

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

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'DE MİKROTÜBÜL
STABİLİTESİNDEKİ AZALMANIN SMN PROTEİNİ
TRANSPORTUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Pelin ZOBAROĞLU ÖZER

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2026

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

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'DE MİKROTÜBÜL
STABİLİTESİNDEKİ AZALMANIN SMN PROTEİNİ
TRANSPORTUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Pelin ZOBAROĞLU-ÖZER

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Gamze BORA AKOĞLU**

**ANKARA
2026**

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'DE MİKROTÜBÜL STABİLİTESİNDEKİ AZALMANIN SMN
PROTEİNİ TRANSPORTUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRIŞMASI**

Pelin Zobaroğlu Özer

Danışman: Doç. Dr. Gamze Bora Akoğlu

Bu tez çalışması 22.06.2026 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Programı"
nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Yusuf Çetin Kocaefe*
(Hacettepe Üniversitesi/Tıbbi Biyoloji ABD)
- Üye:** *Prof. Dr. Hayat Yurter*
(Hacettepe Üniversitesi/Tıbbi Biyoloji ABD)
- Üye:** *Prof. Dr. Çağdaş Devrim Son*
(Ortadoğu Teknik Üniversitesi/ Biyolojik Bilimler Bölümü)
- Üye:** *Prof. Dr. Vildan Gökner Holiloğlu*
(Hacettepe Üniversitesi/ Çocuk Hastalıkları ABD)
- Üye:** *Doç. Dr. Dilara Fatma Akın*
(Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi/ Tıbbi Biyoloji ABD)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

29 Haziran 2026

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

29/06/2026

Pelin ZOBAROĞLU ÖZER

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

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

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

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

Pelin ZOBAROĞLU ÖZER

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi, deneyim ve rehberliğiyle akademik gelişimime katkı sağlayan; danışmanım Doç. Dr. Gamze Bora Akoğlu'na;

Tez çalışmamın her aşamasında değerli görüş, öneri ve yapıcı eleştirileriyle çalışmama önemli katkılar sağlayan tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Hayat Yurter'e ve Prof. Dr. Çağdaş Devrim Son'a;

Tez savunma sınavımda değerli jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Yusuf Çetin Kocaefe'ye, Prof. Dr. Vildan Göknur Haliloğlu'na ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Dilara Fatma Akın'a;

Hayatım boyunca sevgileri, sonsuz destekleri ve fedakârlıklarıyla her zaman yanımda olan, bana inanan ve her koşulda güç veren canım anneme, babama ve ablama;

Bu uzun ve zorlu doktora yolculuğu boyunca sevgisi, sabrı ve anlayışıyla her zaman yanımda olan, en stresli anlarımda moralimi yükselten ve bana olan inancını kaybetmeyen sevgili eşim Uğur Özer'e;

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarının farklı kısımları, TÜBİTAK ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından sağlanan desteklerle gerçekleştirilmiştir (TÜBİTAK Proje No: 125S253,121S884; BAP Proje No: TDK-2023-20618, THD-2024-21259).

ÖZET

Zobaroğlu Özer, P., Spinal Müsküler Atrofi'de Mikrotübül Stabilitesindeki Azalmanın SMN Proteini Transportuna Etkisinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2026. Spinal müsküler atrofi (SMA), nadir nörodejeneratif hastalıklardan biri olup, işlevsel SMN proteininin eksikliği sonucu ortaya çıkan ilerleyici kas kaybı ve atrofi ile karakterizedir. Anabilim Dalı'mızda gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, SMN eksikliğinde mikrotübüllerle ilişkili proteinlerin ifadelerinde değişiklikler saptanmış; ayrıca alfa (α) tübülün detirozinasyonunun ve mikrotübül stabilitesinin azaldığı gösterilmiştir. Mikrotübüller, hücrelerde hareket ile ilgili süreçlerde görev alan temel iskelet elemanıdır. Bu nedenle, SMN eksikliğinde saptadığımız mikrotübül stabilite kaybının, SMN'nin transportunu etkileyebileceği düşünülmüş ve mikrotübül stabilitesinin artırılması yoluyla, hücre içinde farklı kompartmanlarda bulunan ayrıca hücre dışına da salgılanabilen SMN'nin transportunun düzenlenebileceği hipotezi kurulmuştur. Tez kapsamında, *in vitro* nöronal SMA modelinde, siRNA-aracılı gen ifadesi baskılama yaklaşımı kullanılarak mikrotübül stabilite belirteci olan α -tübülün detirozinasyonu artırılmış; bu hücrelerde çekirdek, sitoplazma ve stres granüllerinde bulunan, ayrıca hücre dışına salgılanan SMN'nin yerleşimi/düzeyi Western blot ve kantitatif mikroskobik yöntemlerle araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda α -tübülün detirozinasyonundaki artışın SMN'nin sitoplazmadaki yerleşimini ve hücre dışına salgılanmasını etkilediği belirlenmiştir. SMN yerleşiminin, hücre gövdesinden nörit ucuna doğru değiştiği, ekstraselüler ortamdaki SMN miktarının ise arttığı gösterilmiştir. Saptanan değişikliklerin mekanizmasının açıklanabilmesi amacıyla *in silico* analizler gerçekleştirilmiş; kinezin-1 ailesinden KIF5C aday motor protein olarak belirlenerek *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür. Tez çalışmaları sonucunda, α -tübülün detirozinasyonunun SMN yerleşimi ve salgılanması açısından önemli bir modifikasyon olduğu ve SMN transportunda KIF5C'nin rolü olabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Spinal müsküler atrofi, SMN, mikrotübül, TTL, KIF5C.

Tez çalışmalarının farklı kısımları, TÜBİTAK ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından sağlanan desteklerle gerçekleştirilmiştir (TÜBİTAK Proje No: 125S253,121S884; BAP Proje No: TDK-2023-20618, THD-2024-21259).

ABSTRACT

Zobaroğlu Özer, P., Investigation of the Effect of Decreased Microtubule Stability on SMN Protein Transport in Spinal Muscular Atrophy, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Ph.D. Thesis of Medical Biology, Ankara, 2026. Spinal Muscular Atrophy is one of the rare neurodegenerative diseases and is characterized by progressive muscle weakness and atrophy due to degeneration of alpha motor neurons in the spinal cord. In our department, alterations in the expression of microtubule-associated proteins were identified under SMN-deficient conditions. Furthermore, decreased α -tubulin detyrosination and reduced microtubule stability were demonstrated. Microtubules are fundamental cytoskeletal components involved in motility-related processes. Therefore, we hypothesized that the loss of microtubule stability observed in SMN deficiency could impair SMN transport, and that increasing microtubule stability might regulate the transport of SMN, which is localized in different intracellular compartments and can also be secreted. In this thesis, α -tubulin detyrosination, a marker of microtubule stability, was increased in an *in vitro* neuronal SMA model using an siRNA-mediated gene silencing approach. The localization/levels of SMN in the nucleus, cytoplasm, and stress granules, as well as its extracellular level, were investigated by Western blotting and quantitative microscopic analyses. The results demonstrated that increased detyrosination affected both the cytoplasmic localization and extracellular level of SMN. Specifically, SMN localization was shown to be decreased in the cell body, whereas it was increased in the neurite terminals. Extracellular SMN level was also found to be increased. To elucidate the underlying mechanism of these alterations, *in silico* analyses were performed, identifying KIF5C, a member of the kinesin-1 family, as a candidate motor protein, which was subsequently investigated through *in vitro* studies. Overall, the findings of this thesis demonstrate that α -tubulin detyrosination is an important modification regulating SMN localization and secretion, and suggest that KIF5C may play a role in SMN transport.

Keywords: Spinal muscular atrophy, SMN, microtubule, TTL, KIF5C.

This thesis was partially supported by the The Scientific and Technological Research Council of Türkiye and the Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (TÜBİTAK Project No: 125S253,121S884; BAP Project No: TDK-2023-20618, THD-2024-21259)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikrotübül İskeleti: Yapısı, Organizasyonu ve İşlevi	4
2.1.1. Tübülün Post-Translasyonel Modifikasyonları	6
2.1.2. α -tübülünün Tirozinasyon/Detirozinasyon Döngüsü	8
2.1.3. Mikrotübül assosiye Proteinler	11
2.1.4. Motor Proteinler	12
2.1.5. KIF5C Motor Proteini: Yapısı ve Hücresel Fonksiyonları	15
2.2. Spinal Müsküler Atrofi (SMA)	16
2.2.1. SMA Hastalığının Moleküler Genetik Özellikleri	17
2.2.2. SMN Proteininin Yapısı, Fonksiyonları ve Hücresel Lokalizasyonları	19
2.2.3. SMN Eksikliğinde Mikrotübül İskeleti ile İlişkili Hatalar	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Hücre Kültürü	27
3.1.2. siRNA Transfeksiyonu ile Gen İfadesinin Baskılanması	28
3.1.3. Hücre İçi Stres Granülü Oluşturulması	29
3.1.4. Hücre İçi Protein İzolasyonu	29
3.1.5. Hücre Dışı Protein İzolasyonu	29
3.1.6. Protein Konsantrasyon Tayini	29
3.1.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	29

3.1.8. Western Blot	31
3.1.9. İmmünfloresan Boyama	33
3.1.10. Kantitatif Mikroskopik Analizler	35
3.1.11. <i>In silico</i> Protein-Protein Etkileşim Analizleri	35
3.1.12. İstatistiksel Analizler	35
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Hücre Kültürü	36
3.2.2. siRNA Transfeksiyonu ile Gen İfadesinin Baskılanması	37
3.2.3. Hücre İçi Stres Granülü Oluşturulması	39
3.2.4. Hücre İçi Protein İzolasyonu	40
3.2.5. Hücre Dışı Protein İzolasyonu	40
3.2.6. Protein Konsantrasyon Tayini	41
3.2.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	42
3.2.8. Western Blot	43
3.2.9. İmmünfloresan Boyama	44
3.2.10. Kantitatif Mikroskopik Analizler	46
3.2.11. <i>In silico</i> Protein-Protein Etkileşimi Analizleri	49
3.2.12. Deneysel Sonuçların İstatistiksel Analizi ve Değerlendirilmesi	50
4. BULGULAR	51
4.1. <i>In vitro</i> SMA Modelinde α -Tübülün Detirozinasyonunun Arttırılması	51
4.1.1. NSC34 Hücrelerinde TTL Gen İfadesi Baskılama Koşullarının Belirlenmesi	51
4.1.2. <i>In vitro</i> SMA Modelinde TTL Gen İfadesinin Baskılanması ve α -Tübülün Detirozinasyonu Düzeyinin Analizi	53
4.1.3. TTL Gen İfadesi Baskılanan <i>In vitro</i> SMA Modelinde Nörit Uzunluk Analizi	54
4.2. α -Tübülün Detirozinasyonu Arttırılan <i>In Vitro</i> SMA Modelinde SMN Proteininin Hücre İçi Yerleşiminin Araştırılması	55
4.2.1. SMN'nin Çekirdekte Cajal Cisimcikler ile Eş-Yerleşiminin Analizi	56
4.2.2. SMN'nin Sitoplazmik Yerleşiminin Analizi	58
4.2.3. SMN'nin Stres Granüllerindeki Yerleşiminin Analizi	60
4.3. α -Tübülün Detirozinasyonu Arttırılan Hücrelerde SMN Proteininin Hücre Dışına	

Salgılanma Düzeyinin Araştırılması	63
4.4. SMN Transportundan Sorumlu Olabilecek Aday Motor Proteinin Araştırılması	65
4.4.1. SMN Proteini İle Etkileşim Potansiyeli Bulunan Motor Proteinlerin Biyoinformatik Analizlerle Belirlenmesi	65
4.4.2. <i>In vitro</i> SMA Modelinde KIF5C Protein Düzeyinin Analizi	67
4.4.3. NSC34 Hücrelerinde KIF5C Gen İfadesi Baskılama Koşullarının Belirlenmesi	67
4.4.4. KIF5C Gen İfadesindeki Baskılamanın Hücre İçi SMN Protein Düzeyine Etkisinin Analizi	70
4.4.5. KIF5C Gen İfadesi Baskılanan Hücrelerde SMN'nin Sitoplazmik Yerleşiminin Analizi	71
4.4.6. KIF5C Gen İfadesi Baskılanan Hücrelerde SMN Proteininin Hücre Dışı Salgılanma Düzeyinin Araştırılması	73
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	82
6.1. Sonuçlar	82
6.2. Öneriler	85
7. KAYNAKLAR	87
8. EKLER	97
EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-2. Tez Çalışması Dijital Makbuz	
EK-3. Uniprot Veritabanından Elde Edilen Fare (<i>Mus musculus</i>) Motor Protein Listesi	
9. ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER ve KISALTMALAR

-TIP	Mikrotübül negatif uç proteinleri
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
+TIP	Mikrotübül pozitif uç proteinleri
AAV	Adeno-ilışkili virüs
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Sığır serum albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CO₂	Karbondioksit
dH₂O	Distile su
Dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EB1	End binding protein 1
FBS	Fetal dana serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
g	Gram
GDP	Guanozin difosfat
GTP	Guanozin trifosfat
HDAC	Histon deasetilaz
HRP	Horseradish peroksidaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
MAP	Mikrotübül asosiye protein
MAP1B	Mikrotübül asosiye protein 1B
ml	Mililitre
MTOC	Microtubule organizing center
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Tuzlu fosfat serumu
PFA	Paraformaldehit
PTM	Post translasyonel modifikasyon

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SIRT	Sirtuin
siRNA	Short interfering RNA
SMA	Spinal müsküler atrofi
SMN	Survival motor neuron
SMN1	Survival of motor neuron 1
SMN2	Survival of motor neuron 2
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline–Tween 20
TTL	Tübülin tirozin ligaz
WB	Western Blot
α-tübülin	Alfa tübülin
β-tübülin	Beta tübülin
γ-tübülin	Gama tübülin
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mikrotübüllerde polimerizasyon, depolimerizasyon, yıkım ve kurtarma süreçlerinin şematik gösterimi.	5
2.2. Tübülün izotipleri ve post-translasyonel modifikasyonlarının (PTM'ler) şematik gösterimi.	8
2.3. α -tübülün proteinlerinin tirozinasyon-detirozinasyon döngüsünün şematik gösterimi.	9
2.4. Mikrotübül assosiyasyon proteinlerinin şematik gösterimi.	12
2.5. (A) Memeli kinezin süperailisini gösteren filogenetik ağaç. (B) Kinezin proteinleri ve domainlerinin şematik gösterimleri.	14
2.6. Sağlıklı ve hasta bireylerde <i>SMN1</i> ve <i>SMN2</i> gen yapılarını karşılaştıran şematik gösterimi.	19
2.7. SMN proteininin domainlerinin, karşılık gelen ekzonların ve post-translasyonel modifikasyonlarının şematik gösterimi.	21
2.8. SMN proteinin hücre içerisindeki yerleşimi ve işlevlerinin şematik gösterimi.	24
3.1. NSC34 hücrelerinde, hücre gövdesi ile nörit büyüme ucunda sabit alanlarda gerçekleştirilen floresan yoğunluk analizi örnek fotoğraf.	48
4.1. NSC34 hücrelerinde TTL gen ifadesi baskılama koşullarının belirlenmesi kapsamında gerçekleştirilen Western blot çalışmalarına ait sonuçlar.	52
4.2. SMN ve TTL gen ifadelerinin baskılanması amacıyla siRNA transfeksiyonu yapılan NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve α -tübülün detirozinasyon düzeyleri.	54
4.3. SMN, TTL ve eş-baskılama yapılan NSC34 hücrelerinde nörit uzunluk analizleri.	55
4.4. NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve eş baskılama (SMN + TTL) koşullarının çekirdekdeki SMN protein lokalizasyonu üzerine etkisi.	57
4.5. NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve eş baskılama (SMN + TTL) koşullarının sitoplazmik SMN proteini yerleşimi üzerine etkisi.	59
4.6. NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve eş baskılama (SMN + TTL) koşullarının SMN'in stres granüllerindeki lokalizasyonu üzerine etkisi.	63

4.7. NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve eş baskılama (SMN + TTL) koşullarının hücre dışına salgılanan SMN proteini düzeyine etkisi.	64
4.8. SMN proteini ile etkileşim potansiyeline sahip motor proteinlerin biyoinformatik analizler ile belirlenmesi.	66
4.9. <i>In vitro</i> SMA modelinde KIF5C düzeyinin analizi. SMN siRNA ve kontrol amacıyla <i>scrambled</i> siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerdeki görüntüler.	67
4.10. NSC34 hücrelerinde KIF5C gen ifadesinin baskılama koşullarının belirlenmesi.	69
4.11. KIF5C gen ifadesi baskılanan NSC34 hücrelerinde SMN düzeyinin analizi.	70
4.12. NSC34 hücrelerinde KIF5C baskılamasının SMN proteininin yerleşimi üzerindeki etkisi.	72
4.13. NSC34 hücrelerinde, KIF5C baskılanmasının hücre dışına salgılanan SMN proteini düzeyine etkisi.	73

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. SMA tiplerinin başlangıç yaşı, yaşam süresi, <i>SMN2</i> kopya sayısı ve motor gelişim basamaklarına göre karşılaştırılması.	18
3.1. Protein konsantrasyon ölçümünde standart eğri çizimi için kullanılan BSA konsantrasyonları.	42

1. GİRİŞ

Hücre iskeletinin en büyük ve dinamik elemanı olan mikrotübüller, hücre morfolojisinin korunması, hücre içinde organellerin ve biyomoleküllerin transportunun gerçekleştirilmesi ve hücre bölünmesi sırasında kromozomların hareketinin sağlanmasında görev alan filamentlerdir. Alfa (α) ve beta (β) tübülün heterodimerlerinin bir araya gelmesi ile oluşan mikrotübüller, polimerizasyon ile uzayan, depolimerizasyon ile kısalan, içi boş, silindirik yapılardır. Stabil ve dinamik kısımları bulunan mikrotübüllerin yapısal düzenlenmesinde, mikrotübüle bağlanan asosiye proteinler ve tübülün proteinlerinde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlar görev almaktadır. Tübülün modifikasyonları stabil ve dinamik mikrotübüllerde farklı olarak gerçekleşebilmekte olup stabil mikrotübüllerde sık görülen modifikasyonlardan biri detirozinasyondur. C-terminalinde tirozin amino asiti bulunan α -tübülün proteinleri mikrotübül yapısına katıldıktan sonra kesime uğramakta ve tirozin protein yapısından çıkartılmaktadır. Detirozinasyon olarak adlandırılan bu süreç geri dönüşümlü olabilmekte; mikrotübül depolimerize olduktan sonra tirozin amino asiti tübülün tirozin lıgaz (TTL) enzimi tarafından α -tübüline tekrar takılmaktadır. Tirozinasyon/detirozinasyon döngüsü olarak bilinen bu düzenlenme, mikrotübül asosiye proteinlerden bazılarının mikrotübül ile etkileşiminde önemli rol üstlenmektedir. Bu proteinler arasında motor proteinler yer almaktadır.

Motor proteinler, mikrotübül-aracılı hücre içi transportta görev almakta ve kargoların (örn. organel, vezikül, protein) mikrotübül üzerinde farklı hücresel kompartmanlara taşınmasını sağlamaktadır. Dinein ve kinezin olmak üzere iki aileden oluşan motor proteinler, kargolarını hücre içerisinde farklı yönlerde taşıyabilmektedir. Dinein motor proteinleri mikrotübülün negatif ucu yönündeki (retrograd) transportta, kinezin proteinleri ise genellikle pozitif ucu yönündeki (anterograd) transportta görev almaktadır. Mikrotübüller üzerinde her iki yönde gerçekleşen motor protein aracılı transport, özellikle nöronların yapısı ve işlevleri açısından elzemdir. Mikrotübül yapısındaki değişiklikler ve hücre içi transport hataları nörodejeneratif hastalıkların patomekanizmaları arasında yer almaktadır. Mikrotübül iskeletinde değişiklik saptanan nörodejeneratif hastalıklardan biri, nadir hastalıklar grubunda yer alan Spinal müsküler atrofi (SMA)'dir. SMA, *Survival of motor neuron*

1 (*SMN1*) genindeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkmakta ve bu genden sentezlenen SMN proteini işlev gösterememektedir. Tüm hücrelerde sentezlenen SMN proteininin eksikliğinden en fazla motor nöronlar etkilenmekte olup akson ve dendrit uzaması, dallanması ve aksonal transportta hatalar olduğu bilinmekte; bu bulgular hücre iskeleti elemanlarının yapısal ve fonksiyonel bozukluklarıyla ilişkilendirilmektedir.

