha sonra 60 mm'lik petrilere pasajlanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3. 8. Hücrelerin petri kaplarına pasajlanması

3.8. Seçilen Tek Kolonilerin Tetrasiklin ile İndüklenerek İmmün Floresan (IF) Mikroskopi ile Doğrulanması

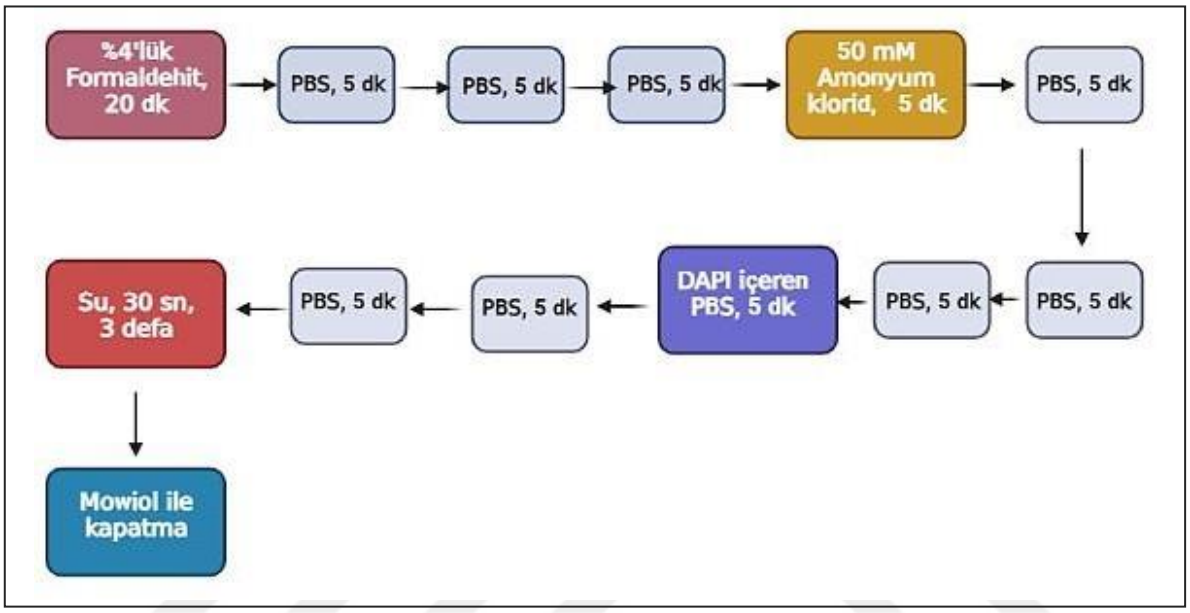
Yeterli büyüklüğe erişen 10 hücre kolonisi belirlendi ve Tetrasiklin (0.1mg/ml) ile 48 saat indüklenerek HOK ekspresyonu yapıp yapmadıkları test edildi.

HOK ekspresyonuna bağlı olarak meydan gelen değişiklikler IF Mikroskopi (Olympus CKX41) ile incelendi. Tarama sonucunda iki koloni belirlendi. Bu koloniler;

- HEK293T TetR+_pCDNA4/TO-MTS-HOK-GFP-RFP-Mito (Hem RFP hem de HOK-GFP ifade eden koloni)
- HEK293T TetR+_pCDNA4/TO-MTS-HOK-GFP olarak isimlendirildi (Sadece HOK-GFP ifade eden koloni).

Doğrulanan koloniler 100 mm boyutundaki kültür kaplarına pasajlandı. Zamana bağlı olarak mitokondriyal bozunumu görmek için belirli zaman aralıklarında (2 saat, 4 saat, 6 saat, 8 saat ve 10 saat) her bir zamanı temsil eden cam coverslip adı verilen yuvarlak steril cam lameller petri kabının içlerine beşer adet konuldu.

Hücreler çoğalma sırasında bu coverslipler üzerinde yeterli büyüklüğe ulaştığında her bir Tetrasiklin (0.1mg/ml) eklenerek kontrollü ekspresyon başlatılmış oldu. Belirlenen zaman dilimlerinde kültür ortamından steril şartlar altında birer coverslip alınarak. Floresan boyama protokolü kullanılarak Şekil 3.9'da gösterildiği ve aşağıda tarif edildiği gibi boyamalar gerçekleştirildi.



Şekil 3. 9. İmmünfloresan boyama protokolüne ait akış şeması.

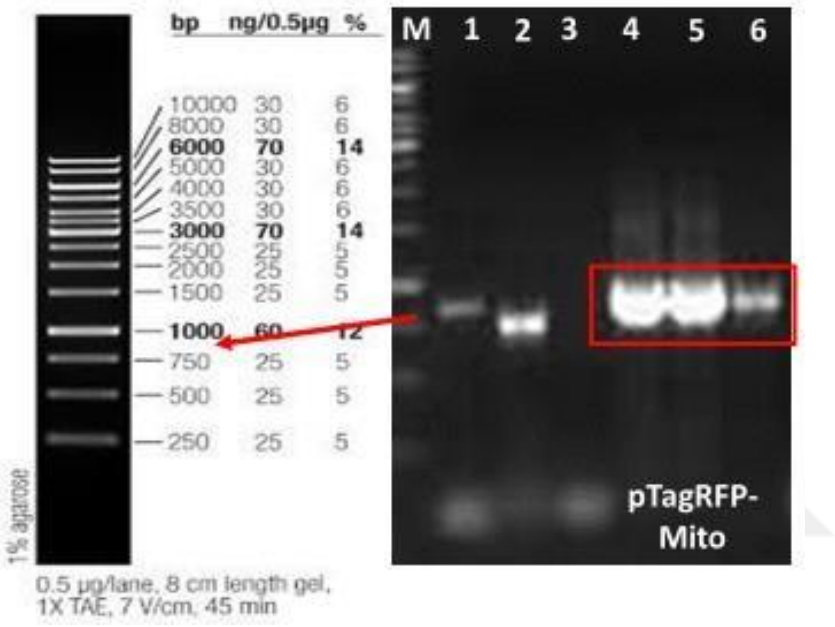
1. İlk olarak coverslipler üzerinde çoğalan hücreler 20 dakika boyunca %3'lük formaldehit ile fikse edildi.
2. Fiksasyonu takiben üç kez PBS ile yıkanan hücreler, oluşan radikal oksijen türlerinin baskılanması için 50 mM amonyum klorür çözeltisinde 5 dakika bekletildi, ardından PBS ile yıkandı.
3. Çekirdek boyaması amacı ile hücreler 10 dakika boyunca DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile boyandı.
4. Son olarak, önce PBS ardından saf su ile yıkanan hücreler Mowiol aracılığı ile mikroskop lamına yapıştırıldı.
5. Uygun filtereler kullanılarak Olympus CKX41 mikroskobu ile çekilen resimler sayesinde mitokondiyal bozunumun gerçekleşme adımları zamana bağlı olarak görüntülendi.

Görüntülerde mitokondriyal bozunum hangi zaman diliminde başlayıp bittiği tespit edildi.

BULGULAR

4.1. pTag-RFP-Mito Plazmitinin PCR ile Çoğaltılması

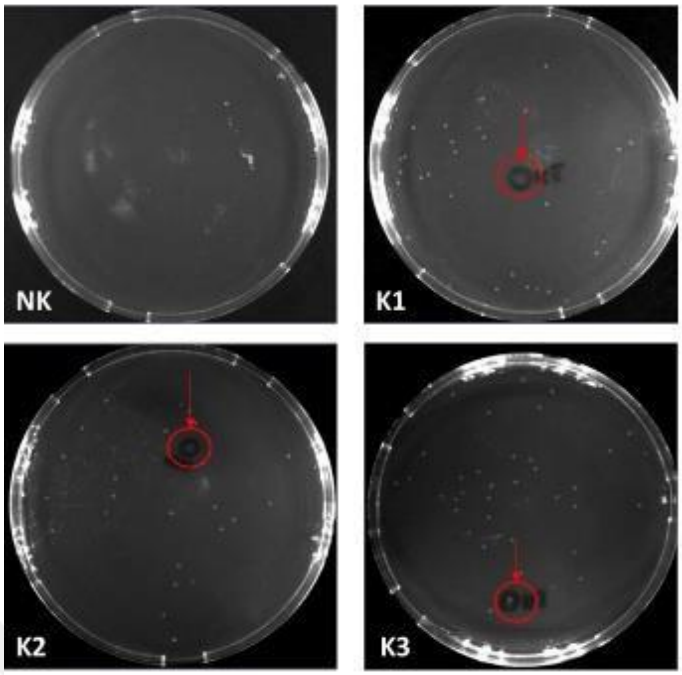
Laboratuvar envanterimizde bulunan pTag-RFP-Mito plazmitinden 835 baz çiftine sahip RFP gen dizisi forward primeri-HindIII ve reverse primeri-EcoR1 kesim bölgeleri içerecek şekilde Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile çoğaltılmıştır. HindIII ve EcoR1 restriksiyon enzimleri kullanılarak hedeflenilen gen bölgesi %1 agaroz jelde yürütülmüş ve yapılan analizler sonucunda istenilen bölgede doğru boyutlarda PCR ürünü olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1. pTag-RFP-Mito plazmitinden RFP gen dizisi PCR ile çoğaltılıp Etidyum Bromür içeren agaroz jellerde doğrulaması (M-marker, 1-Negatif Kontrol, 2-Pozitif Kontrol, 3-PCR ürünü, 4-PCR ürünü,5- PCR ürünü,6- PCR ürünü).

4.2. Transformasyon Sonrası Koloni Seçimi

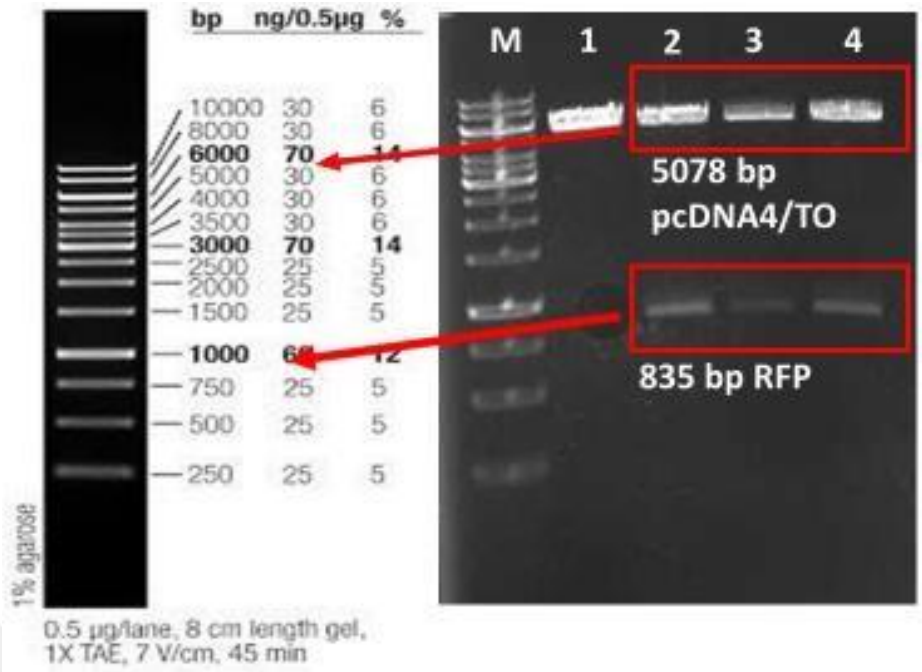
pCDNA+/TO-RFP-Mito ligasyonundan sonra elde edilen üründen uygun hacimde alınarak elektroporasyon ile E.coli XL1Blue elektrokompotent hücrelerine aktarımı yapılmıştır. LB Agar katı besiyeri ortamına ekilen hücrelerin seçiliminin yapılabilmesi için besi yerine 50µg/mL ampisilin eklendi. Gece boyu 37°C etüvde koloni oluşumu için hücreler bırakıldı (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. pCDNA4/TO-RFP-Mito rekombinant plazmidini taşıyan E.coli XL1Blue hücrelerine aktarımı yapılmış olup büyüyen kolonilerin seçilmesi (NK: Negatif Kontrol, K1: Koloni 1, K2: Koloni 2, K3:Koloni 3).