Literatürde SMA hastalığında mikrotübül iskeletinin araştırıldığı az sayıda çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalarda, SMA hastalık modellerinde mikrotübül yapısında ve mikrotübül ile ilişkili proteinlerin (örn. Tau, Statmin) ifade/post-translasyonel modifikasyonlarında değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Anabilim Dalı'mızda gerçekleştirilen bir çalışmada, *in vitro* nöronal SMA modelinde, α -tübülün tirozinasyonundan sorumlu TTL proteininde artış saptanmış; α -tübülün detirozinasyonunun ve mikrotübül stabilitesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu değişikliklerin hücresel transport mekanizmalarını etkilemesi olası görülmüş; farklı hücresel kompartmanlarda bulunan SMN'nin transportunun da mikrotübüllerle ilişkili değişikliklerden etkilenebileceği düşünülmüştür. SMN proteini nöronlarda çekirdekte, somada, akson ve aksonların uçlarındaki büyüme bölgelerinde bulunmakta, ayrıca hücre dışına da salgılanmaktadır. Yaygın hücre içi yerleşimi ve hücre dışına salgılanması nedeniyle SMA'da saptadığımız mikrotübül stabilite kaybının, hücrelerde az miktarda bulunan işlevsel SMN proteininin transportunu, yerleşimini ve dolayısıyla işlevlerini etkilemesi olası görülmüş; bu tez çalışmasında, SMN eksikliğinde görülen mikrotübül stabilite kaybının düzeltilmesi ile SMN proteininin transportunun ve yerleşiminin değişebileceği hipotezi kurulmuştur. Tez çalışmasında, daha önce SMN eksikliğinde mikrotübül stabilitesinin azaldığını gösterdiğimiz *in vitro* model olan motor nöron benzeri NSC34 hücre hattı kullanılmış; bu hücrelerde stabil mikrotübül belirteci olan α -tübülün detirozinasyon düzeyi artırılarak SMN'nin hücre içi yerleşimi ve hücre dışına salgılanma düzeyi araştırılmıştır. SMN yerleşiminde ve salgılanmasında saptanan değişikliklerin mekanistik olarak açıklanması amacıyla *in silico* analizler gerçekleştirilmiş; SMN transportundan sorumlu olabilecek aday motor protein olarak KIF5C belirlenmiş ve *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

Hücre iskeleti, ökaryotik hücrelere şeklini veren, hücre içi organizasyonu sağlayan, makromoleküllerin ve organellerin hücre içerisinde taşınmasında ve hücre bölünmesinde görev alan proteinlerin ağlarından meydana gelmektedir. Hücre iskeleti, yapısal organizasyonu ve işlevsel özellikleri bakımından farklılık gösteren; mikrofilamentler, ara filamentler, septinler ve mikrotübüller olmak üzere dört temel filamentten oluşmaktadır. Hücre iskeleti elemanları, birbirlerinden bağımsız yapılar olmayıp, çeşitli proteinler aracılığıyla birbirine bağlanarak hücre içinde süreklilik gösteren kesintisiz bir ağ yapısı oluşturmaktadır (1).

Mikrofilamentler, hücre iskeletinin en ince elemanı olup, 7-8 nm çapındadır. Globüler aktin (G-aktin) monomerlerinin ATP enerjisi kullanılarak bir araya gelmesiyle oluşur. ATP bağlı G-aktin proteinleri filamente pozitif uçtan eklenmekte, hidroliz sonrası ADP içeren monomerler ise negatif uçtan ayrılmaktadır. Mikrofilamenler, hücre bölünmesi, hücre göçü ve morfogenez gibi pek çok temel hücresel süreçte aktif olarak görev almaktadır. Ayrıca, bu filamentler hücre içerisinde paralel, antiparalel ya da dallanmış organizasyonlar halinde bulunabilmekte; sitoplazmada ve özellikle hücre membranının hemen altında konumlanarak hücreye mekanik destek sağlamaktadır (2).

Ara filamentler, 10 nm çapında yapılar olup fibröz yapıda proteinlerden oluşmaktadır. Dokuya özgü ifade edilen 70'ten fazla ara filament proteini bulunmaktadır. Farklı özelliklere sahip proteinlerin birbirleri etrafında sarılmasıyla oluşan ara filamentler, diğer hücre iskeleti filamentlerinden farklı olarak belirgin bir polarite göstermez. Ayrıca, diğer hücre iskeleti bileşenlerinin aksine hücresel hareketlilikte aktif olarak yer almamakla birlikte, temel olarak hücre ve doku bütünlüğünün korunmasında görev alırlar (3).

Septinler, hücre iskeletinin en yeni tanımlanan bileşenlerinden biri olup, yaklaşık 10 nm çapında ve 30–65 kDa moleküler ağırlığa sahip GTP bağlayıcı proteinler olarak tanımlanmaktadır. Bu proteinler, hetero-heksamerik veya hetero-oktomerik kompleksler halinde bir araya gelerek oligomerik yapılar oluşturur. Bu oligomerler daha sonra filamentöz yapılar, halkasal organizasyonlar ya da demetler

şeklinde daha üst düzey yapısal düzenlenmelere dönüşmektedir. Hücre göçü, fagositoz ve hücre bölünmesinde görev aldıkları gösterilmiştir (4,5).

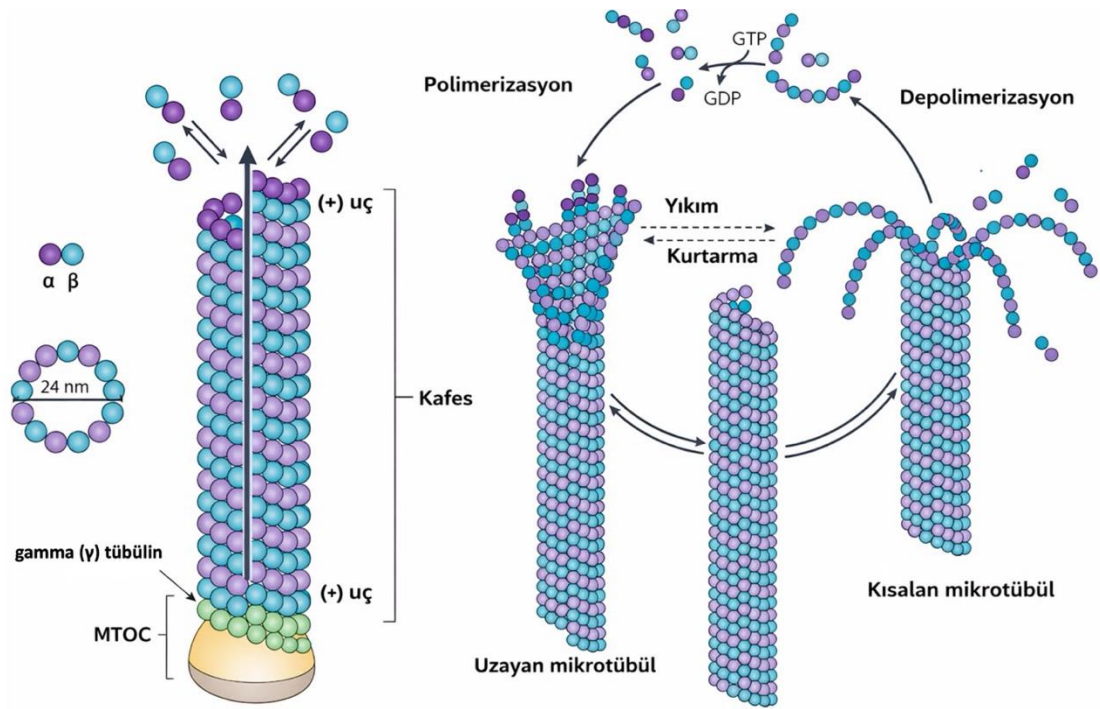
Mikrotübüller, α ve β tübülün heterodimerlerinin birleşmesiyle meydana gelen, dinamik özellik gösteren yapılardır. Polimerizasyonla uzayan ve depolimerizasyonla kısalan bu yapılar, içi boş silindirik polimerler olup yaklaşık 25 nm çapındadır. Hücre içi taşımada, mitotik iğ oluşumunda ve hücresel organizasyonun görev alırlar (6,7). Mikrotübüllerin yapı ve işlevleri sonraki bölümde detaylandırılmıştır.

2.1. Mikrotübül İskeleti: Yapısı, Organizasyonu ve İşlevi

Mikrotübüller, hücre morfolojisinin korunması, hücre içinde makromoleküllerin (örn. protein, RNA) ve organellerin (örn. mitokondri, lizozom) transportunun sağlanması, organellerin yerleşimlerinin belirlenmesi (örn. mitokondri, Golgi kompleksi) ve hücre bölünmesi sırasında kromozomların hareketinin sağlanmasında görev alır. Temel olarak hücre içi hareketin sağlanması ve hücre morfolojisinin korunmasından sorumlu yapılardır. Tüm hücrelerde oluşum mekanizmaları benzer olmakla birlikte, hücre tipine bağlı olarak yapısal düzenlemeler geçirmekte ve hücrenin biyolojik fonksiyonlarını etkilemektedir (7,8).

Hücre iskeletinin en büyük ve dinamik bileşenlerinden biri olan mikrotübüller, uzun ve silindirik bir yapıya sahiptir. Bu filamentler, α ve β -tübülün heterodimerlerinin polimerizasyonu ile oluşur. Tübülün heterodimerlerinin uç uca (head-to-tail) dizilmesi protofilamentleri oluştururken; 13 protofilamentin yan yana gelmesiyle içi boş silindirik mikrotübül yapısı oluşur. Mikrotübül uzaması, tübülün heterodimerlerinin yapıya eklenmesiyle gerçekleşen polimerizasyon süreci ile sağlanırken; dimerlerin yapıdan ayrılması depolimerizasyona yol açarak mikrotübülün kısalmasına neden olur (Şekil 2.1). Hem α hem de β -tübülün GTP bağlayabilme özelliğine sahiptir; ancak mikrotübül yapısına katıldıktan sonra GTP hidrolizini yalnızca β -tübülün gerçekleştirir. GTP bağlı tübülün dimerleri çoğunlukla mikrotübülün pozitif (+) ucuna eklenir. GTP'nin hidrolizi sonucunda oluşan GDP bağlı tübülün ise yapıdan ayrılma eğilimindedir. Bu nedenle büyüyen mikrotübüllerin (+) ucunda "GTP başlığı" olarak adlandırılan bir yapı bulunur. Mikrotübülün (+) ucunda uzama ve kısalma evreleri arasında, GTP hidrolizine bağlı olarak hızlı geçişler meydana gelir; bu durum dinamik kararsızlık olarak tanımlanır. Eğer GTP hidrolizi, yeni tübülün eklenmesinden daha

hızlı gerçekleşirse, GDP bağlı β -tübülin içeren dimerler uca ulaşır ve mikrotübül hızla depolimerize olur. Bu ani kısalma süreci “catastrophe” (yıkım) olarak adlandırılırken, yeniden uzamaya geçiş ise “rescue” (kurtarma) olarak ifade edilir (9) (Şekil 2.1). Bu değişimler çoğunlukla (+) uçta gerçekleştiğinden, bu uç daha dinamiktir. Buna karşılık negatif (-) uç daha stabildir ve genellikle hücrede mikrotübül organizasyon merkezi (MTOC) ile ilişkilidir. Hayvan hücrelerinde başlıca MTOC yapısı sentrozomdur. Sentrozom, zarla çevrili olmayan bir organel olup, birbirine dik konumlanmış iki sentriolden ve bunları çevreleyen perisentriolar matriksten oluşur. Mikrotübüllerin (-) ucunda, sentrozom içinde yer alan gama (γ) tübülin ve buna eşlik eden protein kompleksleri bulunur. Bununla birlikte bazı hücre tiplerinde, örneğin nöronlar, kas hücreleri ve fibroblastlarda, Golgi aygıtı da alternatif bir MTOC olarak görev yapabilmektedir(8,10,11).



Şekil 2.1. Mikrotübüllerde polimerizasyon, depolimerizasyon, yıkım ve kurtarma süreçlerinin şematik gösterimi (10).

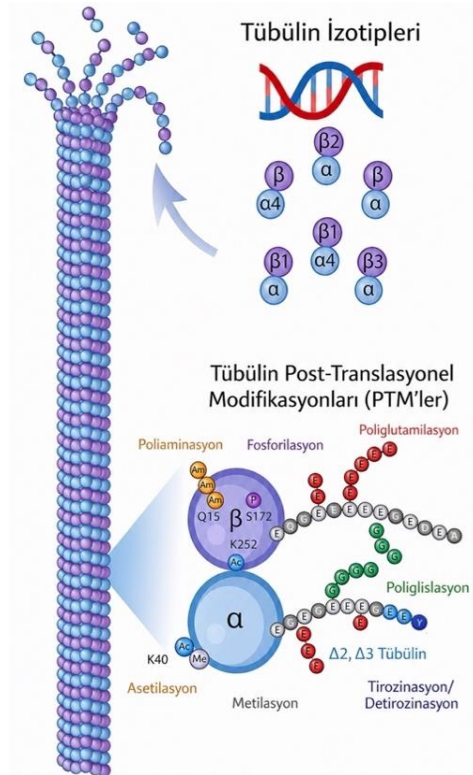
Mikrotübüller, yapısal özellikleri bakımından hem stabil hem dinamik bölgeler içermektedir. Stabil mikrotübüller uzun ömürlü, daha kararlı yapılar olup, depolimerizasyon ajanlarına ve düşük sıcaklık uygulamalarına karşı dirençlidir. Buna karşılık, dinamik mikrotübüller, hızlı polimerizasyon ve depolimerizasyon döngüsü olan, kararsız yapılardır (12,13). Mikrotübül stabilitesi hücre tipine, hücre döngüsünün evresine ve hücre içindeki konumuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örnek olarak, uzun ömürlü ve özelleşmiş morfolojiye sahip olan nöron hücrelerinde bulunan mikrotübüller, mitotik hücrelerdeki mikrotübüllerden daha stabil yapıda olup stabil mikrotübüller çoğunlukla akson boyunca yerleşim göstermektedir (14). Stabil mikrotübül yapısının kurulması ve korunması, nöronal hücrelerin düzgün fonksiyonlarını sürdürebilmeleri açısından önemlidir. Mikrotübül stabilitesi, tübülün proteinlerinde gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonlarla ve mikrotübüle bağlanan asosiye proteinler ile düzenlenmektedir.

2.1.1. Tübülün Post-Translasyonel Modifikasyonları

İnsan genomunda, α -tübülün ve β -tübülün izoformlarını kodlayan çok sayıda gen bulunmakta olup bunların yaklaşık 9'u α -tübülün, 10'u ise β -tübülün ailesi içerisinde yer almaktadır. α 1A (TUBA1A) and β I (TUBB) gibi bazı izoformlar tüm hücre tiplerinde sentezlenirken, hücre veya doku spesifik olan izoformlar da bulunmaktadır. Örneğin, β IVb-tübülün (TUBB4B) sil ve kamçı yapılarında, β III-tübülün (TUBB3) ise nöronlarda ve testis hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir (15). Özellikle nöronal hücrelerde belirli tübülün izoformlarının baskın olarak ifade edilmesi, sinir sistemi gelişimi ve akson organizasyonu açısından kritik önem taşımaktadır. Tübülün genlerinde meydana gelen mutasyonlar, kan hastalıklarından nörodejeneratif hastalıklara kadar geniş klinik spektrumu olan ve 'tübülünopatiler' olarak adlandırılan hastalıklara neden olmaktadır (16,17).

Tübülün proteinleri sentezlendikten sonra post-translasyonel modifikasyona uğramaktadır. Bu modifikasyonlara örnek olarak asetilasyon, tirozinasyon/detirozinasyon, fosforilasyon, poliglutamilasyon ve poliglisilasyon sayılabilir (18,19) (Şekil 2.2.). α -tübülün modifikasyonları arasında asetilasyon ve detirozinasyonun stabil ve uzun ömürlü mikrotübüllerde sık görüldüğü bildirilmiş olup, bu modifikasyonlar mikrotübül stabilitesini gösteren belirteçler olarak

kullanılabilmektedir (20, 21). Asetilasyon, α -tübülünün N-terminal bölgesinde bulunan 40. lizin (K40) amino asitinde gerçekleşmekte olup mikrotübül lümeninde yer almaktadır. Geri dönüşümlü bir modifikasyon olan asetilasyon, α tübülün N-asetil transferaz (α TAT1) tarafından, deasetilasyon ise temel olarak histon deasetilaz 6 (HDAC6) ve sirtuin 2 (SIRT2) enzimleri tarafından katalizlenmektedir (21, 22). Amyotrofik lateral skleroz, Alzheimer, Huntington ve Parkinson hastalıkları gibi farklı etiyojilere sahip nörodejeneratif hastalıklarda, HDAC6 düzeyindeki artışa bağlı olarak α -tübülün asetilasyonunun azaldığı gösterilmiş olup bu bulgu hücre morfolojisindeki ve aksonal transporttaki hatalarla ilişkilendirilmiştir (23, 24). HDAC6 inhibisyonu yoluyla α -tübülün asetilasyonu arttırılarak aksonal transport hatalarının düzeltilbildiği bildirilmiştir (25,26). Stabilite ile ilişkili geri dönüşümlü diğer bir modifikasyon α -tübülün detirozinasyonudur (27). α -tübülünün tirozinasyon/detirozinasyon döngüsü sonraki bölümde detaylandırılmıştır. Tübülün PTM'leri ve tübülün izoformları birlikte hücrelerde "tübülün kodu" adı verilen düzenleyici bir sistem oluşturmaktadır. Farklı tübülün izoformları ve bunlar üzerinde gerçekleşen modifikasyonlar, mikrotübüllerin yapısal ve işlevsel düzenlenmesi açısından önemlidir (28, 29). Tübülün PTM'leri aynı zamanda mikrotübül assosiye proteinlerin mikrotübül ile etkileşimlerini düzenlemektedir. Bu sayede mikrotübüllerin stabilitesi ve yapısal bütünlüğü kontrol edilmekte; hücre içi vezikül ve organel taşınımı, mitotik iğ oluşumu ile nöronlarda aksonal iletim gibi birçok hücresel süreç düzenlenmektedir (30, 31).

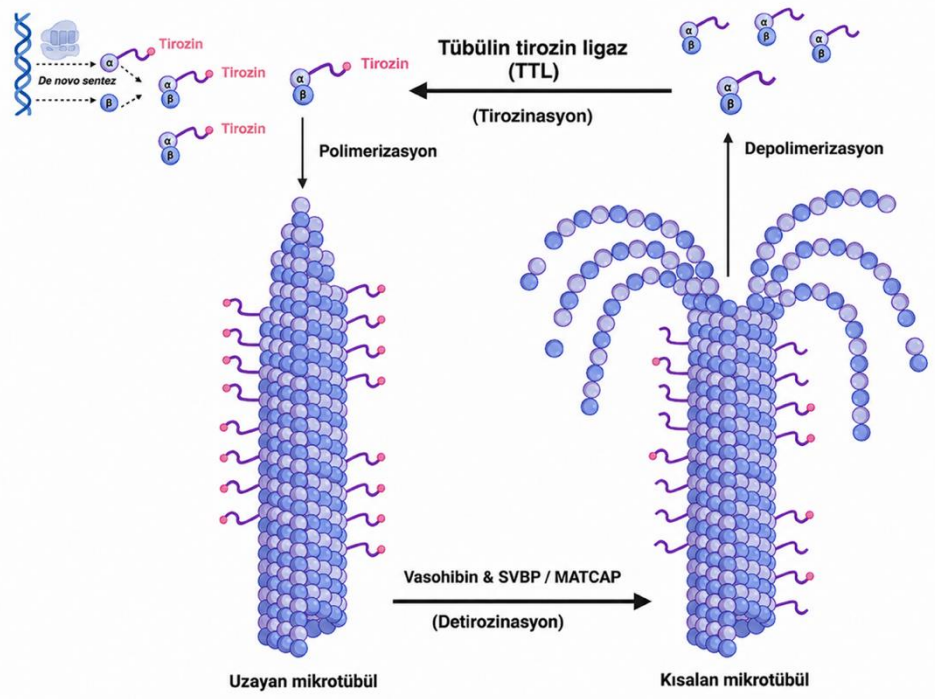


Şekil 2.2. Tübülün izotipleri ve post-translasyonel modifikasyonlarının (PTM'ler) şematik gösterimi (28).