4.3. Hücrelerin Çoğaltımı ve Ligasyon ürününün doğrulanması

Şekil 5.2'de gösterilen pCDNA4/TO-RFP-Mito rekombinant plazmidini taşıyan E. coli XL1Blue kolonilerinden seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitlerin istenilen gen parçasını taşıyıp taşımadığını anlayabilmek amacıyla plazmitler HindIII ve EcoRI enzimleri ile ikili kesilerek kesim ürünleri %1 agaroz jellerde yürütülmüş ve yapılan analizler sonucu, plazmitlerdeki gen bölgelerinin doğru boyutlarda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).



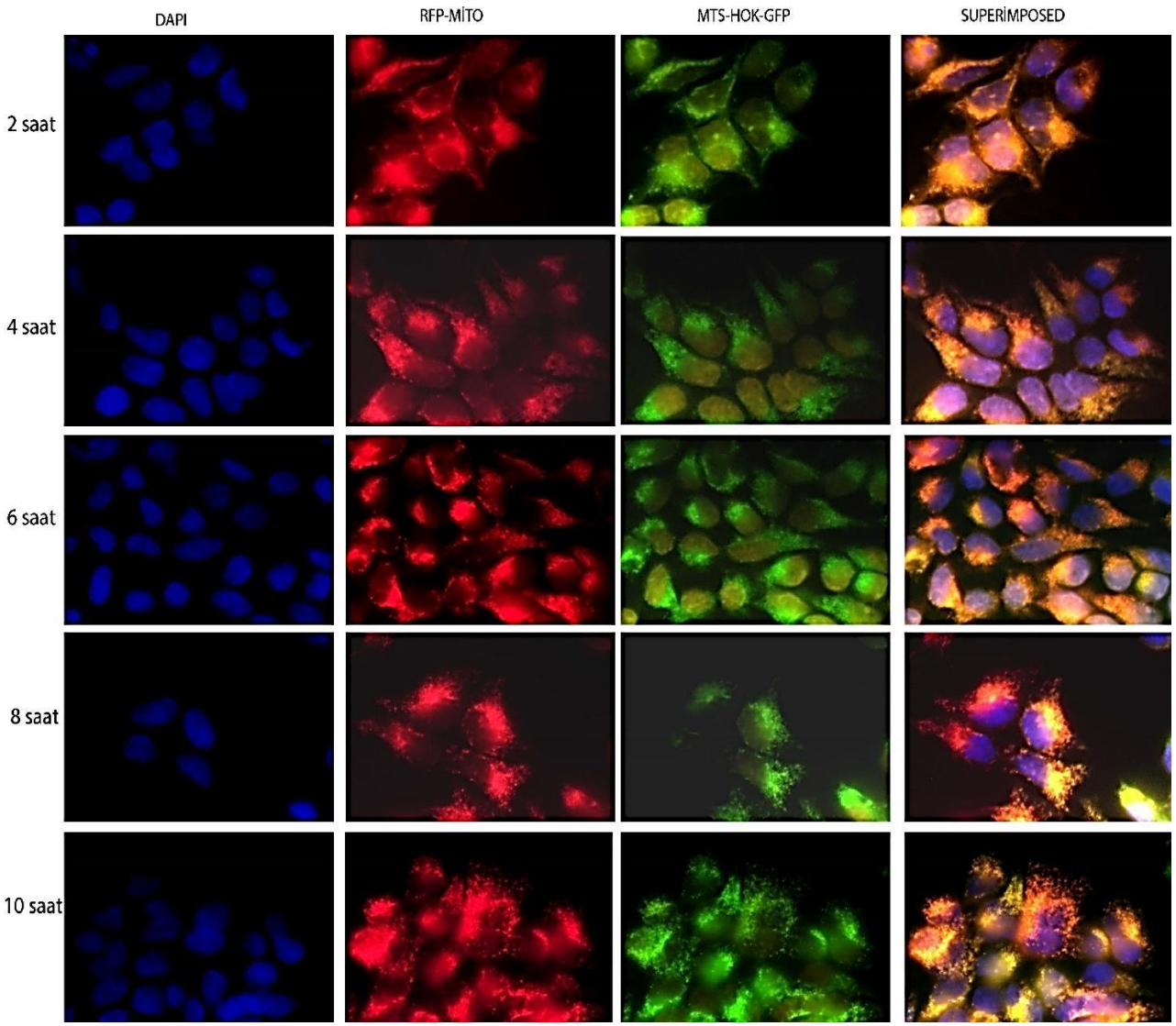
Şekil 4. 3. Agaroz jel elektroforezi ile rekombinant plazmitlerden kesilerek ayrıştırılan RFP-Mito gen bölgesinin gösterilmesi (M-Marker, 1-Kesilmemiş pCDNA4/TO plazmiti, 2-Koloni 1, 3- Koloni 2, 4-Koloni 3).

Klonlama işleminin sonrasında deneylerde kullanılmak üzere gerekli olan plazmit stokları, maxiprep (Qiagen) kitleri kullanılarak hazırlandı.

4.4. Tek Kolonilerin Tetrasiklin ile İndüklenerek İmmün Floresan Mikroskopi ile Doğrulanması, Analiz Edilmesi

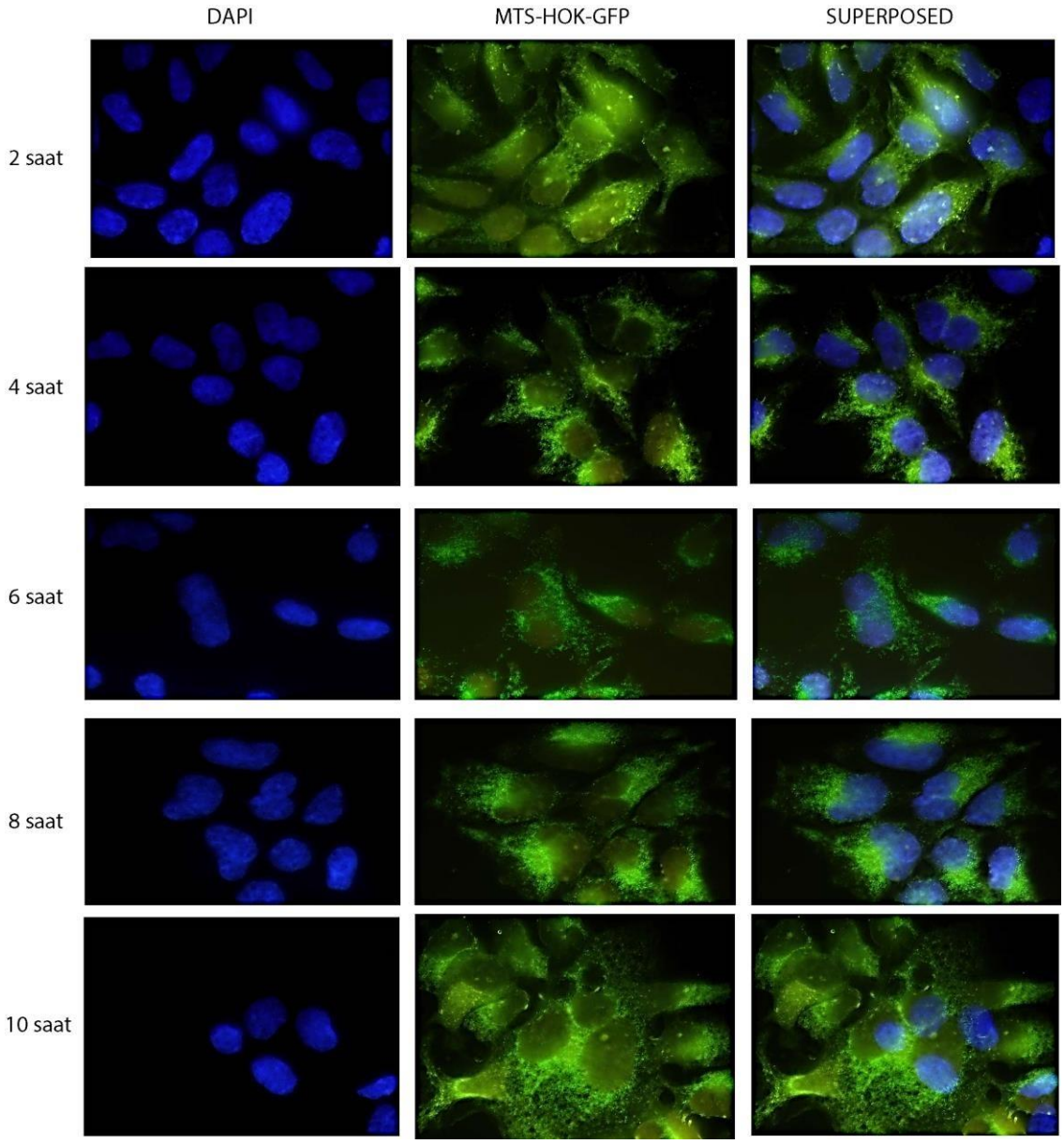
Alt-klonlamalar sonucunda elde edilen pCDNA4/TO-RFP-Mito ve pCDNA4/TO-MTS-HOK-GFP plazmid vektörleri metot kısmında anlatıldığı şekilde HEK-293T-TetR+ hücrelerine transfekte edilmiş ve RFP-Mito ve MTS-HOK-GFP proteinlerini birlikte ifade eden veya sadece MTS-HOK-GFP proteinini ifade eden monoklonal hücreler elde edilmiştir.

Oluşturulan monoklonal hücre hatlarında protein sentezini indükleyebilmek için hücre kültürü besi ortamına *tetrasiklin* (0.1mg/ml) ilavesi yapılmıştır. Tetrasiklin indüksiyonu sonrasında; MTS-HOK-GFP ve RFP-Mito proteinlerini birlikte eksprese veya sadece MTS-HOK-GFP proteinini ifade eden Hek293T-TetR+ hücrelerinin zamana bağlı morfolojik değişimleri immünfloresan mikroskopi çalışmaları ile izlenmiştir. Elde edilen veriler HOK proteininin hücre içerisinde ifade edildiğinde mitokondriye yönlendirildiğini göstermiştir (Şekil 4.4). Ayrıca mitokondri iç zarına yerleşen HOK proteininin mitokondride fragmantasyona neden olduğunu ve mitofajiye neden olabildiğini göstermiştir.