2.1.2. α -tübülünün Tirozinasyon/Detirozinasyon Döngüsü

Evrimsel olarak korunmuş, iyi karakterize edilmiş ve ilk keşfedilen modifikasyonlardan biri α -tübülün tirozinasyonudur. İnsanda, TUBA4A ve TUBA8 izoformları dışında, tüm α -tübülün izoformları karboksil uçta tirozin amino asidi olacak şekilde sentezlenir. Daha sonra, α -tübülün proteinlerinin karboksil ucunun 451. pozisyonunda yer alan tirozin amino asidi, tübülün karboksipeptidazlar olan Vasohibin-1/SVBP, Vasohibin-2/SVBP veya MATCAP (TMCP1) tarafından kesildiğinde, α -tübülün proteini detirozinlenmektedir (32-34). Mikrotübüllerin depolimerizasyonunun ardından açığa çıkan serbest α -tübülün proteinlerinin karboksil ucuna ise tübülün tirozin ligaz (TTL) enzimi aracılığıyla yeniden tirozin amino asidi eklenmektedir (27, 35,36). Bu döngü, tirozinasyon/detirozinasyon döngüsü olarak bilinmektedir (Şekil 2.3.) Detirozinasyonun ardından, α -tübülünün karboksil ucundaki kesim devam edebilir; böylece “delta 2 ($\Delta 2$) tübülün” olarak adlandırılan geri dönüşümsüz, nöronlara özgü modifikasyon gerçekleşir. Delta 2 tübülün formunu alan

α -tübüline TTL enzimi artık tirozin ekleyememekte ve α -tübülin proteinini tirozinasyon/detirozinasyon döngüsünden çıkmaktadır (16).



Şekil 2.3. α -tübülin proteinlerinin tirozinasyon-detirozinasyon döngüsünün şematik gösterimi (BioRender ile oluşturulmuştur).

Detirozinasyon stabil yapıdaki mikrotübüllerde, tirozinasyon ise dinamik yapıdaki mikrotübüllerde oransal olarak fazla bulunmaktadır. Örneğin, nöronlar ve kardiyomiyositler gibi farklılaşmış hücrelerde detirozinlenmiş mikrotübüller, bölünen hücrelere oranla daha fazladır (34,37). Detirozinlenmiş mikrotübüllerin hücre içerisinde 16 saate kadar stabil kalabildiği, buna karşın tirozinlenmiş mikrotübüllerin ise yalnızca 3–5 dakika içerisinde yıkıma uğradığı gösterilmiştir (38). Mikrotübüllerin detirozinasyon/tirozinasyon durumunun, MAP proteinlerinin mikrotübül ile etkileşimini düzenlediği bildirilmiştir. Örneğin, tübülin tirozinasyonun $p150^{\text{Glued}}$ ve CLIP-170 gibi mikrotübülün pozitif ucuna bağlanan proteinlerin yerleşimi için önemli olduğu, TTL ifadesi baskılandığında hatalı yerleşim gösterdikleri bildirilmiştir (39). Benzer şekilde, motor proteinlerden kinezin-1'in detirozinlenmiş mikrotübüllere bağlandığı, tirozinasyonun kinezinin hücre içi lokalizasyonunu ve hızını etkilediği gösterilmiştir (40, 41).

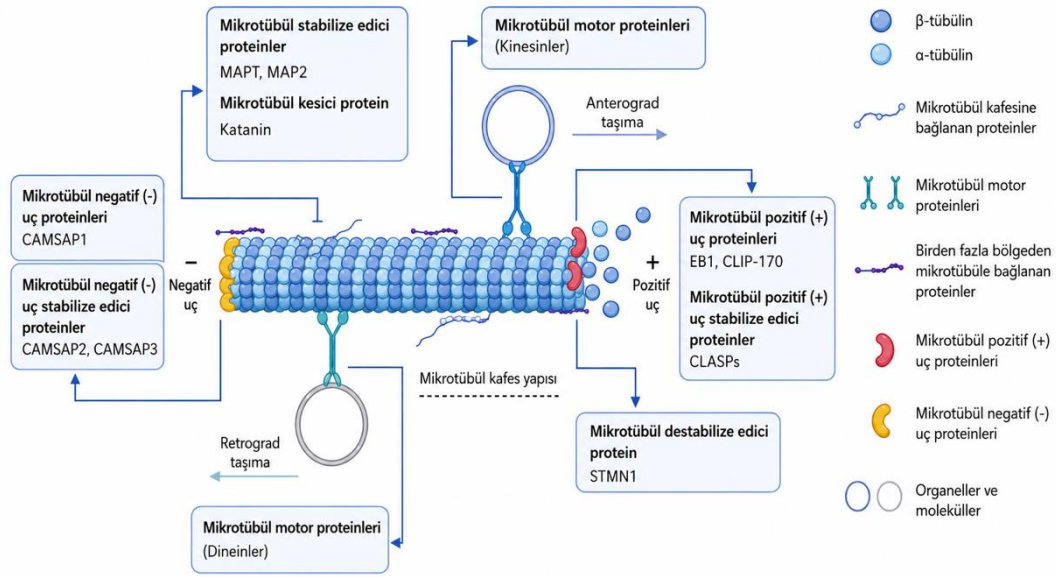
TTL ilk kez 1977 yılında beyin ekstraktlarından izole edilmiştir. TTL enzimini kodlayan gen, insan ve farede 2. kromozomda lokalize olup kodlanan protein 43 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. Türler arasında yüksek oranda korunmuş olan TTL, α -tübülün proteinlerinde tirozinasyonu katalizlediği gösterilmiş tek enzimdir. TTL'nin α -tübülün haricinde az sayıda protein hedefi (EB1, DCTN3 ve LSM6) bulunduğu belirlenmiştir (42). Tüm dokularda ifade olan TTL enzimi, en fazla sinir sistemi ve kas dokusunda bulunmaktadır. Hücre içerisinde ise temel olarak sitoplazmada yerleşim göstermekle birlikte, ek olarak nükleoplazma ve veziküler yapılarda da bulunmaktadır. Nöronlarda ise akson, dendrit ve büyüme konisi gibi mikrotübül dinamiğinin yoğun olduğu bölgelerde zenginleştiği gösterilmiştir (43,44). TTL enzimi, merkezi, N-terminal ve C-terminal domain olmak üzere üç domainden oluşmaktadır. Enzimin aktif merkezi, bu üç domainden de oluşmakta olup adenozin içermektedir. TTL'nin α ve β -tübülün heterodimerlerinin ara yüzüne yakın bir bölgeye bağlanmakta olduğu ve sadece serbest α -tübülün proteininde tirozinasyonu katalizlediği belirlenmiştir (45).

TTL enziminin, hücresel süreçlerin düzenlenmesi ve organizma gelişimi için önemli olduğu bilinmektedir. Hücre iskeleti dinamiklerinin düzenlenmesindeki rolü nedeniyle hücre proliferasyonu ve hücresel farklılaşma süreçlerinde görev almaktadır. TTL *knock-out* fare modellerinde, TTL eksikliğinin nöronal ağ organizasyonunu bozduğu ve doğum sonrası 24 saat içinde ölüm meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca TTL kaybının, kortikal ve hipokampal nöronlarda anormal akzonal farklılaşma ile birlikte nörit uzunluğunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (36). Sıçan hipokampal nöron kültürlerinde TTL gen ifadesi shRNA yöntemiyle baskılandığında, nöritlerde ve hücre gövdesinde tirozinlenmiş tübülün düzeyinin azaldığı, nörit uzunluğunun arttığı saptanmıştır (37). Epitel hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise, TTL düzeyinin aşırı ifadelendirilmesi (*overexpression*) ve baskılanması (*knock-down*) yoluyla detirozinasyon düzeyi değiştirildiğinde, hücre morfolojisinde ve apikal yöndeki protein transportunda değişiklikler gösterilmiş; detirozinasyonun epitel hücrelerinde monolayer oluşumu ve apikal transportta görev aldığı rapor edilmiştir (46). Sağlıklı hücrelerde, kinezin-1 aracılığıyla hücre polarizasyon yönüne taşınarak lokalize olan APC proteininin, TTL baskılanmış hücrelerde hücrenin her iki ucunda anormal biçimde dağılım gösterdiği bildirilmiştir (47). TTL ve α -tübülün tirozinasyon düzeylerinin kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve hipertrofik kardiyomiyopatide

değiştirdiği rapor edilmiştir. Alzheimer hastalığına ilişkin gerçekleştirilen çalışmalarda, sporadik ve ailesel Alzheimer olgularına ait post-mortem beyin dokularında TTL protein düzeylerinin azaldığı; buna bağlı olarak detirozinlenmiş ve $\Delta 2$ -tübülün düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden farklılaştırılan kortikal nöronlarda da benzer bulgular elde edilerek mikrotübül dinamiğinin bozulduğu rapor edilmiştir (48). Anabilim Dalı'mızda yaptığımız araştırmalarda ise SMA hastalığına ait hücresel modelde, hastalıkta eksikliği bulunan SMN proteini kaybına bağlı olarak TTL protein düzeyinde artış saptanmış, α -tübülün detirozinasyonunun azaldığı belirlenmiştir (49).

2.1.3. Mikrotübül assosiyasyon Proteinler

Mikrotübül assosiyasyon proteinler (MAP), mikrotübül üzerindeki yerleşimleri ve fonksiyonel etkilerine göre farklı gruplara ayrılmaktadır. Bu proteinler arasında mikrotübül pozitif uç proteinleri (+TIP'ler, örn. EB1/EB3, p150^{Glued} ve CLIP-170), negatif uç proteinleri (-TIP'ler, örn. CAMSAP1/2/3), depolimerize edici proteinler (örn. statmin), destabilize edici proteinler (örn. stathmin/STMN1), mikrotübül stabilize edici proteinler (örn. MAP2), mikrotübül kesici proteinler (örn. katanin ve spastin), mikrotübül kafes (*lattice*) bölgesine bağlanan yapısal proteinler (örn. MAP1B, Tau ve MAP2) ile motor proteinler (örn. kinezin ve dinein) yer almaktadır. Motor proteinler, mikrotübüller boyunca hücre içi kargo taşınmasını sağlarken; diğer MAP proteinleri mikrotübül polimerizasyonu, depolimerizasyonu, stabilitesi ve organizasyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır (50, 51). Bu proteinler, hücrenin fonksiyonuna ve ihtiyacına göre mikrotübüllerin stabil veya dinamik özelliklerini düzenlemekte ve böylece mikrotübül ilişkili hücresel süreçlerin kontrolüne katkıda bulunmaktadır. Bazı proteinler bağlandıkları bölgeye ya da çoklu fonksiyona sahip olmalarına göre birden fazla grupta yer alabilirler. MAP proteinleri genel olarak mikrotübül stabilitesine, polimerizasyonuna ya da depolimerizasyonuna etki etmekte; böylece mikrotübül işlevlerini düzenlemektedir (52) (Şekil 2.4.)



Şekil 2.4. Mikrotübül assosiyasyon proteinlerinin şematik gösterimi (52).

2.1.4. Motor Proteinler

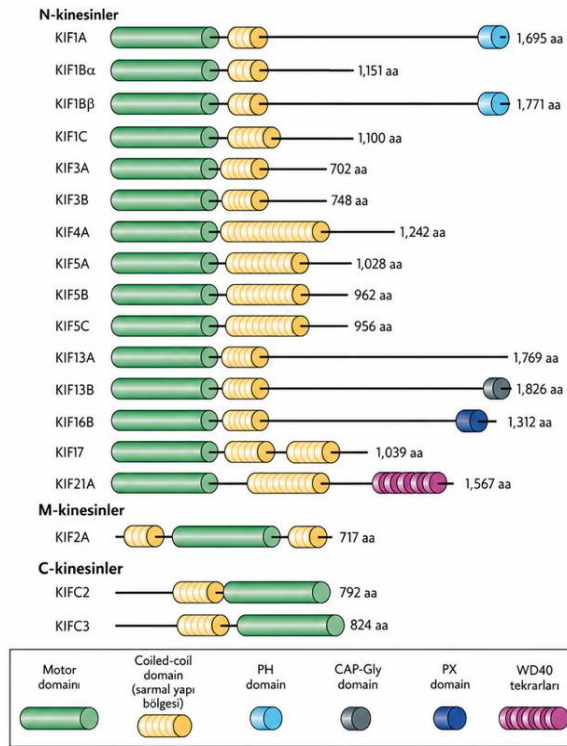
Mikrotübül aracılı hücre içi taşımada görev alan motor proteinler, organel, protein, RNA ve sinaptik vezikül gibi çeşitli hücresel kompartmanların hücre gövdesi ile akson uçları arasında enerji gerektiren aksonal taşınmasından sorumludur (53). Bu proteinler, mikrotübüller üzerinde hareket edebilmeyi sağlayan evrimsel olarak korunmuş bir motor domain taşırlar. Motor domaini, α/β -tubulin heterodimerleriyle etkileşip ATP hidroliziyle motor proteinlerin hareketini yönlendirir. Dinein motor proteini, retrograd yönde (periferden hücre gövdesine) taşıma, sil ve flagellaya hareketlilik kazandırma gibi görevlerini mikrotübül üzerinde ATP enerjisi harcayarak yapar. İki ağır zincir, iki ara zincir, iki hafif ara zincir ve üç hafif zincirden oluşan; kinezinlerden yapısal olarak çok daha büyük bir motor proteindir. İnsanda iki tip sitoplazmik ve çok sayıda aksonemal dinein bulunur. Sitoplazmik dineinler, dynein-1 (DYNC1H1) ve dynein-2 (DYNC2H1) olarak sınıflandırılır. Dynein-1 hücre içi organel taşınımı ve mitotik iğ ipliği organizasyonunda görev alırken, dynein-2 primer siliyum içinde retrograd intraflagellar taşınımından sorumludur. Aksonemal dineinler ise yaklaşık 14 farklı ağır zincir geni (*DNAH1–DNAH14*) tarafından kodlanır ve sil ile flagella hareketinden sorumludur (54-56)

Kinezin motor proteinleri, genel olarak mikrotübüllerin pozitif ucu yönünde (anterograd) gerçekleşen hücre içi taşımada görev alır. Kinezin protein ailesi, yapısal

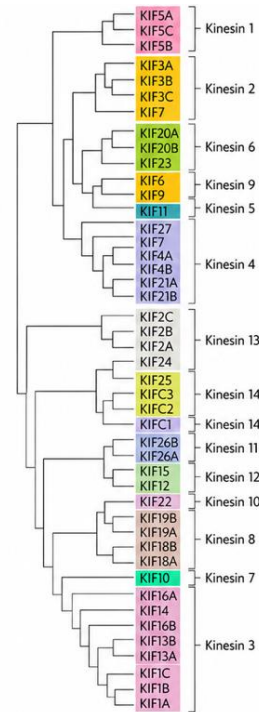
ve fonksiyonel özelliklerine göre 14 sınıfa (kinezin 1–14) ayrılmaktadır. İnsan ve fare genomlarında 45 farklı kinezin geni tanımlanmıştır (56) (Şekil 5A). Farklı kinezin alt aileleri, motor domainleri açısından yüksek düzeyde (%30–40) dizi benzerliği göstermelerine rağmen, bu proteinler hücre içerisinde organel ve vezikül taşınması, mitoz sırasında iğ ipliklerinin dinamik düzenlenmesi ve uzun mesafeli aksonal taşınma gibi çeşitli görevler üstlenir. Kinezin proteinleri, iki kinezin ağır zincirinden (KHC) ve iki kinezin hafif zincirinden (KLC) oluşan oligomerik yapıli proteinlerdir. Tüm kinezinlerde motor (head) domain, boyun (coiled-coil domain) ve kuyruk (cargo-binding domain) kısımları ortaktır (57,58) (Şekil 5B). Motor domain, proteinin mikrotübüle bağlanmasını ve ATPaz'ın aktivite olmasını sağlamaktadır. Kinezinler, motor domainlerin protein üzerindeki konumuna göre N-, M- ve C-kinezinler olarak sınıflandırılmaktadır. Motor domaini proteinin N-terminal bölgesinde bulunan “N-kinezinler” genellikle mikrotübüllerin pozitif (+) ucuna doğru hareket ederek anterograd aksonal taşımada görev alır. ATP'nin hidroliz edilmesiyle mikrotübül üzerinde artı yönde (anterograd) kargoya bağlı kuyruğun hareketi gerçekleşir (59-61). Motor domaini C-terminal bölgede bulunan “C-kinezinler” çoğunlukla mikrotübüllerin negatif (–) ucuna doğru hareket etmektedir. Motor domaini proteinin orta kısmında yer alan “M-kinezinler” ise daha çok mikrotübül organizasyonu, iğ iplikçiklerinin oluşumu ve hücre bölünmesi gibi süreçlerde rol oynamaktadır. Bazı kinezinlerin (örn. KIF2A, KIF18A, KIF24) birincil görevleri mikrotübüllerin yapısını ve dinamiklerini düzenlemek, bazı kinezinlerin ise (örn. KIF5C, KIF1A, KIF3A/B) mikrotübül üzerinde kinetik olarak kargo taşımaktır. Her iki işlevi de yerine getiren kinezinler (kinezin-8) bulunabildiği gibi mikrotübüllerin artı uçlarının depolimerizasyonunu sağlayan kinezinler de (kinezin-13) bulunmaktadır. Kinezinlerin büyük çoğunluğu hareketlidir; ancak belirli alt aile üyeleri hareket (motilite) yeteneğini kaybetmiştir. Mikrotübüllerin hem (+) hem de (–) uçlarına hareket edebilirler ancak (+) uca doğru hareket eden kinezinler çoğunluktadır (62). Aksonal taşımada başlıca görev alan kinezinlerin, kinezin-1, kinezin-2, kinezin-3 ve kinezin-5 olduğu gösterilmiştir. Mikrotübül yapısının ve stabilitesinin düzenlenmesinden, kinezin ve dinein motor protein ailelerinin de sorumlu olduğu bildirilmiştir. Kinezin-8, Kinezin-13 ve Kinezin-14 proteinlerinin mikrotübül dinamiğinin düzenlenmesinde görev alarak, hücre içi sinyal iletiminde ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde rol

oynadıkları gösterilmiştir (63-65). Kinezin motor proteinlerinin mikrotübül ile olan bağlantılarının, α -tübülün modifikasyonları tarafından etkilendiği bilinmektedir. Örneğin, KIF3C motor proteini, tirozinlenmiş mikrotübüllere bağlanarak, büyüme konisinde (*growth cone*) mikrotübül destabilize edici bir faktör olarak görev yapar (66). Kinezin-1 motor proteinlerinden, KIF5C proteinin de, mikrotübüle bağlanmasının (*landing rate*) α -tübülün modifikasyonları tarafından düzenlendiği, aynı zamanda yürüme mesafesi ve hızı (*run length & velocity*) gibi özelliklerin de modifikasyonlardan doğrudan etkilendiği gösterilmiştir (41).

A



B



Şekil 2.5. (A) Memeli kinezin süperailisini gösteren filogenetik ağaç. (B) Kinezin proteinleri ve domainlerinin şematik gösterimleri (58, 67).

2.1.5. KIF5C Motor Proteini: Yapısı ve Hücresel Fonksiyonları

Hücre içi taşımada mikrotübüller boyunca kargo taşıyan kinezin-1 ailesi, KIF5A, KIF5B ve KIF5C olmak üzere 3 farklı izoforma sahiptir. KIF5B proteini yaygın olarak birçok dokuda ifade edilirken, KIF5A ve KIF5C nöronal dokularda yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. KIF5C geni insan genomunda kromozom 2p23 bölgesinde yer almakta olup alternatif splicing sonucunda farklı izoformlar oluşturabilmektedir. Bu izoformların özellikle beyin gelişimi, aksonal transport ve nöronal fonksiyonlarda farklı görevler üstlendiği düşünülmektedir (68). KIF5C proteini; sinaptik veziküller, mitokondriler ve çeşitli protein komplekslerinin mikrotübüller boyunca taşınmasında rol oynamaktadır. Özellikle mitokondrilerin akson boyunca taşınması ve nöronal enerji homeostazının sürdürülmesi açısından önemlidir (69). Yapısal olarak N-terminalde yer alan motor domaini ATP bağlama ve hareketten sorumlu iken, ortadaki *coiled-coil* bölge protein dimerizasyonunu sağlar. C-terminal kuyruk bölgesi ise kargo bağlanmasında rol oynar. Sıçan hipokampal nöronlarında yapılan bir çalışmada, mikrotübül detirozinasyonunun KIF5C'nin mikrotübüle bağlanmasını arttırdığı, aynı zamanda yerleşimini ve hızını da etkilediği saptanmıştır (40). Nöronal hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada, KIF5C'nin detirozinlenmiş mikrotübüllere bağlandığı ve mikrotübüller üzerinde daha yavaş hareket ettiği gösterilmiştir (41). COS hücrelerinde yapılan bir çalışmada, KIF5C'nin asetilasyon ve detirozinasyon ile modifiye edilmiş mikrotübüller boyunca hareket ettiği bildirilmiştir (70). Nöronlarda gerçekleştirilen bir çalışmada ise kinezin-1 ailesinden KIF5B'nin detirozinlenmiş stabil mikrotübüllere bağlandığı fakat kinezin-3 ve kinezin-5 motor proteinlerinin tirozinlenmiş mikrotübüllere bağlandığı rapor edilmiştir. Ayrıca, diğer stabil mikrotübül belirteci olan α -tübulin asetilasyonun da, kinezin-1 ailesinin mikrotübüle bağlanmasını ve hareketliliğini etkilediği gösterilmiştir (71-73). KIF proteinlerinin aktivitesinin fosforilasyon yoluyla düzenlendiği bildirilmiştir. Örneğin, c-Jun NH2-terminal kinaz 3 (JNK3), KIF5C'nin motor domainini fosforile eder ve KIF5C'nin mikrotübüllere bağlanmasını engeller. KIF5C'nin fosforilasyonunun bozulmasının, nörodejeneratif hastalıklardan Huntington hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (74).