Şekil 4. 4. Mitokondri defragmantasyonunun ve mitofaji benzeri dağılımın HOK ifadesi sonrası HEK293T-TetR+ hücrelerde immünfloresan mikroskopi yardımı ile gösterilmesi. DAPI: çekirdek boyaması, RFP-Mito: Mitokondri iç zarının RFP-floresan proteini ile işaretlenmesi, MTS-HOK-GFP: GFP işaretli HOK proteininin mitokondri iç zarına yerleşmesi, Süperposed: RFP-Mito proteini ile MTS-HOK-GFP proteinlerine ait resimlerin üst üste çakıştırılması ile elde edilen imaj (ko-lokalizasyon)

RFP protein ifadesinin HOK-protein ifadesini etkileme ihtimali göz önüne alınarak, HOK-GFP proteinini yalnız başına ifade monoklonal HEK-293T-TetR+ hücre hattı da tez kapsamında oluşturulmuştur. Bu hücre hattı ile de zamana bağlı HOK dağılımı takip edilmiş ve bu dağılımında mitofajide görülen mitokondri dağılımına benzer bir dağılım gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. Mitokondri defragmantasyonunun ve mitofaji benzeri dağılımın HOK ifadesi sonrası HEK293T-TetR+ hücrelerde immünfloresan mikroskopi yardımı ile gösterilmesi. DAPI: çekirdek boyaması, MTS-HOK-GFP: GFP işaretli HOK proteininin mitokondri iç zarına yerleşmesi, Süperposed: DAPI ve MTS-HOK-GFP proteinlerine ait resimlerin üst üste çakıştırılması ile elde edilen imaj

5. TARTIŞMA

Biyolojik sistemleri taklit etmede kullanılan belli başlı modeller vardır. Bu modeller arasında hücre kültürü modelleri ve hayvan modelleri en sık kullanılanlardandır. Her model bilimsel açıdan bir takım avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Hayvan modelleri *in vivo* ortamdaki değişiklikleri yansıtmasına rağmen genetik açıdan insan ile uyumsuzluk taşımaktadır. Hayvan modelleri kullanılarak elde edilen verilerin birebir insana uyarlanması mümkün değildir. Hücre modellerinde ise insan kökenli hücreleri kullanmak her ne kadar mümkün olsa dahi hücrenin kültüre edildiği ortam *in vivo* ortamdan çok farklı bir ortam olduğundan elde edilen verilerin yorumlanması dikkatle yapılmalıdır (Yao ve Asayama, 2017). Hastalıkların patofizyolojileri çalışılırken doğrudan insan biyolojik materyalinin kullanılması en doğru yaklaşım olacaktır. Ancak hem etik zorluklar hem de bazı hastalıklarda insan materyaline ulaşımdaki zorluklar nedeni ile bu yaklaşım ile deneysel çalışmalar yapmak kolay değildir. Ayrıca insan çalışmalarında kişiden kişiye görülen farklılıkların deney sonuçlarını etkilemesi de muhtemel dezavantajlar arasında sayılabilir.

Nörodejeneratif hastalıklar çalışılırken insana ait beyin dokusuna ulaşmak oldukça zor olduğu için çalışmaların genellikle hayvan ve hücre modellerinde yapıldığı görülmektedir. Özellikle Parkinson hastalığının patofizyolojisini anlamada bu modellerden çok ciddi anlamda yararlanılmıştır. Tüm bu çalışmalar mitofaji adı verilen ve doğal ortamda gerçekleştiğine inanılan bir hücresel olayın beyinde nöron ölümüne neden olduğuna işaret etmektedir. Bilim adamları mitofaji olayını taklit etmek için hem hayvan hem de hücre kültürü modelleri geliştirmişlerdir (Kasap ve ark., 2016). Bu modellerin geliştirilmesine dair bazı bilgiler tezin giriş kısmında detaylı bir şekilde bahsedilmiştir. Bu modellerde bir takım kimyasal ajanlardan faydalanılmıştır. Bu ajanlar arasında en sık kullanılanları CCCP ve FCCP'dir. Bu iki molekül hücrelerin bulunduğu ortama eklendiğinde hücre zarından geçmekte ve hücre içerisinde özellikle mitokondride depolarizasyona neden olmaktadır. Bilim adamları CCCP/FCCP aracılığı ile gerçekleşen polarizasyonun doğal ortamda gerçekleşen mitokondriyal bozunum ile benzerlikler taşıyabileceğinden yola çıkarak bugün literatürde açıklanan PINK1-PARKİN bağımlı mitofaji mekanizmasını ileri sürmüşlerdir (Narendra ve ark., 2008). Ancak bu mekanizmanın *in vivo* ortamda gerçekleşmekte olduğuna dair doğrudan bir delil sunulmadığı gibi aksi delilleri de literatürde bulmak mümkündür. Ayrıca bu kimyasal ajanların mitokondri üzerindeki etkisinin akut olması ve hücredeki etkilerinin sadece mitokondri ile sınırlı

kalmaması da kullanılan modelin doğruluğu konusunda şüpheler uyandırmaktadır. Bu sebeple doğal mitofaji sürecini taklit eden, akut olmayan ve hücre içerisindeki diğer organellere zarar vermeyen ve sadece mitokondriyi etkileyen bir modele ihtiyaç vardır. Bu tez çalışması kapsamında böyle bir modelin geliştirildiğine dair önemli ön veriler elde edilmiştir.