2.2. Spinal Müsküler Atrofi (SMA)

Spinal müsküler atrofi (SMA), spinal motor nöron dejenerasyonu ile karakterize ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olup, kas zayıflığı ve atrofiyle seyretmesi nedeniyle nöromüsküler hastalıklar arasında da sınıflandırılmaktadır. Otozomal resesif olarak kalıtılan SMA'nın insidansı 1/11000, taşıyıcı frekansı ise toplumlara göre değişmekle birlikte 1/25-1/50 olarak bildirilmektedir (75, 76). Ülkemizde SMA'nın görülme sıklığı ve taşıyıcılık oranları kesin olarak bilinmemekle birlikte, yıllık yaklaşık 1,2 milyon canlı doğum temel alındığında her yıl 130–180 arasında (ortalama 150) olduğu tahmin edilmektedir (77). SMA'da, omurilikte yer alan α motor nöronların kaybı sonucunda hastalarda ilerleyici kas zayıflığı ve kas atrofi gelişmekte; hastalığın ağır formlarında bu durum temel yaşamsal fonksiyonların sürdürülememesine yol açmaktadır (78, 79).

SMA, klinik şiddet ve başlangıç yaşına bağlı olarak beş ayrı fenotip altında sınıflandırılmaktadır (80). Tip 0 SMA, doğum öncesi başlayan ve prenatal SMA olarak da tanımlanan en ağır formudur. Bu fenotipte ciddi kas güçsüzlüğü ve belirgin solunum yetmezliği görülmekte olup, hastalar çoğunlukla yaşamın ilk haftaları içerisinde kaybedilmektedir. Tip 1 SMA, en yaygın klinik fenotip olup hastaların yaklaşık %60'ını oluşturur. Klinik belirtiler genellikle yaşamın ilk 6 ayında görülür. Proksimal kas güçsüzlüğü en dikkat çekici özelliğidir ve çoğu hasta 2 yaşına ulaşmadan kaybedilir. Tip 2 SMA, hastaların yaklaşık %30'unu oluşturmakta ve bulgular 6-18 aylar arasında ortaya çıkmaktadır. Hastalar kendi başlarına oturabilirler ancak bağımsız olarak ayakta duramaz ve yürüyemezler. Tip 3 SMA, semptomların başlangıcının 18 ay ile erişkinlik dönemi arasında değişkenlik gösterdiği bir formdur. Olguların yaklaşık %15'ini oluşturmakta olup, hastalar genellikle normal yaşam süresine sahiptir. Tip 4 SMA, hastaların %5'inden azını oluşturur ve erişkin başlangıçlı SMA olarak adlandırılır. Alt ekstremitelerde ilerleyici proksimal kas güçsüzlüğü ile karakterize olup, semptomlar ortalama 35 yaşından sonra ortaya çıkar (81, 82) (Tablo 2.1.). SMA hastalarının tedavisi yakın döneme kadar, ağırlık olarak fiziksel rehabilitasyon ve solunum fonksiyonlarının iyileştirilmesine yönelik destekleyici tedavilerle sınırlı kalmıştır. Ancak son 10 yılda, tedavi açısından önemli ilerlemeler kaydedilmiş; özellikle gen tedavisi onasemnogene abeparvovec (Zolgensma), anti-sense oligonükleotit Nusinersen (Spinraza) ve küçük moleküller Risdiplam (Evrysdi)

aracılığıyla SMN protein düzeyini artırmayı hedefleyen yaklaşımlar geliştirilmiş ve klinikte uygulanmaya başlanmıştır. Uygulanan bu tedavilerle birlikte hastalığın yukarıda bahsedilen doğal seyrinin değiştiği görülmüştür (82-84). Özellikle geçmişte ağır seyirli kabul edilen Tip 1 SMA hastalarında nusinersen tedavisi sonrası bağımsız oturma, hatta bazı olgularda yürüme gibi önceden görülmeyen motor kazanımlar bildirilmektedir (85). Erken dönemde tedavi edilen çocukların yaşına uygun motor becerilere ulaşabildiği gösterilmiş, ayrıca gerçek yaşam verileri de benzer bulguları desteklemiştir. Bu gelişmeler nedeniyle, tedavi öncesi doğal seyir temel alınarak oluşturulan klasik SMA tiplerinin günümüz klinik pratiğini tam olarak yansıtmadığı vurgulanmaktadır (86, 87).

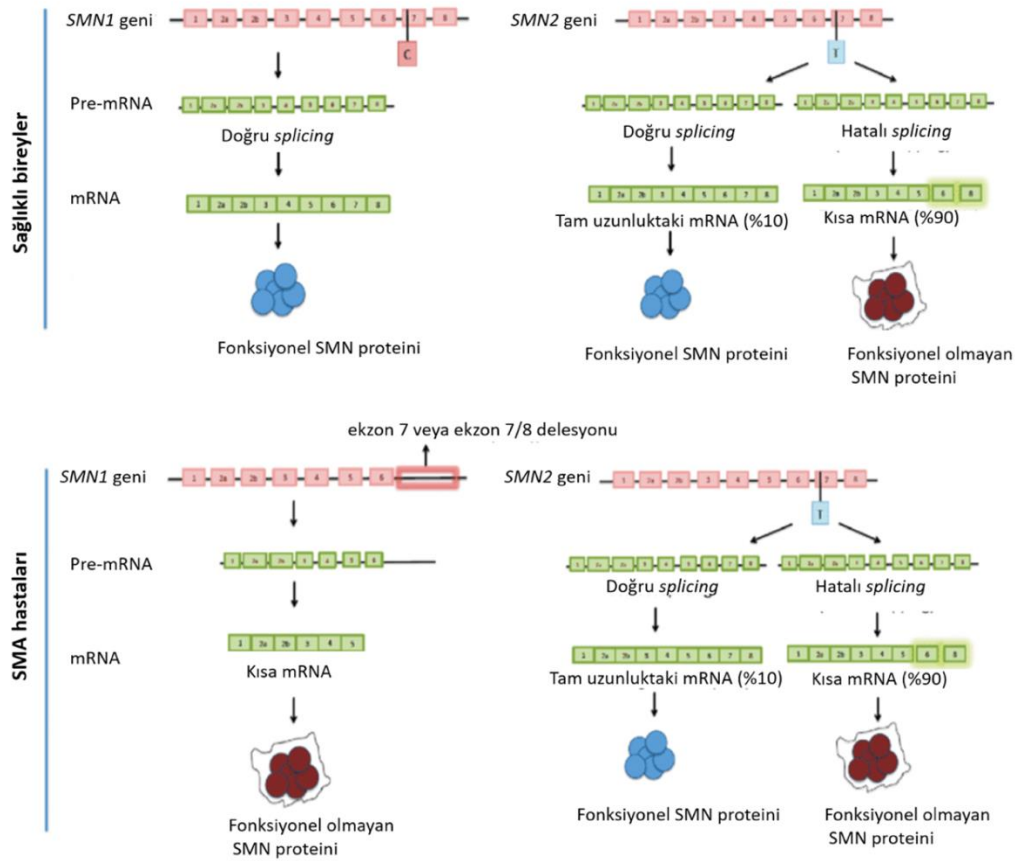
2.2.1. SMA Hastalığının Moleküler Genetik Özellikleri

SMA'nın, 1995 yılında, insan genomunun 5. kromozomunun uzun kolunda; 5q13.2 bölgesinde yer alan *Survival of Motor Neuron 1 (SMN1)* geninde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda ortaya çıktığı gösterilmiştir (78). Uzunluğu 27 kb olan *SMN1* geni, 1, 2a, 2b ve 3–8 olmak üzere 9 ekzon içermekte olup, tam uzunlukta SMN (FL-SMN) proteininin sentezinden sorumludur. SMA hastalarının yaklaşık %95'inde *SMN1* geninin 7. ekzonunda veya ekzon 7 ve 8'in birlikte homozigot delesyonu veya gen dönüşümü (*conversion*) saptanırken, geriye kalan %5'lik hasta grubunda büyük oranda *SMN1* geninin bir alelinde heterozigot delesyon ve diğer alelde nokta mutasyonu görülür. Ayrıca; daha nadir olarak iki alelde de nokta mutasyonu görülebilmektedir (88,89). Bu mutasyonlara bağlı olarak, tam uzunlukta, fonksiyonel SMN proteini üretilmemektedir. İnsan genomunda, *SMN1* geninin *SMN2* olarak adlandırılan, aynı kromozom üzerinde sentromerik bir kopyası daha bulunmaktadır. *SMN1* ve *SMN2* genlerinin %99 oranda nükleotit benzerliği bulunmasına karşın aralarında 5 nükleotit farklılığı tanımlanmıştır (88). Bu farklılıklar arasında en kritik olanı, 7. ekzonun 6. pozisyonunda yer alan sitozin nükleotidinin timine dönüşümüdür (C>T, F280F). *SMN2* genindeki bu değişiklik sonucunda kodlanan amino asit değişmemekle birlikte, post-transkripsiyonel bir mekanizma olan uçbirleştirme (*splicing*) etkilenmektedir. Bu nükleotit değişikliği nedeniyle, *SMN2* geninden oluşan transkriptlerde ekzon 7 bulunmamakta, ve bunun sonucunda kısa, kararsız ve hızla yıkıma uğrayan bir SMN proteini oluşmaktadır. Ancak, ~%10 oranında işlevsel tam

uzunlukta SMN proteini üretilmektedir (90, 91) (Şekil 2.6). Bu oran, hücreler için gerekli olan SMN proteini miktarını karşılayamamakla birlikte, *SMN2* kopya sayısı yüksek olan bireylerde hastalığın daha hafif seyretmesi, *SMN2* geninin hastalığı modifiye edici bir gen olarak tanımlanmasına yol açmıştır (Tablo 2.1.). *SMN2* kopya sayısı bireyler arasında değişkenlik göstermekte olup literatürde 1–8 kopya arasında olabileceği bildirilmiştir (92). *SMN2* geninin yanı sıra, plastin 3 ve CORO1C gibi diğer genlerin de hastalık fenotipini etkilediği gösterilmiştir (93,94).

Tablo 2.1. SMA tiplerinin başlangıç yaşı, yaşam süresi, *SMN2* kopya sayısı ve motor gelişim basamaklarına göre karşılaştırılması (87).

Fenotip	Başlangıç yaşı	Ortalama yaşam süresi	<i>SMN2</i> kopya sayısı	Motor gelişim basamakları
Tip 0 SMA	Prenatal	Haftalar (doğumdan sonra)	1	Baş kontrolü bulunmaz, oturamaz
Tip 1 SMA	< 6 ay	< 6–10 ay	2–3	Baş kontrolü bulunmaz, oturamaz
Tip 2 SMA	6–18 ay	25 yaş (Hastaların %75'i)	2–3	Bağımsız oturabilir, yürüyemez ve ayakta duramaz
Tip 3 SMA	> 18 ay	Normal yaşam süresi	3–4	Bağımsız yürüyebilir
Tip 4 SMA	Erişkin yaş	Normal yaşam süresi	≥ 4	Bağımsız yürüyebilir



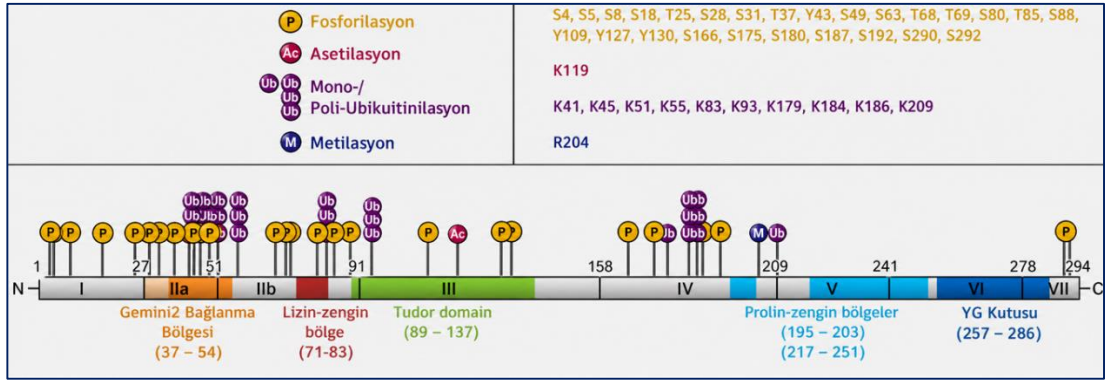
Şekil 2.6. Sağlıklı ve hasta bireylerde *SMN1* ve *SMN2* gen yapılarını karşılaştıran şematik gösterimi (90).

2.2.2. SMN Proteininin Yapısı, Fonksiyonları ve Hücresel Lokalizasyonları

SMN proteini 294 amino asitten oluşan 38 kDa moleküler ağırlığında bir proteindir. *SMN1* ve *SMN2* genlerinden kodlanan proteinin tam uzunluktaki formu çoğunlukla *SMN1* geninden sentezlenmektedir. *SMN2* geninden çoğunlukla 7. ekzonu atlanan kısa bir protein sentezlenmekle birlikte yaklaşık %10-20 oranında fonksiyonel SMN proteini üretilmektedir. SMN proteini tüm dokularda farklı düzeylerde ifade edilmekte olup özellikle beyin sapı, omurilik ön boynuz motor nöronları ve kas dokusunda ifade düzeyi yüksektir (95). SMN proteini eksikliği tüm hücrelerde işlev kaybına neden olmakla birlikte en fazla omurilikte bulunan alt motor nöronlar etkilenmekte ve dejenerasyon ortaya çıkmaktadır. SMN proteini, farklı proteinlerle etkileşimini sağlayan çok sayıda fonksiyonel domain içermektedir (Şekil 2.7) (96). SMN proteininin N-terminal bölgesi Gemin2 ve nükleik asit etkileşimlerinde görev

almaktadır. Proteinin merkezi kısmında bulunan Tudor domaini ile C-terminal bölgesindeki prolin açısından zengin domain ve YG domaini oligomerizasyon için kritik öneme sahiptir. Dimerden oktamere kadar oluşabilen bu yapı, SMN proteininin stabilitesini artırmaktadır. Ayrıca SMN proteininde *intrinsically disordered domain* (IDD) olarak adlandırılan bölgeler bulunmakta; belirli bir ikincil yapıya sahip olmayan bu bölgeler, protein-protein etkileşimleri ve faz ayrışması süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Bu özellikler sayesinde SMN; stres granülleri, Cajal body ve gem yapıları gibi membransız biyomoleküler kondensatlarda yerleşerek ve bu dinamik hücresel yapılarının organizasyonuna katkı sağlamaktadır (97,98). Mayalardan insanlara kadar birçok organizmada bulunan SMN proteininin, özellikle yüksek omurgalılarda belirli domainlerinin korunmuş olması fonksiyonel önemini göstermektedir. N-terminalin memelilere özgü sekanslar içermesi SMN'nin evrimsel süreçte yapısal ve işlevsel değişimler geçirdiğine de işaret eder (99).

SMN proteininde farklı post-translasyonel modifikasyonlar (örn. fosforilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon) bulunmakta ve modifikasyonlar SMN'nin etkileşimlerini, stabilitesini, yerleşimini ve fonksiyonlarını düzenlemektedir (Şekil 2.7). Örneğin, SMN proteininin fosforilasyonunun, proteinin hücre içi yerleşimini ve protein-protein etkileşimlerini düzenlediği bildirilmiştir. SMN'nin primer sekansında fosforilasyona uğrayabileceği düşünülen 50 amino asit tanımlanmış ve bunların 26'sı kütle spektrometrisi analizleri ile doğrulanmıştır (100). SMN'nin asetilasyonunun da hücre içerisindeki yerleşimini etkilediği gösterilmiştir. SMN, CBP ve p300 proteinleri tarafından 119. lizin (K119) amino asitinden asetillenmektedir. SMN'nin K119 asetilasyonu, SMN-pozitif Cajal cisimciklerinin azalmasına ve SMN'nin sitoplazmada birikmesine neden olmaktadır. Ayrıca K119 asetilasyonu, SMN'nin yarı ömrünü etkilemekte ve sitoplazmik difüzyon hızını azaltmaktadır. Bunun yanı sıra, SMN interaktom analizleri K119 asetilasyon durumunun, SMN'nin Cajal cisimciği fonksiyonlarında görev alan proteinlerle olan etkileşimlerini düzenlediğini de göstermiştir (101)



Şekil 2.7. SMN proteininin domainlerinin, karşılık gelen ekzonların ve post-translasyonel modifikasyonlarının şematik gösterimi (100).

SMN proteini hücre içerisinde; çekirdekte, Golgi kompleksinde ve sitoplazmada bulunmaktadır. Çekirdekteki yerleşiminin Cajal ve Gem cisimciklerinde olduğu bilinmektedir. Cajal cisimciği, çekirdekçiğe yakın konumlanan ve bazı hücre tiplerinde (örn. nöronlar) bulunan, 0.2–2.0 μm çapında yuvarlak membransız nükleer yapılardır. İçeriğinde coilin ve fibrillarin proteinleri yer alır. Küçük nükleer ribonükleoproteinlerin (snRNP) biyogenezi ve olgunlaşmasında, ayrıca histon mRNA işlenmesinde görev almaktadır. SMN proteininin coilin ile interaksyonu olduğu ve SMN kaybının Cajal cisimciği sayısını etkilediği bildirilmiştir (102, 103). Cajal cisimciğine yakın yerleşim gösteren Gem cisimciğinin işlevi tam olarak bilinmemektedir; ancak snRNP biyogenezinde Cajal cisimciği ile birlikte rol oynadığı düşünülmektedir. Cajal cisimciğinin aksine içeriğinde coilin proteini bulunmamakta olup en önemli bileşeni SMN proteinidir. SMN, diğer Gemin grubu proteinlerle birleşerek heterometrik yapıdaki SMN kompleksini oluşturmakta ve *splicing* mekanizmasında işlev görmektedir. SMN genindeki çoğunlukla delesyon tipi mutasyonlar nedeniyle hücre çekirdeğinde Gem sayısı azalmaktadır (102).

SMN proteini sitoplazmada yaygın olarak bulunmakta; nöronlarda hücre gövdesinde, aksonda, dendritlerde ve aksonun uç kısmındaki büyüme bölgelerinde yerleşim göstermektedir. Fare primer nöron kültürleri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, SMN'nin nöritlerde ve büyüme bölgesinde granüller halinde bulunduğu gösterilmiş; mikofilament ve mikrotübüllerin farmakolojik olarak yıkılması ile SMN yerleşiminin bozulduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, SMN'nin hücre içinde iki yönlü olarak taşındığı saptanmış ve ekzon 7 delesyonunun SMN'nin çekirdekten çıkışını bozarak, birikimine neden olduğu gösterilmiştir (104). Bununla birlikte, SMN'nin

aksonal taşınmasına aracılık eden moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Yakın dönemde gerçekleştirilen bir çalışmada, AAV9 aracılı SMN gen replasmanı uygulanan farelerin motor nöronlarında, SMN proteininin sitoplazmada biriktiği, *splicing*'in bozulduğu, transkriptomun değiştiği; bu durumun ilerleyen dönemde motor disfonksiyona ve nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (105).

SMN proteini temel olarak çekirdek ve sitoplazmada bulunmakla birlikte, özellikle nöronlarda Golgi'de lokalize olabilmektedir (106, 107). Her ne kadar Golgi'nin yapısal bir bileşeni olmasa da, hücre içi protein taşınması ve veziküler trafik süreçleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. SMA hasta fibroblast hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, kontrol hücrelerinde çekirdek çevresinde kompakt şekilde bulunan Golgi kompleksinin, SMA hasta hücrelerinde morfolojik bütünlüğünün bozulduğu ve sitoplazma boyunca dağınık ve yaygın şekilde yerleşim gösterdiği saptanmıştır (108). Benzer bulgu, SMN ifadesi baskılanan motor nöron benzeri fare NSC34 hücre hattında da gösterilmiş, SMN ifadesi artırılarak hatalı Golgi morfolojisi düzeltilebilmiştir (108). Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada da benzer şekilde SMA hastalarına ait fibroblast hücrelerinde Golgi'nin fragmente olduğu belirlenmiştir. Bu hücrelerde mikrotübül asetilasyonunun azaldığı saptanmış; asetilasyonun HDAC6 inhibisyonu yoluyla farmakolojik olarak artırılması sonucunda bu hücrelerdeki Golgi fragmentasyonu kısmen düzeltilebilmiştir. Bulgularımız, SMN eksikliğinde ortaya çıkan Golgi fragmentasyonu ile mikrotübül asetilasyonundaki azalma arasında bir ilişki bulunduğunu göstermiştir (109). Bu durum, SMN proteininin Golgi organizasyonunun korunması ve veziküler taşınmanın düzenlenmesinde dolaylı bir işleve sahip olduğunu düşündürmektedir.