Tez kapsamında mitokondri iç zarında porlar oluşturulmak istenmiş ve bu amaçla bakteriyel bir toksin olan HOK proteini seçilmiştir. HOK proteini bazı bakteri türlerinde savunma mekanizmasının bir parçası olarak sentezlenmekte ve düşman bakterinin dış zarında porlar açarak o bakterilerin ölümüne sebep olmaktadır (Gerdes ve Wagner, 2007). Projemizin kurgusunda küçük bir protein olan HOK'un mitokondri iç zarına yönlendirilmesi sonucu iç zarda delik açıp açmayacağı sorgulanmak istenmiş, yapılan modelleme çalışmalarında bu durumun mümkün olabileceği görülmüş ve bu hipotezi test etmek için TUBİTAK'a proje yazılarak destek alınmıştır (Proje No:220S017). Tez çalışması öncesinde HOK proteinini kodlayan gen Eurofins firmasında insan kodon kullanım sıklığı dikkate alınarak ve kodon optimizasyonu yapılarak sentezlenmiş, sonrasında bu genin C-ucuna GFP geni eklenmiştir. Elde edilen gen HEK293T-TetR+ hücrelere transfekte edilerek geni ifade eden monoklonal bir hücre hattı geliştirilmiştir. Sonrasında bu hücrelere RFP genini ifade eden ve mitokondri iç zarına yönlendiren ikinci bir vektör aktarılmış ve aktarım sonrasında hem RFP hem de HOK-GFP proteinlerini ifade edebilen monoklonal bir hücre hattı oluşturulmuştur. HOK'un toksik bir protein olma gerçeğinden yola çıkılarak oluşturulan monoklonal hücre hatlarını HOK toksisitesinden koruyabilmek için gen ifadelerinin indüklenebilir bir sistem ile yapılması sağlanmıştır. Bu amaçla Tet-ON sistemi adı verilen bir sistem kullanılmıştır.

Tez kapsamında yapılan deneylerde, özellikle immünfloresan mikroskopi yardımı ile mitokondri morfolojisindeki değişim gözlemlenmeye çalışılmıştır. Literatürde CCCP/FCCP ile indüklenen mitofaji modellerinde kısa bir süre içerisinde mitokondri tübüler yapısını kaybederek noktasal bir yapıya bürünmektedir. Mitokondri morfolojisindeki bu değişimin Parkin ve PINK1 proteinleri yardımı ile oluştuğu ileri sürülmüştür (Narendra ve ark., 2008). Tez kapsamında yapılan deneylerde HOK ekspresyonu sonrasında benzer bir mitokondri dağılımı görülmüş, mitokondrinin tübüler yapısını kaybederek noktasal bir yapıya büründüğü saptanmıştır. Mitokondri morfolojisindeki değişimin HOK ifadesi ile doğrudan ilişkili olduğunu görebilmek için yapılan zamana bağımlı HOK ifade deneylerinde hücre içerisinde artan HOK miktarı ile mitokondri parçalanma düzeyi arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu görülmüştür. Hücrelerin 2 saatlik HOK ifadesinden sonra mitokondri morfolojisinde bozulma yaşandığı, 4 saat HOK ifadesinden sonra bu bozunumun belirginleşmeye başladığı ve 6 saat HOK ifadesi sonrasında keskinleştiği görülmüştür. Sekiz ya da 10 saatlik HOK ifadesi

mitokondri morfolojisini tamamen bozmakta ve mitokondri dağılımını değiştirmektedir. Elde edilen tüm bu veriler geliştirilen modelin literatürde bahsi geçen ve kimyasal ajanlar ile indüklenen mitofaji modellerine benzer bir şekilde ilerlediğini göstermektedir. Geliştirdiğimiz modelin literatürde sunulan ve kimyasal ajanlarla indüklenen akut modellere olan üstünlüğü kısaca iki cümle ile özetlenebilir.

1. Geliştirilen modelde sadece mitokondriye hasar verilmekte hücrenin diğer organellerinin integritesi korunmaktadır.
2. Model akut bir model olmayıp, zamana ve indüktörün konsantrasyonuna bağımlı olarak etkisi azaltılıp artırılabilmektedir. Bu da *in vivo* ortamda yavaş bir şekilde gerçekleşen fizyolojik durumu taklit edebilme adına önemlidir.

Sonuç olarak, geliştirilen HOK-bağımlı mitofaji modeli mitofajiyi yansıtma adına oldukça değerli olabilecek bir kapasitede olup, mitofaji çalışmalarına yeni bir yaklaşım getirmiştir.

6. ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan deneyler, öncül deneyler olup yalnızca mitofaji oluşumunu destekleyen morfolojik veriler sunmaktadır. Görülen morfolojik değişimlerin moleküler düzeyde nasıl gerçekleştiğine dair verilerin elde edilmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle aşağıdaki sorulara cevap veren çalışmaların tasarlanması gerekmektedir. Bu bağlamda bu soruların bazılarına laboratuvarımızda TUBİTAK 1001 projesi kapsamında cevap aranmaktadır.

1. HOK-bağımlı mitofaji Parkin-PINK1 yolağı üzerinden mi işlemektedir?
2. Hücre morfolojisindeki değişim gen ve protein ifadelerini nasıl etkilemektedir?
3. Diğer hücresel organeller üzerine HOK ifadesinin etkisi var mıdır?
4.HOK ifadesi hücre ölümünü tetiklemekte midir?
5. HOK-bağımlı mitofaji geri dönüştürülebilir mi?
6. Tetrasiklin konsantrasyonu düşürülerek mitofajinin süresi uzatılabilir mi? Bu durumda modelin nörodejeneratif hastalıkları taklit etme özelliği artar mı?
7. HOK indüksiyonunun neden olduğu mitofajinin kinetiği belirlenebilir mi?

Bu sorulara verilecek cevaplar geliştirilen modelin literatürle ne kadar uyumlu ve gerçeği yansıtıp yansıtmadığını gösterecektir.