Literatürde SMN proteininin hücre dışına da salgılanabildiği bildirilmiştir (110). Primer fibroblast hücreleri, nöron benzeri MN1 hücre hattı ve C2C12 miyoblast hücre hattı ile gerçekleştirilen çalışmalarda SMN'nin hücre dışı ortama salgılandığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, SMN proteininin eksozomlar ve mikroveziküller içerisinde bulunduğu da gösterilmiş; hücre içindeki SMN protein düzeyi ile hücre dışına salgılanan SMN miktarı arasında pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, SMA hastalarından elde edilen eksozomlardaki SMN düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı bildirilmiş ve bu durumun hastalık şiddetiyle ilişkili

olabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışma, eksozomal SMN düzeylerinin hastalık şiddeti ve tedavi yanıtının izlenmesinde potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür. Ancak, salgılanan SMN proteininin hedef hücrelerdeki spesifik etkileri ve moleküler mekanizmaları bilinmemektedir (110). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, hücre dışına salgılanan SMN proteinin tedavi amaçlı kullanılabileceği öne sürülmüştür. Bu kapsamda, insan karaciğer kökenli HepG2 hücrelerinde SMN proteini aşırı eksprese edilmiş ve böylece bu hücrelerden salgılanan hücre dışı veziküllerin yüksek miktarda SMN taşıması sağlanmış, ardından bu hücre dışı veziküller, alıcı A549 (insan akciğer adenokarsinomu) hücre hatlarına uygulamıştır. Hücre dışı veziküllerin hedef hücrelere SMN proteinini aktardığı, proteinin hücre çekirdeğine ulaşp Gemin2 ile birleşerek fonksiyonel “nuclear gem” yapıları oluşturduğu gösterilmiştir. Bulgular, hücre dışı veziküllerin biyolojik olarak aktif SMN proteinini hücreler arasında taşıyabildiğini ve gelecekte SMA için protein temelli yeni tedavi stratejilerinde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır; ancak çalışma yalnızca hücre kültürü düzeyinde gerçekleştirilmiştir (111).

Fizyolojik koşulların yanı sıra, hücresel stres durumunda da SMN’nin sitoplazmadaki noktasal cisimcikler olan stres granüllerinde yerleşim gösterdiği bildirilmiştir (112). Stres granülleri, yüksek sıcaklık, hipoksi ya da kimyasal maruziyet gibi stres durumlarında hücre canlılığını korumak ve stresin etkilerini hafifletmek için sitoplazmada hızlı şekilde oluşan geçici yapılardır. Nörodejeneratif hastalıklarda (ör: ALS), kronik stres durumunda stres granüllerinin dağılmadığı ve aberan stres granüllerine dönüştüğü gösterilmiştir (113). SMA modelleri ile yapılan çalışmalarda ise, SMN’nin stres granülü oluşumunda görev aldığı ve SMN eksikliği durumunda granül oluşamadığı gösterilmiştir (114).

Farklı hücresel kompartmanlarda bulunan SMN proteininin çok sayıda interaksiyon partneri bulunmakta ve farklı hücresel mekanizmalarda görev almaktadır. SMN, sitoplazmada snRNP’leri biraraya getirerek, kompleks halinde hücre çekirdeğine taşınmakta ve bu sayede *splicing’in* gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Ayrıca, SMN, RNA bağlayıcı proteinlerle birlikte, akson boyunca mRNA transportunu (örn. beta aktin mRNA) sağlamakta; böylece büyüme bölgesindeki hücre iskelet yapısının düzenlenmesini ve sinaptik proteinlerin lokal translasyonunun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bunların yanı sıra SMN proteini, translasyon,

ubikuitin homeostazı, mitokondri transportu ve biyoenerjetik yollar, sinaptik vezikül yerleşimi ve salgılanması gibi nöronlar için elzem olan süreçlerle de ilişkilendirilmiştir (95) (Şekil 2.8.). Farklı hücresel fonksiyonlarından dolayı, SMN eksikliği, insan dışındaki diğer canlılarda embriyonik letalite ile sonuçlanmaktadır. SMA modelleri ile yapılan çalışmalarda akson ve dendrit uzaması, dallanması ve aksonal transportta hatalar olduğu gösterilmiştir. Nöronal morfoloji ve fonksiyonda meydana gelen bu değişiklikler, hücre iskeleti üzerine yapılan araştırmaların artmasına neden olmuş; SMA modellerinde aktin filamentleri, nörofilamentler ve mikrotübüllerde çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişiklikler tespit edilmiştir (115-119).



Şekil 2.8. SMN proteininin hücre içerisindeki yerleşimi ve işlevlerinin şematik gösterimi (97. referanstan uyarlanarak, Biorender ile oluşturulmuştur).

2.2.3. SMN Eksikliğinde Mikrotübül İskeleti ile İlişkili Hatalar

SMA patomekanizmasında mikrotübüllerin rolü detaylı araştırılmamış olmakla birlikte, az sayıda çalışmada, SMA hastalık modellerinde mikrotübül yapısında ve mikrotübül ile ilişkili proteinlerde ifade/post-translasyonel modifikasyon değişiklikleri saptanmıştır. SMN ifadesi baskılanan nöron benzeri hücrelerde ve SMA'nın ciddi formunu yansıtan bir fare modeline ait omurilik dokusunda mikrotübül depolimerizasyonundan sorumlu statmin proteininin ifadesi yüksek bulunmuş, ancak statmin ifadesi azaltılan farelerde motor nöron ölümünün engellenemediği ve ömür uzunluğunun değişmediği saptanmıştır (120,121). Hastalığın hafif formunu yansıtan bir fare modelinde ise motor nöronlarda statmin ifadesinde azalma rapor edilmiş, ifadenin artırılması yoluyla hastalık fenotipi düzeltilebilmiştir (122). Hastalara ait indüklenmiş pluripotent kök hücre kökenli motor nöron hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise mikrotübül yapısının kurulumunda görevli olan β III tübülün proteininin

ifadesinde azalma saptanmıştır (123). Başka bir çalışmada ise, SMA'nın ciddi formuna ait bir fare modelinden kurulan motor nöronlarda ve hasta omurilik dokularında, mikrotübül stabilitesinin sağlanmasından sorumlu TAU proteininin hiperfosforile olduğu saptanmış; hiperfosforile TAU hastalara ait omurilik doku kesitlerinde de gösterilmiştir. TAU hiperfosforilasyonunun mikrotübül stabilitesi üzerine etkisi araştırılmamış olmakla birlikte, SMA'lı farede TAU *knock-out* edildiğinde sinir-kas kavşağı denervasyonu ile motor nöron dejenerasyonu düzeltilebilmiştir (124). Kinezin-1 motor protein ailesinden KIF5A'nın araştırıldığı bir çalışmada, fare ve İPSC kökenli insan motor nöronlarında, SMN eksikliğinin KIF5A mRNA stabilitesini azaltarak mRNA yıkımını artırdığı ve buna bağlı olarak KIF5A protein düzeylerinin düşmesine yol açtığı, aksonal transportunun ve aksonal rejenerasyonun bozulduğu gösterilmiştir. KIF5A'nın ifadesi arttırıldığında saptanan hataların düzeldiği bildirilmiştir (125). Başka bir çalışmada, SMA fare modeline ait omurilik dokularında miR-140-3p isimli mikroRNA'nın ekspresyonunun arttığı belirlenmiş ve bu artışın, aksonal taşımada görev alan motor proteinlerden KIF5A'nın düzeyinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. miR-140-3p'nin KIF5A mRNA'sı ile doğrudan etkileştiği saptanmış; farelere uygulanan miR-140-3p antagomiri sonrasında hastalık şiddetinde azalma saptanmıştır (126).

Grubumuzun mikrotübüller ile gerçekleştirdiği çalışmalarda, *in vitro* nöronal SMA modelinde, mikrotübül asosiye proteinlerden MAP1B'nin ifadesinin ve fosforilasyonunun arttığı; bu artışın TTL düzeyini etkileyerek α -tübülün detirozinasyonunda azalmaya neden olduğu ve mikrotübül stabilitesinin azaldığı gösterilmiştir. MAP1B ifadesinin baskılanması sonucunda α -tübülün detirozinasyon düzeyinin ve hatalı mitokondri yerleşiminin düzeltilebilmesi mümkün olmuştur (49). Aynı hücresel modelde gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, MAP1B ile etkileşimi bulunan ve mikrotübüllerin pozitif ucunda yerleşen EB3 proteininin ifadesinin azaldığı ancak mikrotübül uçlarında oluşturdıkları comet sayısının arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu, proksimalde yerleşim gösteren mikrotübüllerin daha dinamik olduğuna işaret etmiştir (127). Başka bir çalışmamızda stabil mikrotübüller üzerinde biriken, bu nedenle de stabilite belirteci olarak bilinen diğer bir α -tübülün modifikasyonu olan asetilasyona odaklanılmış; SMA hastalarına ait fibroblast hücrelerinde, ayrıca *Drosophila melanogaster* SMA modelinde asetilasyonda azalma saptanmıştır.

Hücrelerde deasetilasyondan sorumlu olan HDAC6 enzimi farmakolojik olarak inhibe edilerek α -tübülün asetilasyonu arttırıldığında, SMN eksikliğinde gözlenen Golgi fragmentasyonu kısmen düzeltilebilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, SMA hastalarına ait fibroblastlarda α -tübülün asetilasyon düzeyi ile Golgi fragmentasyonu arasında bir ilişkili olduğu belirlenmiştir (109).

SMA modelleri ile gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımız, SMN eksikliğinde mikrotübüllerle ilişkili proteinlerin ifadelerinde ve post-translasyonel modifikasyonlarında değişiklikler olduğunu ve bu değişikliklerin mikrotübül stabilitesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Mikrotübüller, hücrelerde hareket ile ilgili tüm süreçlerde görev alan temel hücre iskeleti elemanı olduğundan, SMA'da saptadığımız mikrotübül stabilite kaybının, hücrelerde az miktarda bulunan işlevsel SMN proteininin transportunu, yerleşimini ve dolayısıyla işlevlerini etkilemesi olası görülmüştür. Çalışmalarımız ve literatür bilgilerinin ışığında, SMN eksikliğinde görülen mikrotübül stabilite kaybının düzeltilmesi ile SMN proteininin transportunun ve yerleşiminin değişeceği hipotezi kurulmuştur. Bu tez çalışmasındaki amacımız; *in vitro* nöronal SMA modelinde α -tübülün modifikasyonlarının değiştirilmesi yoluyla mikrotübül stabilitesinin arttırılmasını sağlayarak, SMN proteininin hücre içi transportunun ve hücre dışına salgılanmasının araştırılması ve buna ilişkin mekanizmaların açıklanmasıdır. Bir diğer amacımız ise, mikrotübül stabilitesinin arttırılması yaklaşımının, SMA hastalığının tedavisinde kullanılan SMN arttırıcı tedavilerin etkinliğini yükselterek SMA'nın kombine tedavisi için uygunluğunun değerlendirilmesidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Kültürü

Tez çalışmaları kapsamında, daha önce SMN eksikliğinde mikrotübül stabilitesinin azaldığını gösterdiğimiz *in vitro* model olan fare motor nöron benzeri NSC34 hücre hattı ile çalışılmıştır. Bu hibrit hücre hattı, 1992 yılında fare nöroblastoma hücreleri ile omurilik motor nöronlarının füzyonu sonucunda elde edilmiştir (128). NSC34 hücreleri Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr. Altan Günalp Araştırma Laboratuvarı stoğundan temin edilmiştir. Hücre hattının kullanımı için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığı'na yaptığımız başvurunun (Tarih:24.01.2023 Karar No:52338575- 16) sonucunda çalışmamızın etik kurul kapsamı dışında olduğu bildirilmiştir (Bkz: Ek 1). NSC34 hücrelerinin kültür şartları aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

Hücre Proliferasyonunu Sağlayan Kültür Ortamı:

DMEM 4,5 g/l D-glukoz (<i>Gibco, Glutamax</i>)	: 94 ml
Fetal sığır serumu (%5, <i>Biowest</i>)	: 5 ml
Penisilin/Streptomisin (%1, <i>Biowest</i>)	: 1 ml

Hücre Farklılaşmasını Sağlayan Kültür Ortamı:

DMEM 4,5 g/l D-glukoz (<i>Gibco, Glutamax</i>)	: 98 ml
Fetal sığır serumu (%1, <i>Biowest</i>)	: 1 ml
Penisilin/Streptomisin (%1, <i>Biowest</i>)	: 1 ml

Hücre Pasajlama Ortamı:

Trypsin/EDTA (<i>Biowest</i>)	: 5 ml
1X PBS (<i>Medicago</i>)	: 5 ml

Hücre Dondurma Ortamı:

Hücre çoğaltma ortamı : 900 µl

Dimetil sülfoksit (DMSO, %10, *Sigma-Aldrich*) :100 µl

Hücre Sayımı:

Tripan mavisi (%0,4 , ThermoFisher)

Cedex XS Hücre Analiz Cihazı (Roche)

Hücre Görüntüleme:

Trinoküler Floresan Ataçmanlı Inverted Mikroskop (Leica DMIL)

3.1.2. siRNA Transfeksiyonu ile Gen İfadesinin Baskılanması

Opti-MEM (*Gibco*)

Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*)

siRNA Dizileri (*Eurofins ve ThermoFisher*)

Smn1 siRNA dizisi: 5' CAGAAGUAAAGCACACAGCAA-dTdT 3'

Ttl siRNA (1) dizisi: ThermoFisher Silencer Select Pre-designed siRNA (s88170)

Ttl siRNA (2) dizisi: 5' AAACACCUCCCUUACCAGAGC -dTdT 3'

KIF5C siRNA (1) dizisi: ThermoFisher Silencer Select Pre-designed siRNA (s68784)

KIF5C siRNA (2) dizisi: 5' GCACCAACGAUGUGAAGACUC -dTdT 3'

Scrambled kontrol siRNA dizisi: 5' AUACGAACGGAACGAACAACA-dTdT 3'

3.1.3. Hücre İçi Stres Granülü Oluşturulması

Sıcaklık inkübatörü

3.1.4. Hücre İçi Protein İzolasyonu

RIPA Lizis ve Ekstraksiyon Tamponu (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, %1 NP-40, %1 sodyum deoksikolat ve %0.1 SDS)

Proteaz inhibitör tablet (Roche)

Fosfataz inhibitör tablet (PhosStop, Roche)

Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 16 R)

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

3.1.5. Hücre Dışı Protein İzolasyonu

Trikloroasetik asit (%20)

dH₂O : 25 ml

Trikloroasetik asit (Sigma) : 5 gr

RIPA Lizis ve Ekstraksiyon Tamponu : 125 µl

(25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, %1 NP-40, %1 sodyum deoksikolat ve %0.1 SDS)

3.1.6. Protein Konsantrasyon Tayini

Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Pierce, *Thermo Scientific*)

Spektrofotometre (*SpectraMax M*, Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices))

3.1.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Toplayıcı Poliakrilamid Jel (%4, pH:6,8):

dH₂O : 3,1 ml

0.5 M Tris (pH 6,8) (Applichem) : 1,25 ml

Akrilamid/Bisakrilamid (%40) : 0,5 ml

%10 SDS (Carlo Erba) : 50 µl

TEMED (<i>Sigma-Aldrich</i>)	: 5 µl
APS (%10)	: 50 µl

Ayırıcı Poliakrilamid Jel (%12, pH:8,8):

dH ₂ O	: 3,4 ml
1.5 M Tris (pH 6,8) (Applichem)	: 2,0 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	: 2,4 ml
%10 SDS (Carlo Erba)	: 80 µl
TEMED (<i>Sigma-Aldrich</i>)	: 8 µl
APS (%10)	: 80 µl

Akrilamid-Bisakrilamid (%40):

Akrilamid (<i>Sigma</i>)	: 19,56 g
Bisakrilamid (<i>Sigma</i>)	: 0,54 g

dH₂O ile 50 ml'ye tamamlanır.

Amonyum Persülfat (APS) (%10):

Amonyum Persülfat (<i>Sigma</i>)	: 0,1 g
------------------------------------	---------

dH₂O ile 1 ml'ye tamamlanır.

Yükleme Tamponu (5X *Laemmli Buffer*):

1M Tris Baz (pH 8.0) (Merck)	: 5 ml
Gliserol (<i>Sigma</i>)	: 5 ml
SDS (<i>Sigma</i>)	: 1,5 g
Brom Fenol Mavisi	: 5 mg
2-Merkaptoetanol (<i>Sigma</i>)	: 2,5 ml

3.1.8. Western Blot

Protein moleküler ağırlık belirleyicisi - *Precision Plus Protein Dual Color Standards Marker (BioRad)*

Nitroselüloz Membran (*BioRad*)

Ponceau-S (Sigma)

Coomassie Brilliant Mavisi

Mini protean elektroforez sistemi ve güç kaynağı (*Biorad*)

SuperSignal™ West Femto Kemilüminesans Substrat Kiti (*ThermoFisher*)

GeneGnome5 Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı (*Syngene*)

Solüsyonlar:

5X Elektroforez (Yürütme) Tamponu (stok solüsyon):

Tris Baz (pH: 8.0) (Sigma)	: 15,15 g
Glisin (Sigma)	: 72 g
SDS (Sigma)	: 5 g

dH₂O ile 1L olarak hazırlanır.

1X Elektroforez Tamponu:

5X stok solüsyonu	:
200 ml dH ₂ O ile 1L olarak hazırlanır.	

5X Transfer Tamponu (stok solüsyon):

Tris Baz (pH: 8.0) (Sigma)	: 15,15 g
Glisin (Sigma)	: 72 g

dH₂O ile 1L olarak hazırlanır.

1X Transfer Tamponu:

5X stok solüsyon : 200 ml

Metanol (%100) : 200 ml

dH₂O ile 1L olarak hazırlanır. Taze hazırlanır.

10X TBS - Tris Buffered Saline (pH:7.6):

Tris Baz (*Sigma*) : 24,4 g

NaCl (*Sigma*) : 80 g

dH₂O ile 1L olarak hazırlanır.

1X TBS-T - Yıkama Tamponu (pH:7.4):

10X TBS stok solüsyon : 200 ml

Tween-20 (*Sigma-Aldrich*) : 1 ml

dH₂O ile 1L olarak hazırlanır.

Bloklama Solüsyonu (%5):

Süt tozu : 0,5 g

TBS-T (%0,1) : 10 ml

Stripping Solüsyonu:

SDS (%20, pH:7,2) : 500 µl

Tris-HCl (*Sigma*) : 312 µl

2-Merkaptoetanol : 37,5 µl

dH₂O : 4,15 ml

65 °C 'de bulunan hibridizasyon fırınında 30 dk boyunca uygulanır.

Primer Antikorlar:

Anti detirozin α -tübülün primer antikor (Tavşan poliklonal, Sigma) (1:500)

Anti- α tübülün primer antikor,(Fare monoklonal, Sigma) (1:1000)

Anti-SMN primer antikor (Fare monoklonal, BD Transduction) (1:1000)

Anti-TTL primer antikor (Tavşan poliklonal, Thermo Scientific) (1:1000)

Anti-KIF5C primer antikor (Tavşan poliklonal, Proteintech) (1:1000)

Sekonder Antikorlar

Anti-fare horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikor, (1:8000),
(Sigma)

Anti-tavşan horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikor, (1:4000),
(Merck)

3.1.9. İmmünfloresan Boyama

DAPI'li Prolong Gold Antifade Kaplama Solüsyonu (Molecular Probes)

DAPI'siz Prolong Gold Antifade Kaplama Solüsyonu (Molecular Probes)

Triton X-100 (Sigma)

Keçi serumu (Sigma)

Floresan ataçmanlı *upright* mikroskop (Carl-Zeiss Axioplan 2)

Konfokal mikroskop (Leica DMI4000, Andor DSD2 differential spinning
confocal)

Fiksasyon:

%4 Paraformaldehit (PFA) (Sigma) :100 ml

1X Yıkama Solüsyonu (1X PBS, pH 7,4) (Sigma):

dH₂O : 200 ml

PBS Tablet (*Medicago*) : 1 adet

Kullanım öncesi otoklavlanır.

%20 BSA:

Sığır serum albümin (BSA) (Sigma)	: 1 g
1X PBS	: 5 ml

1000 µL solüsyonda %1 hazırlamak için %20 BSA solüsyonundan 50 µl kullanılır.