7. ÖZGEÇMİŞ

8. KAYNAKLAR

Akpinar, G., Kasap, M., Canturk, N. Z., Zulfigarova, M., Islek, E. E., Guler, S. A., ... & Canturk, Z. (2017). Proteomics analysis of tissue samples reveals changes in mitochondrial protein levels in parathyroid hyperplasia over adenoma. *Cancer Genomics & Proteomics*, *14*(3), 197-211.

Allen, G. F., Toth, R., James, J., & Ganley, I. G. (2013). Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO reports*, *14*(12), 1127-1135.

Allen, N. E., Schwarzel, A. K., & Canning, C. G. (2013). Recurrent falls in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinson's disease*, *2013*.

ASHFORD, T. P., & PORTER, K. R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *The Journal of cell biology*, *12*(1), 198–202. https://doi.org/10.1083/jcb.12.1.198

Barsoum, M. J., Yuan, H., Gerencser, A. A., Liot, G., Kushnareva, Y., Gräber, S., ... & Bossy-Wetzel, E. (2006). Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *The EMBO journal*, *25*(16), 3900-3911.

Branca J., Pacini, A., Gulisano, M., Taddei, N., Fiorillo, C., Becatti, M. (2020). Cadmium-Induced Cytotoxicity: Effects on Mitochondrial Electron Transport Chain. Front. Cell Dev. Biol., 30 November 2020. Volume 8 - 2020 | https://doi.org/10.3389/fcell.2020.604377

Brantl, S. (2012). Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA biology*, *9*(12), 1488-1490.

Burman, J. L., Pickles, S., Wang, C., Sekine, S., Vargas, J. N. S., Zhang, Z., ... & Youle, R. J. (2017). Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *Journal of Cell Biology*, *216*(10), 3231-3247.

Cai, Q., Davis, M. L., & Sheng, Z. H. (2011). Regulation of axonal mitochondrial transport and its impact on synaptic transmission. *Neuroscience research*, *70*(1), 9-15.

Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(12), 7877-7882.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*(5148), 802-805.

Deas, E., Wood, N. W., & Plun-Favreau, H. (2011). Mitophagy and Parkinson's disease: the PINK1–parkin link. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1813*(4), 623-633.

Deng,H. , Dodson M. W. , Huang H. , and Guo, M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila (2008) . https://doi.org/10.1073/pnas.080399810

Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., ... & Meinitzer, A. & Madeo, F.(2016). Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nature Medicine*, *22*(12), 1428-1438.

Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A. *et al.* Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* **11**, 1305–1314 (2009). https://doi.org/10.1038/ncb1975

Elmore, SP., Qian, T., Grissom, SF., Lemasters, J., (2001). The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. The Faseb Journal. Volume15, Issue12 October 2001 Pages 1-17. https://doi.org/10.1096/fj.01-0206fje

Fletcher, M. A. R. Y., Kelly, S. P., Part, P., O'Donnell, M. J., & Wood, C. M. (2000). Transport properties of cultured branchial epithelia from freshwater rainbow trout: a novel preparation with mitochondria-rich cells. *Journal of Experimental Biology*, *203*(10), 1523-1537.

García-Villalba, R., Giménez-Bastida, J. A., Ávila-Gálvez, M. A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., & González-Sarrías, A. (2020). Ellagitannins and Their Gut Microbiota-Derived Metabolites: Urolithins. *Dietary Polyphenols: Their Metabolism and Health Effects*, 319-364.

Gatliff, J., East, D., Crosby, J., Abeti, R., Harvey, R., Craigen, W., ... & Campanella, M. (2014). TSPO interacts with VDAC1 and triggers a ROS-mediated inhibition of mitochondrial quality control. *Autophagy*, *10*(12), 2279-2296.

Georgakopoulos, N. D., Wells, G., & Campanella, M. (2017). The pharmacological regulation of cellular mitophagy. *Nature chemical biology*, *13*(2), 136-146.

Gerdes, K., & Wagner, E. G. H. (2007). RNA antitoxins. *Current opinion in microbiology*, *10*(2), 117-124.

Gerdes, K., Bech, F. W., Jørgensen, S. T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P. B., Atlung, T., ... & Von Meyenburg, K. (1986). Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon. *The EMBO journal*, *5*(8), 2023-2029.

Gomez-Lazaro, M., Bonekamp, N. A., Galindo, M. F., Jordán, J., & Schrader, M. (2008). 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*(11), 1960-1969.

Hamacher-Brady, A., & Brady, N. R. (2016). Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cellular and molecular life sciences*, *73*, 775-795.

Hamacher-Brady, A., & Brady, N. R. (2016). Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cellular and molecular life sciences*, *73*, 775-795.

Kasap, M., Akpinar, G., & Kanli, A. (2017). Proteomic studies associated with Parkinson's disease. *Expert Review of Proteomics*, *14*(3), 193-209.

Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. (2012). HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature Reviews Cancer*, *12*(1), 9-22.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, *392*(6676), 605–608. https://doi.org/10.1038/33416

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032–1036 (2004). https://doi.org/10.1038/nature03029

Lemasters J. J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research*, *8*(1), 3–5. https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.3

Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A., & Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et biophysica acta*, *1366*(1-2), 177–196. https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00112-1

Lin, M., Beal, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795 (2006). https://doi.org/10.1038/nature05292

Lou, G., Palikaras, K., Lautrup, S., Scheibye-Knudsen, M., Tavernarakis, N., & Fang, E. F. (2020). Mitophagy and neuroprotection. *Trends in molecular medicine*, *26*(1), 8-20.

Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2018). Novel insights into the anti-aging role of mitophagy. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *340*, 169-208.

Martinez, T. N., & Greenamyre, J. T. (2012). Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling*, *16*(9), 920–934. https://doi.org/10.1089/ars.2011.4033

Martinez, T. N., & Greenamyre, J. T. (2012). Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxidants & redox signaling*, *16*(9), 920–934. https://doi.org/10.1089/ars.2011.4033

Mouton-Liger, F., Jacoupy, M., Corvol, J. C., & Corti, O. (2017). PINK1/Parkin-dependent mitochondrial surveillance: from pleiotropy to Parkinson's disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, *10*, 120.