Bloklayıcı Tamponu:

Sığır serum albumin (%20 BSA)	: 150 µl
TritonX-100	: 30 µl
Keçi serumu	: 100 µl
1X PBS	: 720 µl

Primer Antikorlar:

Anti-Tirozin α -tübülin primer antikor (Sıçan monoklonal, Abcam) (1:1000)

Anti-G3BP1 primer antikor, (Tavşan monoklonal, Thermo Scientific) (1:1000)

Anti-SMN primer antikor (Fare monoklonal, BD Transduction) (1:1000)

Anti-Coilin primer antikor (Tavşan poliklonal, Thermo Scientific) (1:500)

Anti-KIF5C primer antikor (Tavşan poliklonal, Proteintech) (1:1000)

Sekonder Antikorlar:

Anti-tavşan Alexa fluor 568 sekonder antikor, kırmızı (1:500) (Thermo Scientific)

Anti-fare Alexa fluor 568 sekonder antikor, kırmızı (1:500) (Thermo Scientific)

Anti-tavşan Alexa fluor 488 sekonder antikor, yeşil (1:500) (Thermo Scientific)

Anti-fare Alexa fluor 488 sekonder antikor, yeşil (1:500) (Thermo Scientific)

Anti-sıçan Alexa fluor 488 sekonder antikor, yeşil (1:1000) (Thermo Scientific)

3.1.10. Kantitatif Mikroskopik Analizler

Mikroskopik görüntüleme sonrası nörit uzunluğu, floresan yoğunluk ve protein eş-yerleşim analizleri Fiji programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (129). Nörit uzunluk ölçümlerinde Fiji'nin '*Segmented Line*' aracı kullanılmıştır. Floresan yoğunluk analizleri '*Measure*' aracı ile gerçekleştirilmiş ve değerlendirmelerde '*integrated density*' değerleri esas alınmıştır. Proteinlerin eş-yerleşim analizinde ise Fiji'ye entegre çalışan '*Colocalization Threshold*' eklentisinden yararlanılmıştır.

3.1.11. *In silico* Protein-Protein Etkileşim Analizleri

SMN'nin motor proteinlerle olabilecek dolaylı/doğrudan etkileşimlerin araştırılabilmesi için kullanılan biyoinformatik araçlar aşağıda belirtilmiştir.

- STRING (<https://string-db.org/>) (130)
- BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) (131)

3.1.12. İstatistiksel Analizler

- GraphPad prism 10.0.0 (<https://www.graphpad.com/>) (132)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Tez çalışmaları kapsamında, daha önce SMN eksikliğinde mikrotübül stabilitesinin azaldığını gösterdiğimiz *in vitro* model olan fare motor nöron benzeri NSC34 hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürü protokolü aşağıda detaylarıyla sunulmuştur.

NSC34 Hücrelerinin Açılması

- Sıvı azot tankından çıkarılan NSC34 hücreleri 37°C su banyosunda hızlı şekilde çözüldü ve taze çoğaltma ortamı içeren 25 cm²'lik kültür kabına aktarıldı.
- Hücrelerin kültür kabı yüzeyine tutunmasını takiben, DMSO içeren dondurma ortamı uzaklaştırıldı ve yerine taze çoğaltma ortamı eklendi.
- Kültürün 72. saatinde hücreler 75 cm²'lik kültür kabına pasajlanarak kültüre devam edildi.

NSC34 Hücrelerinin Pasajlanması

- NSC34 hücreleri, kültürün sürekliliğini sağlamak amacıyla 72 saatte bir pasajlandı. Hücre yoğunluğu yaklaşık %70–85 düzeyine ulaştığında pasajlama işlemi 1:2 oranında gerçekleştirildi.
- Pasajlama öncesinde çoğaltma ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile yıkanarak ölü hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı.
- Hücrelerin üzerine 1X Tripsin-EDTA eklendi ve hücreler 37 °C etüvde 8 dk inkübe edildi.
- Tripsinin inaktivasyonu amacıyla kültür kabına 7 ml taze çoğaltma ortamı eklendi.
- Hücrelerin toplanabilmesi için yüzey yıkandı ve elde edilen süspansiyon 15 ml'lik falkon tüpüne transfer edildi.
- Hücreleri çöktürmek amacıyla süspansiyon 1000 rpm ve 5 dk 23 °C koşullarında santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant uzaklaştırıldı.

- Pellet üzerine 3 ml taze besiyeri ilave edilerek hücreler homojenize edildi
- Hücreler, toplam hacim 10 ml olacak şekilde taze çoğaltma ortamı ile birlikte yeni 75 cm²'lik kültür kaplarına aktarıldı.

NSC34 Hücrelerinin Farklılaştırılması

- Hücrelerin farklılaştırılmasını sağlamak amacıyla çoğaltma ortamı uzaklaştırıldı ve yerine %1 oranında FBS içeren farklılaştırma ortamı eklendi.
- Hücreler, 37 °C ve %5 CO₂ koşullarını sağlayan etüvde 72 saat (3 gün) süreyle inkübe edildi.

NSC34 Hücrelerinin Dondurulması

- Hücre dondurulması için NSC34 hücreleri, pasajlama aşamasındaki gibi tripsinizasyon ile kültür kabı yüzeyinden kaldırıldı ve santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet 1 ml dondurma ortamında resüspanse edildi.
- Her pasajda uygun dondurma ortamı kullanılarak hücreler 1×10^6 hücre/vial (bir 75'lik) olacak şekilde özel dondurma tüplerine (*cryotube*) alındı.
- Hücreler, %10 DMSO içeren DMEM besiyeri içerisinde hazırlandı.
- Tüpler, yavaş donmayı sağlamak amacıyla izopropanol içeren özel dondurma kabına yerleştirilerek -80 °C'de donduruldu.
- Dondurulan tüpler daha sonra sıvı azot tankı içerisine yerleştirildi.

3.2.2. siRNA Transfeksiyonu ile Gen İfadesinin Baskılanması

NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve KIF5C gen ifadeleri siRNA yöntemi kullanılarak baskılandı. SMN gen ifadesinin baskılanması için literatürde daha önce bildirilen siRNA dizisi kullanıldı (49). TTL ve KIF5C gen ifadelerinin baskılanması amacıyla ise yeni siRNA dizileri tasarlandı, siRNA dizileri tasarlanırken literatürde tanımlanan kriterler dikkate alındı. siRNA tasarımı sırasında dizilerin birbirine komplementer 21 nükleotit uzunluğunda olmasına, GC içeriğinin %30–50 aralığında bulunmasına ve ardışık tekrar eden ya da palindromik diziler içermemesine dikkat edildi. siRNA tasarımı amacıyla öncelikle Ensembl veri tabanından hedef genlere ait

transkript varyantları ve ekzon–intron organizasyonları incelendi. Genin farklı transkriptlerinde ortak olarak bulunan ekzon bölgeleri belirlendi ve siRNA hedef bölgesi seçiminde bu bölgeler tercih edildi. Daha sonra hedef genlere ait mRNA/cDNA dizileri elde edildi; siRNA tasarımı yalnızca olgun mRNA’da bulunan ekzonik diziler dikkate alındı. Ayrıca, tasarlanan siRNA dizilerinin hedef dışı bağlanma olasılığını değerlendirmek amacıyla NCBI BLAST analizi gerçekleştirildi. siRNA dizayn sürecinde Thermo Fisher Scientific tarafından sağlanan siDESIGN Center platformundan yararlanıldı. Bunun yanında, tasarlanan siRNA dizilerinin gen ifadelerini yeterli düzeyde baskılayamama olasılığı göz önünde bulundurularak, TTL ve KIF5C mRNA’larını tanıyan hazır siRNA dizileri (Thermo Fisher Scientific Silencer Select)’de temin edildi. Transfeksiyon protokollerin detayları aşağıda sunuldu.

- Hücreler transfeksiyon ve farklılaştırma deneyleri amacıyla otomatik hücre sayım cihazı (Roche Cedex®) yardımıyla sayıldı. Hücre sayımı için hücre süspansiyonu 1:1 oranında Trypan Blue çözeltisi ile karıştırıldı ve 10 ul hacimde örnek sayım slaytlarına (Ibidi) yüklendi. Slayt cihaz içerisine yerleştirilerek canlı hücre sayımı gerçekleştirildi.

- Western blot analizleri için hücreler, 6 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 2×10^5 hücre olacak şekilde ekildi.

- İmmünfloresan boyama çalışmaları için önceden steril yuvarlak lameller yerleştirilen 12 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına $2,5 \times 10^4$ hücre ekildi.

- Hücreler yüzeye tutunmalarını sağlamak amacıyla %5 CO₂ ve 37 °C koşullarındaki etüvde 24 saat inkübe edildi.

- Gen ifadesi baskılanacak hücreler için kuyucuk başına Lipofectamine 2000 transfeksiyon ajanı, Opti-MEM ve SMN siRNA (30 nM), TTL siRNA (90 nM) veya KIF5C siRNA (60 nM) içeren karışımlar hazırlandı.

- Kontrol grubu için Lipofectamine 2000 ve Opti-MEM, hedefi olmayan *scrambled* siRNA ile karıştırılarak hazırlandı.

- Hücrelerin çoğaltma ortamı uzaklaştırıldı ve transfeksiyon karışımları farklılaştırma ortamı içerisinde hazırlanarak Lipofektamin 2000 içeren karışım üzerine eklendi ve dikkatlice pipetaj yapıldı.

- siRNA içeren tüp içerikleri diğer tüpe aktarıldı ve transfeksiyon karışımları oda sıcaklığında 25 dk inkübe edildi.

- Hücrelerin üzerine %1 serum içeren farklılaştırma ortamı eklendi ve transfeksiyon karışımı damla damla ilave edilerek hücreler 72 saat süreyle farklılaştırıldı.

- 72 saatlik farklılaşma süresi sonunda Western blot analizleri için hücreler RIPA tamponu içine toplanarak protein izolasyonu gerçekleştirildi.

- İmmüno Floresan analizler için ise hücreler %4 PFA ile fikse edildi.

3.2.3. Hücre İçi Stres Granülü Oluşturulması

- NSC34 hücreleri, cam lamel içeren 12 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına $2,5 \times 10^4$ hücre ekildi.

- Hücreler gerekli inkübasyon süresi boyunca standart kültür koşullarında büyütüldü.

- Hücrelere sıcaklıkstresi uygulamak amacıyla kültür kapları sırasıyla 45 °C, 60 °C ve 90 °C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörlere yerleştirildi.

- Hücreler 1 saat boyunca ilgili sıcaklıklarda inkübe edildi.

- Sıcaklık uygulaması sonrasında hücrelerin kültür ortamı uzaklaştırıldı.

- Hücreler %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi ile oda sıcaklığında fikse edildi. Sonrasında PFA uzaklaştırılarak ve hücreler PBS ile yıkandı.

- Hücreler immüno Floresan boyama protokolüne alındı.

- Boyama işlemi tamamlandıktan sonra hücreler konfokal mikroskop kullanılarak görüntülendi.

3.2.4. Hücre İçi Protein İzolasyonu

- Western blot analizleri için 6 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 2×10^5 hücre ekilen hücreler, 72 saatlik farklılaştırma sonunda buz üzerine alındı.
- Hücrelerin üzerine 125 μ L soğuk RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponu eklendi.
- Proteaz ve fosfataz inhibisyonunu sağlamak amacıyla hücre toplama aşamasında tampona taze olarak 1:50 oranında proteaz inhibitör tablet ve 1:20 oranında PhosSTOP eklendi.
- Hücreler yüzeyden hücre kazıyıcı (*cell scraper*) kullanılarak toplandı.
- Protein izolasyonu için örnekler buz üzerinde 15 dk sonikasyon uygulandı.
- Sonrasında örnekler +4 °C ve 14.000 rpm koşullarında 20 dk santrifüj edildi.
- Proteinleri içeren süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve konsantrasyonlarını belirlemek için BCA Protein Assay Kit kullanıldı.
- Standart eğri kit içerisinde bulunan BSA ve %1 SDS ile hazırlandı, standart kullanılarak örneklerdeki protein konsantrasyonları spektrofotometrik olarak (Molecular Devices, M2) ölçüldü.

3.2.5. Hücre Dışı Protein İzolasyonu

- NSC34 hücreleri standart inkübasyon koşullarında (37 °C, %5 CO₂) kültüre edildi.
- Farklılaşmanın indüklenmesi amacıyla hücreler, düşük serum (%1 FBS) içeren kültür ortamına alındı ve siRNA transfeksiyonu uygulanmasının ardından 3 gün boyunca farklılaştırıldı.
- Hücre dışı ortama salgılanan proteinlerin izole edilmesi için farklılaştırılmış hücrelerin kültür ortamı toplanarak eppendorf tüplere alındı ve 14.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek hücre debisi uzaklaştırıldı.
- Elde edilen süpernatant dikkatlice temiz bir tüpe aktarıldı.

- Hücre dışına salgılanan proteinlerin çöktürülmesi amacıyla süpernatant üzerine %20 trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve örnekler vorteksenerek homojenize edildi.
- TCA ile muamele edilen örnekler, protein presipitasyonunu sağlamak amacıyla buz üzerinde 1,5 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında tüpler 4 °C’de 14.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek protein pelletleri elde edildi.
- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve kalan TCA’nın giderilmesi amacıyla pellet 500 µL %100 etanol ile yıkandı.
- Yıkama sonrası tüpler 14.000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Protein pelletleri RIPA lizis tamponu içerisinde çözündürüldü ve çözünürlüğü artırmak için vorteks uygulandı.
- Protein konsantrasyonları, Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit kullanılarak belirlendi.

3.2.6. Protein Konsantrasyon Tayini

- BCA Protein Assay kiti kullanılarak, hücre içi ve hücre dışı ortamdan izole edilen proteinlerin konsantrasyonları ölçüldü.
- %1 SDS içerisinde farklı BSA konsantrasyonlarına sahip standartlar, standart eğrinin oluşturulması amacıyla hazırlandı (Tablo 3.1).
- Protein örneklerinin 10 kat seyreltilmesi için, %1 SDS örneklerle eklendi.
- Çalışma çözeltisi 50A:1B oranında hazırlandı ve standartlar ile örneklerin üzerine 1’er ml eklendi.
- Tüpler alt-üst edilerek karıştırıldı ve 37 °C inkübatörde 30 dk inkübe edildi.
- Örnekler triplike olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarıldı.
- Absorbans değerleri 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (SpectraMax M2, Molecular Devices).

- Protein örnekleri Western blot çalışmalarında kullanılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ derin dondurucuda saklandı.

Tablo 3.1. Protein konsantrasyon ölçümünde standart eğri çizimi için kullanılan BSA konsantrasyonları.

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

3.2.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

- NSC34 hücrelerinden elde edilen protein örnekleri kullanılarak Western blot çalışmaları gerçekleştirildi.
- Jel elektroforezi için etanol ile temizlenen cam plakalar jel dökme aparatına yerleştirildi ve sızıntı kontrolü su ile yapıldı.
- Ayırıcı jel (%12), tarak hizasının yaklaşık 1 cm altına kadar döküldü ve jel yüzeyini düzleştirmek amacıyla üzeri dH₂O ile kaplandı.
- Jel polimerize olduktan sonra üzerindeki su uzaklaştırıldı ve toplayıcı jel (%5) dökülerek tarak yerleştirildi.
- Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra tarak çıkarıldı ve jel *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) tankına yerleştirildi ve tanka 1X elektroforez tamponu eklendi.
- Protein örnekleri, kuyucuk başına 30 μg olacak şekilde 2-merkaptoetanol içeren 5X Laemmli tamponu ile 1:5 oranında karıştırıldı.
- Proteinlerin denatürasyonu için örnekler $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 7 dk kaynatıldı (Eppendorf Thermomixer) ve ardından buz üzerine alındı.

- Jele 10 µL moleküler ağırlık belirleyicisi ve hazırlanan protein örnekleri yüklendi.
- Elektroforez, toplayıcı jel boyunca 80 V'da başlatıldı. Ardından yürütme işlemi 120 V'da yaklaşık 2 saat sürdürüldü.

3.2.8. Western Blot

Islak Transfer

- Elektroforez tamamlandıktan sonra proteinlerin jelden nitroselüloz membrana transferi ıslak (wet) transfer yöntemi ile gerçekleştirildi.
- Transfer işlemi için 9×6 cm boyutunda kesilen Whatman kağıdı (4 adet) ve nitroselüloz membran (1 adet) , transfer süngerleri ile birlikte transfer tamponunda ıslatıldı.
- Elektroforez sonrası toplayıcı jel kesilerek uzaklaştırıldı ve ayırıcı jel transfer tamponu içine alındı.
- Islak transfer kaseti, siyah kenardan başlayacak şekilde sırasıyla sünger, 2 adet Whatman kağıdı, jel, nitroselüloz membran, 2 adet Whatman kağıdı ve sünger yerleştirilerek kapatıldı.
- Kasetler transfer tamponu içeren tanka yerleştirildi ve sisteme buz kalıbı eklendi .
- Proteinlerin jelden nitroselüloz membrana transferi 120 V'da 1,5 saat gerçekleştirildi.
- Transfer etkinliği, membranın Ponceau S ile boyanmasıyla kontrol edildi.

Bloklama ve Antikor İnkübasyonları

- Transfer sonrası özgül olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla membran, %5 süt tozu içeren bloklama solüsyonunda oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklandı.
- Analiz edilmek istenen proteinlere özgü primer antikorlar, “Gereçler” bölümünde belirtilen oranlarda %5 süt tozu içerisinde hazırlandı ve membran ile +4 °C’de gece boyunca inkübe edildi.

- Ertesi gün primer antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve membran TBS-T ile 3 kez, her biri 10 dk olacak şekilde yıkandı.
- Membran, horseradish peroksidaz (HRP) ile işaretli uygun sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında membran TBS-T ile 3 kez, her biri 10 dk olacak şekilde yıkandı.
- İşaretlenen proteinlerin görüntülenmesi için kemilüminesans substratı 1:1 oranında hazırlandı ve membran bu solüsyon ile 3 dk inkübe edildi.
- Protein bantları *GeneGnome* kemilüminesans görüntüleme sistemi kullanılarak uygun pozlarda görüntülendi.
- Normalizasyon amacıyla membran, bağlı antikorların uzaklaştırılması için stripping solüsyonu ile 65 °C’de hibridizasyon fırınında 30 dk muamele edildi.
- Membran TBS-T ile 3 kez, her biri 10 dk olacak şekilde yıkandı.
- Normalizasyon amacıyla ifadesi değişmeyen total α -tübulini tanıyan primer antikor ve uygun sekonder antikor inkübasyonları gerçekleştirildi.
- Hücre dışına salgılanan proteinlerin normalizasyonu amacıyla membran ponceau S ile boyandı ve total well kantitasyonu yapıldı.
- Protein bantları ImageJ programı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edildi.

3.2.9. İmmünfloresan Boyama

Fiksasyon

- NSC34 hücreleri, immünfloresan boyama çalışmaları için 12 kuyucuklu kültür kapları içerisindeki steril yuvarlak lameller üzerine kuyucuk başına $2,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde ekildi.
- Hücrelerin üzerine 800 μ L çoğaltma ortamı eklendi.
- Hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla kültür kapları 37 °C ve %5 CO₂ koşullarındaki etüvde bir gece inkübe edildi.

- Ertesi gün çoğaltma ortamı uzaklaştırıldı ve %1 serum içeren farklılaşma ortamı ile birlikte siRNA transfeksiyonu uygulandı.

- İnkübasyon süresi sonunda immünfloresan boyama için hücreler %4 paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığında 15 dk fikse edildi.

- Fiksasyon sonrası PFA uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile 2 kez, her biri 5 dk olacak şekilde yıkandı.

Bloklama ve Antikor İnkübasyonları

- Hücreler fikse edildikten sonra non-spesifik bağlanmayı önlemek amacıyla bloklama solüsyonu (%10 keçi serumu, %3 BSA ve %0,3 Triton X-100 içeren PBS) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

- Görüntülenmesi hedeflenen proteinlere özgü primer antikorlar, “Gereçler” bölümünde belirtilen dilüsyon oranlarında bloklama solüsyonunda hazırlandı ve hücreler +4 °C’de gece boyunca inkübe edildi.

- Ertesi gün primer antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile 4 kez, her biri 5 dk olacak şekilde yıkandı.

- Alexa-fluor işaretli uygun sekonder antikor bloklama solüsyonunda hazırlanarak hücrelere oda sıcaklığında 1 saat uygulandı.

- Sekonder antikor inkübasyonu sonrası hücreler 1X PBS ile tekrar 4 × 5 dk yıkandı.

- Eş-boyama yapılan deneylerde ikinci primer–sekonder antikor seti aynı koşullar altında ardışık olarak uygulandı.

- Son aşamada hücreler DAPI içeren mounting medium ile lam–lamel arasında kapatılarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi.

- Preparatlar floresan ataçmanlı mikroskop veya konfokal mikroskop kullanılarak görüntülendi ve fotoğraflar elde edildi.

- Elde edilen fotoğraflar Fiji programına aktarıldı ve kantitatif analizler kör (*blinded*) olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.10. Kantitatif Mikroskobik Analizler

Eş-yerleşim Analizleri

1) SMN İçeren Cajal Cisimcik Sayısının Belirlenmesi

Çekirdekte bulunan SMN proteini Cajal cisimcik ve Gem içerisinde lokalize olabilmektedir. Cajal cisimcikler, Gem’lerden farklı olarak coilin proteini içermektedir. Tez çalışmasında hem Gem yapılarının hem de Cajal cisimciklerinin ayrı ayrı analiz edilmesi hedeflenmiş; coilin ile eş-yerleşim gösteren SMN sinyalleri Cajal cisimcikleri, yalnızca SMN pozitif olan yapılar ise Gem olarak değerlendirilmek üzere planlanmıştır. Ancak elde edilen boyama sonuçlarında tek başına SMN sinyali gözlenmediğinden Gem yapıları analiz edilememiş, değerlendirmeler yalnızca Cajal cisimcikleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Görüntü analizlerine ait detaylar aşağıda belirtilmiştir.

- Konfokal mikroskop ile 100x objektifte çekilen fotoğraflar, Fiji programına aktarıldı.
- Images → Stack → Stack to Images seçeneği kullanıldı.
- Multi-point tool kullanılarak, 100 çekirdek içerisindeki coilin ve SMN sinyalinin birlikte lokalize olduğu ve sarı renkte görülen Cajal cisimcikler sayıldı.

2) SMN-G3BP1 Stres Granülü Belirteci Eş-yerleşim Analizi

SMN’nin stres granülleri içerisindeki yerleşiminin analizi için stres granülü belirteci olan G3BP1 proteini ile eş-boyama çalışmaları yapılmıştır. İmmünofloresan eş-boyamalara ait fotoğraflar kullanılarak NSC34 hücrelerinde SMN ve G3BP1 proteinlerinin eş-yerleşim analizleri gerçekleştirildi. Proteinlerin eş-yerleşim analizinde, Fiji programına entegre çalışan “Colocalization Analysis” aracının “Colocalization Threshold” eklentisinden yararlanıldı. Analiz basamakları aşağıda sunulmuştur.

- Fiji programı açılarak iki ayrı kanalda çekilen fotoğraflar (Channel 1: SMN, Channel 2: G3BP1) programa aktarıldı.
- Fotoğraflar 8-bit formatına dönüştürüldü.

- Channel 1 ve Channel 2 ayarlandıktan sonra, Channel Combination seçeneği “Red to Green” olarak belirlenildi.

- “Colocalization Analysis” eklentisi içerisinde yer alan “Intensity Correlation Analysis” çalıştırılarak her iki kanaldan elde edilen sinyallere göre Pearson Korelasyon Katsayısı (Rcoloc) değerleri hesaplandı.

- Rcoloc değeri $-1 < Rcoloc < 1$ aralığında olup, 1 değeri tam eş-yerleşimi, 0 değeri ise eş-yerleşim olmadığını ifade etmektedir.

Floresan Yoğunluk (Floresan intensity) Analizi

SMN’nin nörit başlangıcı ve ucundaki yerleşimdeğişimlerinin araştırılabilmesi amacıyla floresan yoğunluk analizi gerçekleştirilmiştir. Floresan yoğunluk analizlerine, nörit uzunluğu hücre gövdesi çapının en az iki katı olan hücreler dahil edilmiştir. Aynı hücrede nörit başlangıcından ve nörit ucundan görüntü alınması mümkün olabilen hücreler analiz edilmiştir. Gövde ve nörit ucunda diğer hücrelerle çakışma gösteren hücreler, sinyal karışmasına neden olabileceği için analize dahil edilmemiştir. Nörit dallanması olması durumunda en uzun uzantının ucu analiz edilmiştir.

- Konfokal mikroskop ile 40x objektif ile çekilen fotoğraflar Fiji programına aktarıldı.

- Arka plandan gelen sinyalin karışmasını engellemek amacıyla program içerisinde aşağıdaki adımlar uygulandı;

- Process → Subtrack background → Rolling ball radius: 50.0 pixels

- Fotoğrafları gri tonlamaya çevirmek için şu adımlar uygulandı;

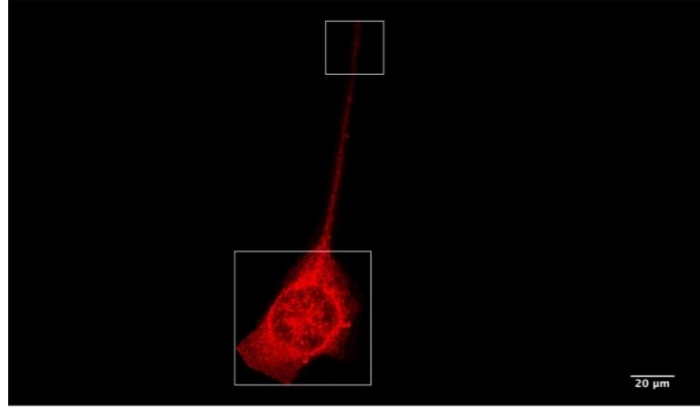
- Image - Type - 8 bit

- Konfokal mikroskopta kullanılan 40x objective için bilgiler *set scale* kısmına, ‘Distance in pixels: 63.4, Known distance: 10.14, Pixel aspects ratio: 1.0, Unit of length: um’ bilgileri girilerek, Scale: 6.2525 pixels/um olarak belirlendi.

- Hücreler incelenerek, hücre gövdesini ve nörit ucunu içine alacak bir kare çizildi. Hücrelerin çoğunda 200 μm^2 ’lik alanın hücre gövdesini, 40 μm^2 ’lik alanın ise

nörit ucunu kapsadığı görüldü. Tüm analizlerde aynı bölgelerin objektif olarak değerlendirilebilmesi amacıyla kutu alanı sabit tutuldu ve tüm analizlerde kullanıldı.

- Hücrelerin gövde ve büyüme uçları bu alanlar içerisine alındı ve ROI Manager içerisinde “Measure” sekmesi kullanılarak floresan yoğunluk ölçümleri yapıldı. Örnek bir fotoğraf Şekil 3.1’de sunulmuştur.



Şekil 3.1. NSC34 hücrelerinde, hücre gövdesi ile nörit büyüme ucunda sabit alanlarda gerçekleştirilen floresan yoğunluk analizi örnek fotoğraf.

- Sinyal değeri, seçili alana oranlanarak hesaplanan “Integrated Intensity” değerleri üzerinden değerlendirildi.
- Elde edilen sonuçlar GraphPad programına aktarıldı ve veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

Nörit Uzunluğu Analizi

Nörit uzunluğunun değerlendirilmesi amacıyla, hücreler tirozin α -tübülin boyaması sonrası görüntülenmiştir. Nörit uzunluğu analizinde, hücrelerin çekirdek sınırından büyüme ucuna kadar olan mesafe ölçülmüş ve deney grupları arasındaki morfolojik farklılıklar değerlendirilmiştir.

- Konfokal mikroskopta 40x objektif kullanılarak elde edilen görüntüler Fiji programına aktarıldı ve görüntü analizleri 20 μ m ölçek çubuğu referans alınarak gerçekleştirildi.

- Fotoğraflar 8-bit formatına dönüştürüldü.

- Her hücre için bir nörit analiz edildi; birden fazla nörit bulunan hücrelerde en uzun olan seçildi.
- ‘Segmented line’ aracı kullanılarak nörit başlangıcından ucuna kadar olan uzunluklar kaydedildi.
- “Measure tracing” seçeneği ile uzunluklar μm cinsinden ölçüldü ve program tarafından elde edilen değerler arasındaki “length” parametresi GraphPad programına aktarıldı.

3.2.11. *In silico* Protein-Protein Etkileşimi Analizleri

- SMN proteini ile motor proteinler (kinezin ve dinein ailesi üyeleri) arasındaki doğrudan ve/veya dolaylı protein-protein etkileşimlerini incelemek amacıyla *in silico* etkileşim ağı analizleri gerçekleştirildi.
- Literatür taraması ve protein ailesi sınıflandırmaları temel alınarak kinezin ve dinein ailelerine ait motor protein genleri belirlendi ve analizlerde kullanılmak üzere sorgu listesi oluşturuldu.
- Analizlerde organizma olarak *Mus musculus* seçildi.
- Motor protein listesinin belirlenmesinin ardından, SMN ile motor proteinler arasındaki orta güvenilirlik düzeyindeki (combined score ≥ 0.400) etkileşimler STRING veri tabanı kullanılarak tarandı ve elde edilen etkileşim verileri ileri düzey ağ analizi için dışa aktarıldı.
- Ayrıca, SMN proteininin motor proteinlerle deneysel olarak doğrulanmış fiziksel etkileşimlerinin varlığını değerlendirmek amacıyla BioGRID veri tabanı üzerinde tarama yapıldı. Yapılan sorgulama sonucunda, SMN ile kinezin veya dinein ailesi üyeleri arasında deneysel olarak doğrulanmış doğrudan fiziksel bir etkileşim saptanmadığından STRING veri tabanından elde edilen dolaylı ilişkiler fonksiyonel/ortak bağlamli etkileşimler olarak değerlendirildi ve bu etkileşimler aday motor protein seçiminde kullanıldı.

3.2.12. Deneysel Sonuçların İstatistiksel Analizi ve Değerlendirilmesi

- Kemilüminesans görüntüleme sonucunda elde edilen proteinlere ait bantlar ImageJ programı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edildi.
- Verilerin istatistiksel değerlendirmeleri için *GraphPad Prism 10* programı kullanıldı. Yararlanılan istatistiksel testler şekil altyazılarında belirtildi.
- * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

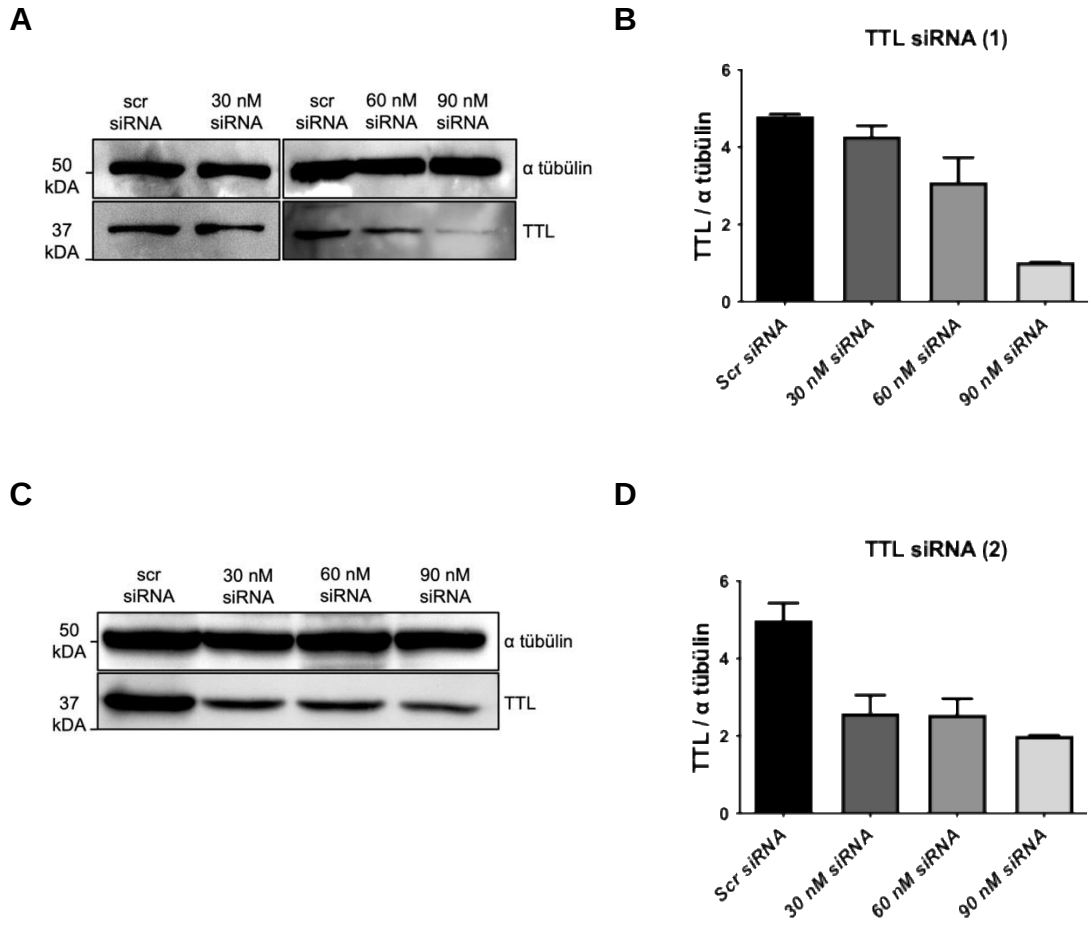
4.1. *In vitro* SMA Modelinde α -Tübülün Detirozinasyonunun Arttırılması

Grubumuzun önceki çalışmalarında, motor nöron benzeri NSC34 hücre hattında SMN gen ifadesi baskılandığında, stabil mikrotübül belirteci olan detirozinlenmiş α -tübülün düzeyinde azalma olduğu gösterilmiş ve SMN eksikliği nedeniyle mikrotübül stabilitesinin azaldığı belirlenmiştir (49). Bu nedenle, tez çalışmaları kapsamında ilk önce *in vitro* SMA modelinde, azalan α -tübülün detirozinasyonunun arttırılmasına yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla, α -tübülün tirozinasyonundan sorumlu TTL enziminin ifadesi siRNA yöntemi ile baskılanmış; detirozinlenmiş α -tübülün düzeyi arttırılarak SMN transportunun araştırılacağı hücresel model oluşturulmuştur. Gerçekleştirilen çalışmalara ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.1.1. NSC34 Hücrelerinde TTL Gen İfadesi Baskılama Koşullarının Belirlenmesi

NSC34 hücrelerinde TTL gen ifadesinin daha önce baskılanmamış olması nedeniyle, TTL mRNA'sını tanıyan iki farklı siRNA dizisi ile baskılama çalışmaları yürütülmüştür. Bu siRNA dizilerinden bir tanesi (TTL siRNA (1)) 'Yöntemler' bölümünde anlatıldığı şekilde 6. ekzonu hedefleyecek şekilde tasarlanmıştır. Ayrıca, TTL mRNA'sını 5. ekzondan tanıyan ticari bir siRNA dizisi de (TTL siRNA (2), Thermo Silencer Select) satın alınmıştır. Her iki siRNA dizisi de TTL gen ifadesinin baskılanması amacıyla 30 nM, 60 nM ve 90 nM konsantrasyonlarda olacak şekilde katyonik lipid ile birlikte hücrelere transfekte edilmiştir. Transfeksiyon sonrasında, TTL gen ifadesindeki baskılanma düzeyinin belirlenmesi için Western blot çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda "siRNA (1)" ile transfekte edilen hücrelerdeki TTL gen ifadesi, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere kıyasla sırasıyla %10, %35 ve %75 oranlarında azaltılabilmektedir (Şekil 4.1. A ve B). Ticari olarak satın alınan "siRNA (2)"nin transfeksiyonu sonucunda ise TTL gen ifadesinin kontrol gruplarına göre %48, %49 ve %59 oranlarında baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1. C ve D). En yüksek baskılama oranı tasarlanan "siRNA (1)" dizisi ile 90 nM konsantrasyonda sağlanabilmiş; TTL gen ifadesinin %75 oranında azaltılması sonrasında mikroskopik incelemelerde hücre ölümünde bir artış gözlenmemiştir.

Çalışmalar sonucunda, NSC34 hücrelerinde TTL gen ifadesinin baskılanması için bu koşulun uygun olduğu değerlendirilmiş ve sonraki deneysel aşamalarda kullanılmıştır.



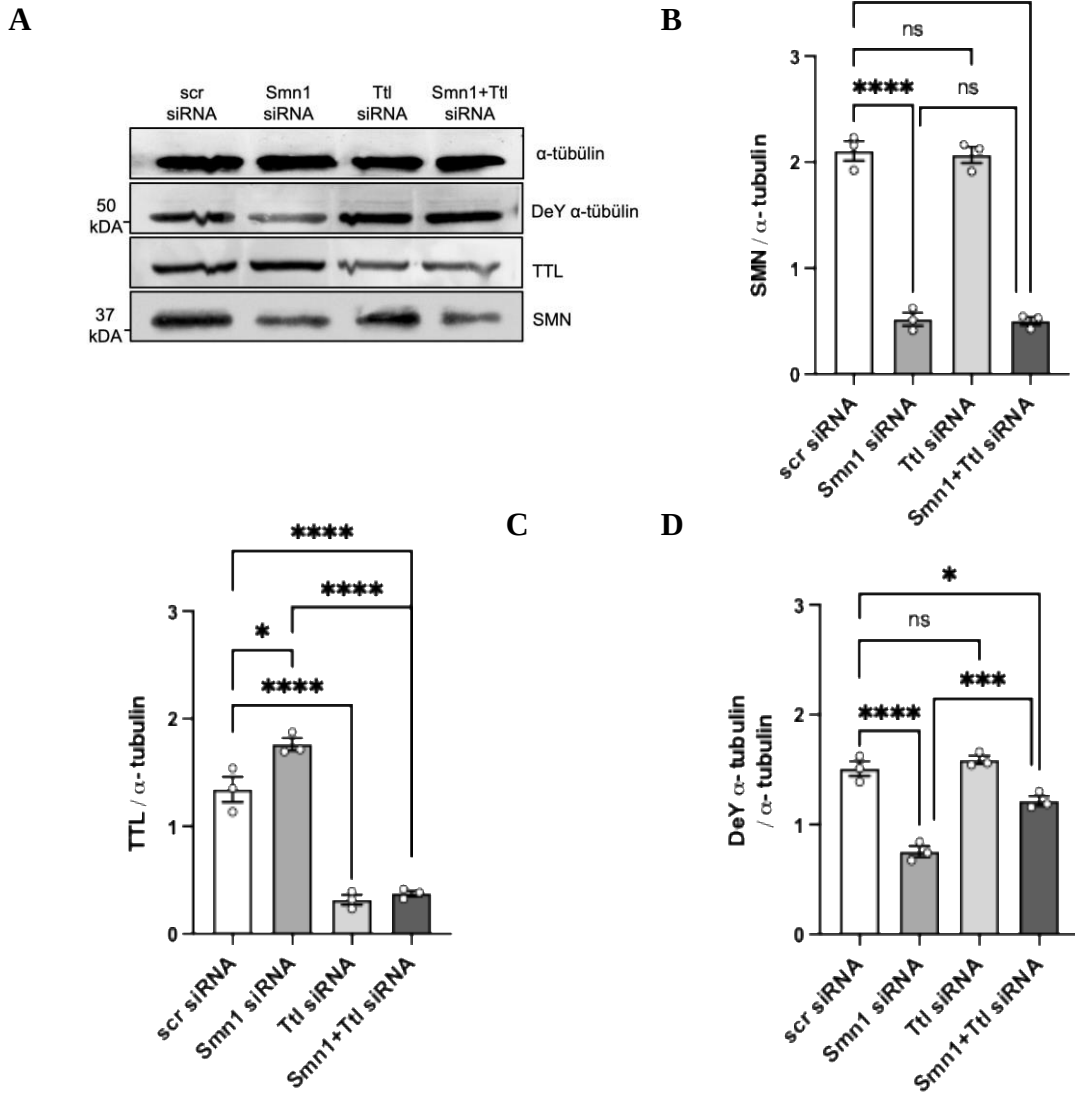
Şekil 4.1. NSC34 hücrelerinde TTL gen ifadesi baskılama koşullarının belirlenmesi kapsamında gerçekleştirilen Western blot çalışmalarına ait sonuçlar. (A) NSC34 hücrelerinde TTL siRNA (1) transfeksiyonu sonucunda TTL protein ifadesini gösteren örnek Western blot fotoğrafları. (B) Kontrole (scr siRNA) göre siRNA (1) transkfecte edilen hücrelerdeki TTL protein düzeyini gösteren analiz sonuçları, n=2 biyolojik tekrar. (C) NSC34 hücrelerinde TTL siRNA (2) transfeksiyonu sonucunda TTL protein ifadesini gösteren örnek Western blot fotoğrafları. (D) Kontrole (scr siRNA) göre siRNA (2) transkfecte edilen hücrelerdeki TTL protein düzeyini gösteren analiz sonuçları, n=2 biyolojik tekrar. Baskılama yüzdeleri, verilerin ortalama (mean) değerleri oranlanarak belirlenmiştir. Scr: *Scrambled* kontrol siRNA.