Nagano, Y., Matsui, H., Muramatsu, M., Shimokawa, O., Shibahara, T., Yanaka, A., ... & Nakamura, Y. (2005). Rebamipide significantly inhibits indomethacin-induced mitochondrial damage, lipid peroxidation, and apoptosis in gastric epithelial RGM-1 cells. *Digestive diseases and sciences*, *50*, S76.

Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., ... & Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology*, *8*(1), e1000298.

Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., ... & Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology*, *8*(1), e1000298.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D., Youle, RJ., (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophag. *J Cell Biol* 1 December 2008; 183 (5): 795–803. doi: https://doi.org/10.1083/jcb.200809125

Ordureau, A., Paulo, J. A., Zhang, W., Ahfeldt, T., Zhang, J., Cohn, E. F., ... & Harper, J. W. (2018). Dynamics of PARKIN-dependent mitochondrial ubiquitylation in induced neurons and model systems revealed by digital snapshot proteomics. *Molecular cell*, *70*(2), 211-227.

Page, R., & Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature chemical biology*, *12*(4), 208-214.

Pedersen, K., & Gerdes, K. (1999). Multiple hok genes on the chromosome of Escherichia coli. *Molecular microbiology*, *32*(5), 1090-1102.

Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Current Biology*, *28*(4), R170-R185.

Poole, A. C., Thomas, R. E., Andrews, L. A., McBride, H. M., Whitworth, A. J., & Pallanck, L. J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(5), 1638-1643.

Qi, Yongmei ve ark. "ATM, insan fibroblastlarında PINK1 ve Parkin düzenlemesi yoluyla spermidin kaynaklı mitofajiye aracılık eder." *Bilimsel raporlar* 6.1 (2016): 1-11. DOI: 10.1038/srep24700

Rodriguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R. T., & Lemasters, J. J. (2006). Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy*, *2*(1), 39–46. https://doi.org/10.4161/auto.2229

Rodríguez-Hernández, Á., Cordero, M. D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., ... & Sánchez-Alcázar, J. A. (2009). Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy*, *5*(1), 19-32.

Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P. A., Katsyuba, E., & Moullan, N. Nicolet-Dit-Fé lix AA, Williams EG, Jha P, Lo Sasso G, Huzard D, Aebischer P, Sandi C, Rinsch C, Auwerx J. 2016. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in C. Elegans and increases muscle function in rodents. *Nature Medicine*, *22*, 879-888.

Seibler, P., Graziotto, J., Jeong, H., Simunovic, F., Klein, C., & Krainc, D. (2011). Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *Journal of Neuroscience*, *31*(16), 5970-5976.

Sekine, S., & Youle, R. J. (2018). PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC biology*, *16*, 1-12.

Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of cellular and comparative physiology*, *59*(3), 223-239.

Sun, L., Zhao, M., Yang, Y., Xue, R. Q., Yu, X. J., Liu, J. K., & Zang, W. J. (2016). Acetylcholine attenuates hypoxia/reoxygenation injury by inducing mitophagy through PINK1/Parkin signal pathway in H9c2 cells. *Journal of Cellular Physiology*, *231*(5), 1171-1181.

Suomalainen, A., Battersby, B. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 77–92 (2018). https://doi.org/10.1038/nrm.2017.66

Thisted, T., & Gerdes, K. (1992). Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1: Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene. *Journal of molecular biology*, *223*(1), 41-54.

Tolkovsky A. M. (2009). Mitophagy. *Biochimica et biophysica acta*, *1793*(9), 1508–1515. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.03.002

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E. and Shirihai, O.S. (2008), Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. The EMBO Journal, 27: 433 446. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963

Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile genetic elements*, *3*(5), e26219.

Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile genetic elements*, *3*(5), e26219.

Van Laar, V. S., Arnold, B., Cassady, S. J., Chu, C. T., Burton, E. A., & Berman, S. B. (2011). Bioenergetics of neurons inhibit the translocation response of Parkin following rapid mitochondrial depolarization. *Human molecular genetics*, *20*(5), 927-940.

Whitworth, A. J., & Pallanck, L. J. (2017). PINK1/Parkin mitophagy and neurodegeneration—what do we really know in vivo?. *Current opinion in genetics & development*, *44*, 47-53.

Wu, W., Tian, W., Hu, Z., Chen, G., Huang, L., Li, W., ... & Feng, D. (2014). ULK 1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC 1 to regulate mitophagy. *EMBO reports*, *15*(5), 566-575.

Xiong, N., Jia, M., Chen, C., Xiong, J., Zhang, Z., Huang, J., ... & Wang, T. (2011). Potential autophagy enhancers attenuate rotenone-induced toxicity in SH-SY5Y. *Neuroscience*, *199*, 292-302.Lin, M., Beal, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795 (2006). https://doi.org/10.1038/nature05292

Xue, L., Fletcher, G. C., & Tolkovsky, A. M. (2001). Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Current Biology*, *11*(5), 361-365.

Yang, Y. R., Lee, Y. Y., Cheng, S. J., Lin, P. Y., & Wang, R. Y. (2008). Relationships between gait and dynamic balance in early Parkinson's disease. *Gait & posture*, *27*(4), 611-615.

Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive medicine and biology*, *16*(2), 99-117.

Zhu, G., Wang, X., Wu, S., & Li, Q. (2012). Involvement of activation of PI3K/Akt pathway in the protective effects of puerarin against MPP+-induced human neuroblastoma SH-SY5Y cell death. *Neurochemistry international*, *60*(4), 400-408.