4.1.2. *In vitro* SMA Modelinde TTL Gen İfadesinin Baskılanması ve α -Tübülün Detirozinasyonu Düzeyinin Analizi

NSC34 hücrelerinde, *in vitro* SMA modelinin oluşturulması için SMN gen ifadesi siRNA yöntemi ile baskılanmış; bu modelde azalan α -tübülün detirozinasyonunun arttırılması amacıyla, SMN ile birlikte TTL gen ifadesi baskılanmıştır. Ayrıca, hücrelerde TTL gen ifadesi tek başına da baskılanmış; böylece SMN ve TTL'nin α -tübülün detirozinasyonu üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle hücrelere SMN ve TTL mRNA'larını tanıyan siRNA dizileri tek tek, ve eş-baskılama (*co-knock down*) amacıyla birlikte transfekte edilmiştir. Ardından Western blot çalışmaları yürütülmüş; SMN, TTL ve detirozinlenmiş α -tübülün düzeyleri, total α -tübülün proteinine normalize edilerek belirlenmiştir (Şekil 4.2. A). Çalışmalar sonucunda, kontrole göre tekli siRNA uygulamalarında SMN gen ifadesinin %75, TTL gen ifadesinin ise %76 oranında baskılanabildiği belirlenmiştir. Her iki siRNA'nın birlikte transfekte edildiği eş-baskılama yapılan örneklerdeki oranlar ise SMN için %76, TTL için %72 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2. B ve C).

TTL gen ifadesinin tek başına baskılanması sonucunda α -tübülün detirozinasyonunun kontrole göre değişmediği belirlenmiştir (Şekil 4.2. D). Detirozinlenen α -tübülün, daha ileri bir kesim geçirebilmekte ve tirozinden bir önceki glutamat amino asiti de kesilerek uzaklaştırılabilmektedir. $\Delta 2$ -tübülün olarak adlandırılan bu modifikasyonun TTL kaybına bağlı olarak arttığı bilinmektedir (16). Bu nedenle NSC34 hücrelerinde TTL baskılanması sonrasında oluşan detirozilenmiş α -tübülünün, $\Delta 2$ -tübüline dönüşmesi nedeniyle detirozinasyon düzeyinde artış görülmediği düşünülmüştür. Öte yandan, SMN ifadesi baskılanarak oluşturulan *in vitro* SMA modelinde, grubumuzun önceki çalışmalarıyla uyumlu şekilde, α -tübülün detirozinasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiş; azalma oranı % 50 olarak hesaplanmıştır. Eş-baskılama yapılan hücrelerde ise, α -tübülün detirozinasyonunun SMN siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. Böylece, SMN'nin tek başına baskılandığı hücrelerdeki azalan α -tübülün detirozinasyon düzeyi, bu hücrelerde TTL'nin de baskılanması yoluyla arttırılabilmektedir. Detirozinlenmiş α -tübülün kontrol hücrelerdeki

düzeye tam olarak erişmese de SMN'nin tek başına baskılandığı hücrelere göre %60 oranında arttırılabilmektedir.

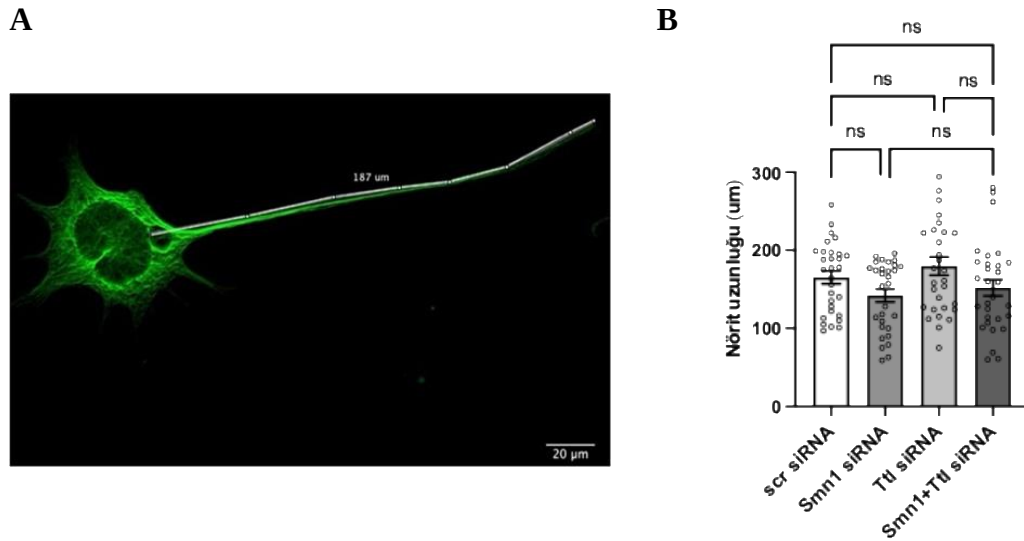


Şekil 4.2. SMN ve TTL gen ifadelerinin baskılanması amacıyla siRNA transfeksiyonu yapılan NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve α -tübulin detirozinasyon düzeyleri. (A) Örnek Western blot görüntüleri, (B-D) sonuçlara ait bar grafikler. n=3 biyolojik tekrar. Ordinary One-Way ANOVA, *p<0.05, ****p<0.0001. n.s: (not significant). DeY: detirozinlenmiş α -tübulin, Scr: Scrambled kontrol siRNA.

4.1.3. TTL Gen İfadesi Baskılanan *In vitro* SMA Modelinde Nörit Uzunluk Analizi

Nöronal hücrelerde TTL'nin nörit uzaması açısından önemli olduğu rapor edilmiş; ancak NSC34 hücre hattında daha önce araştırılmamıştır. SMN eksikliği bulunan hücrelerde TTL düzeyindeki azalmanın nöron morfolojisine etkisi de

bilinmemektedir. SMN yerleşim sonuçlarını etkileyecek bir parametre olması nedeniyle NSC34 hücrelerinde TTL tek başına ve SMN ile birlikte baskılanmış; immunofloresan boyama ve mikroskobik görüntülemelerin ardından nörit uzunluk analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücre gövdesinin en az iki katı uzunluğundaki uzantılar nörit olarak kabul edilmiş; nörit uzunluğu analizinde çekirdek sınırından nörit ucuna kadar olan mesafe “Yöntem” kısmında anlatıldığı şekilde Fiji programı kullanılarak ölçülmüştür. Analizler sonucunda, SMN’nin tek başına baskılandığı hücrelerde, daha önceki ölçümlerimizle uyumlu şekilde nörit uzunluğunda anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir (126). TTL’nin tek başına ve SMN ile birlikte baskılandığı hücrelerde de nörit uzunluğunun kontrole göre değişmediği saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.3’te sunulmuştur.



Şekil 4.3. SMN, TTL ve eş-baskılama yapılan NSC34 hücrelerinde nörit uzunluk analizleri. (A) Nörit uzunluk analizini gösteren örnek hücre fotoğrafı. (B) Nörit uzunluk analizi sonuçları. n=3 biyolojik tekrar/10 hücre, Ordinary One-Way ANOVA, n.s: (not significant). Ölçek: 20 μ m.

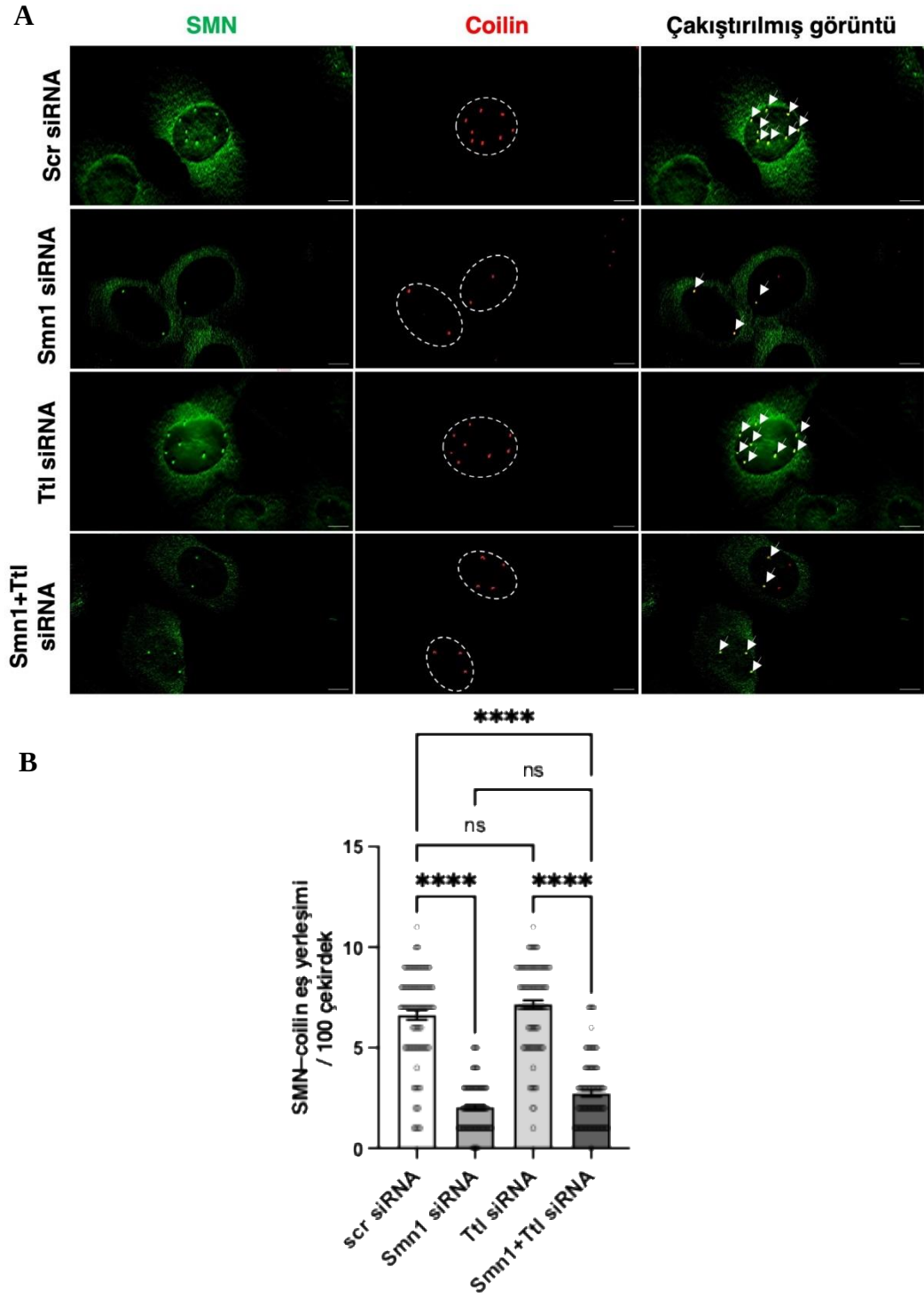
4.2. α -Tübülin Detirozinasyonu Arttırılan *In Vitro* SMA Modelinde SMN Proteininin Hücre İçi Yerleşiminin Araştırılması

SMN proteininin hem çekirdekte hem de sitoplazmada yerleşimi bulunmaktadır. Ayrıca hücresel stres durumunda stres granülleri içerisinde yerleşim

göstermektedir (112). SMN ifadesi baskılanan hücrelerdeki azalan α -tübülün detirozinasyonunun, SMN'nin bahsedilen yapı/kompartmanlara transportu üzerindeki etkisini değerlendirebilmek amacıyla, önceki kısımda anlatıldığı şekilde *in vitro* SMA modelinde TTL gen ifadesi baskılanarak α -tübülün detirozinasyon düzeyi arttırılmıştır. Bu hücrelerde, endojen olarak bulunan SMN proteinin çekirdekteki ve sitoplazmadaki yerleşimi araştırılmıştır. Ayrıca hücreler yüksek sıcaklığa maruz bırakılarak stres granülü oluşumu indüklenmiş ve SMN'nin stres granüllerindeki yerleşiminin α -tübülün detirozinasyon düzeyinden etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.2.1. SMN'nin Çekirdekte Cajal Cisimcikler ile Eş-Yerleşiminin Analizi

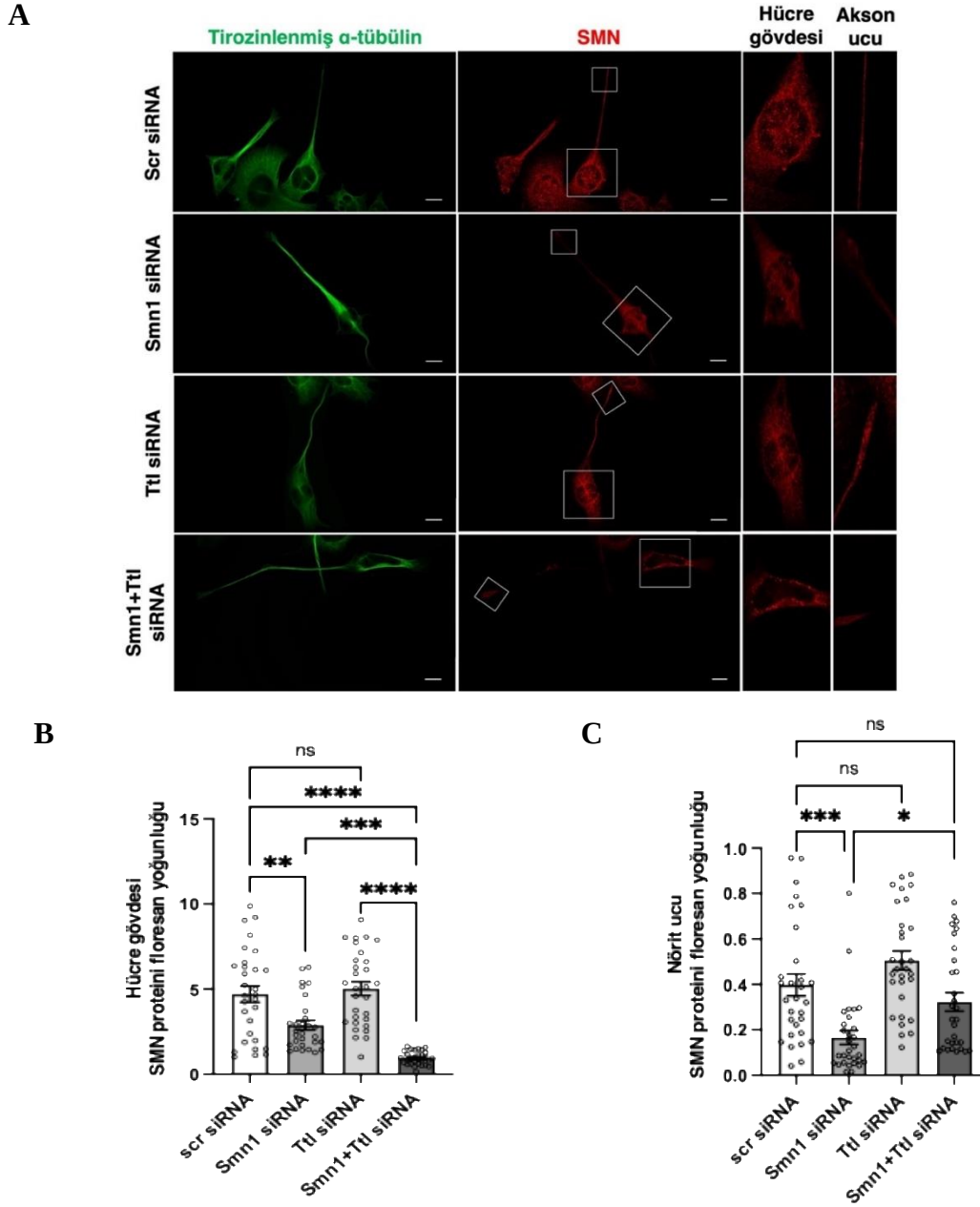
SMN proteininin çekirdekteki yerleşiminin membransız organeller olan Cajal ve Gem cisimciklerinde olduğu bilinmektedir (102, 103). Bu nedenle NSC34 hücrelerinin çekirdeğindeki Gem ve Cajal cisimciklerin ayrı ayrı analiz edilmesi hedeflenmiştir. Cajal cisimcik belirteci olan coilin proteini ile eş-yerleşim gösteren SMN'nin olduğu noktasal yapılar Cajal cisimcikleri, yalnızca SMN pozitif olan noktasal yapılar ise Gem olarak değerlendirilmek üzere araştırma planı oluşturulmuştur. Bu amaçla NSC34 hücrelerinde SMN ve TTL gen ifadeleri tek başlarına ve birlikte baskılanmış; ardından SMN ve coilin proteinlerine yönelik immunfloresan boyama çalışmaları yürütülerek hücreler konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Çalışmalar sonucunda, NSC34 hücrelerinin çekirdeğinde SMN'nin coilinden bağımsız yerleşmediği gözlenmiş; bu nedenle SMN-coilin eş-yerleşiminin bulunduğu Cajal cisimcikler sayısal olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, SMN baskılanan hücrelerde, beklendiği şekilde kontrole göre Cajal cisimcik sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir. TTL'nin tek başına baskılandığı hücrelerde kontrole göre bir değişiklik saptanmamıştır. SMN ile TTL'nin birlikte baskılanarak α -tübülün detirozinasyonunun arttırıldığı hücrelerde ise, SMN'nin tek başına baskılandığı hücrelere göre hafif bir artış gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgular doğrultusunda, mikrotübül stabilite belirteci olan α -tübülün detirozinasyonundaki artışın, SMN'nin çekirdekteki yerleşimini etkilemediği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.4. A ve B).



Şekil 4.4. NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve eş baskılama (SMN + TTL) koşullarının çekirdekteki SMN protein lokalizasyonu üzerine etkisi. (A) NSC34 hücrelerinde SMN proteini ile coilin eş-boyamalarına ait konfokal mikroskop ile 100x objektif kullanılarak çekilen immünfloresan boyama fotoğrafları. Ölçek: 20 μ m. (B) Çekirdek içerisinde SMN ile coilin proteinlerinin eş yerleştiği Cajal cisimciklerin sayılarını gösteren analiz sonuçları. n=4 biyolojik tekrar /25 hücre. Ordinary One-Way ANOVA., ****p<0.0001, n.s. (not significant).

4.2.2. SMN'nin Sitoplazmik Yerleşiminin Analizi

SMN proteini nöronlarda hücre gövdesinden akson ucuna kadar yaygın bir yerleşime sahiptir. Bu nedenle, *in vitro* SMA modelinde azalan α -tübülün detirozinasyonunun arttırılması sonucunda SMN'nin sitoplazmadaki yerleşimi farklı hücresel kompartmanlarda araştırılmıştır. Bu amaçla SMN ve TTL'nin tek başına ve birlikte baskılandığı NSC34 hücrelerinin gövdeleri ve nörit uçları, SMN boyaması sonrasında ayrı ayrı fotoğraflanmış ve SMN'nin bu bölgelerdeki yerleşiminin araştırılması amacıyla görüntü analizleri gerçekleştirilmiştir. Ardından hücrelerin gövdeleri ve nörit ucundaki büyüme bölgeleri (*growth cone*) ayrı ayrı fotoğraflanmış ve SMN'nin bu bölgelerdeki yerleşiminin araştırılması amacıyla görüntü analizleri gerçekleştirilmiştir. Floresan yoğunluk analizleri, beklendiği şekilde, SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerde hem hücre gövdesi hem de nörit ucundaki SMN miktarının, baskılama yapılmayan kontrol hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir. TTL gen ifadesi baskılanan hücrelerde kontrol hücrelere göre hücre gövdesinde ve nörit ucunda fark görülmemiştir. Eş-baskılama yapılan hücrelerde ise, SMN'nin tek başına baskılandığı hücrelere göre, SMN yerleşiminin hücre gövdesinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı, nörit ucunda ise arttığı saptanmıştır. Nörit ucunda bulunan SMN proteininin baskılama yapılmamış *scrambled* kontrol hücrelere yakın düzeye eriştiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *in vitro* SMA modelinde α -tübülün detirozinasyonundaki artışın SMN'nin sitoplazmadaki yerleşimini etkilediğini; hücre gövdesinden nörit ucuna doğru yerleşimin değişebildiğini göstermiştir (Şekil 4.5. A-C).



Şekil 4.5. NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve eş baskılama (SMN + TTL) koşullarının sitoplazmik SMN proteinini yerleşimi üzerine etkisi. (A) NSC34 hücrelerinde SMN proteinini ve tirozinlenmiş α -tübülin eş-boyamalarına ait, konfokal mikroskopta 40 $\times$ objektif kullanılarak elde edilen immüno Floresan görüntüler. Hücre gövdesini ve nörit ucunu kapsayacak şekilde sabit boyutlu kutular belirlenmiş ve floresan yoğunluk ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Seçilen bölgelerin büyütülmüş görüntüleri görsellerin yanına eklenmiştir. Ölçek çubuğu: 20 μ m. (B) Hücre gövdesindeki ve (C) nörit ucundaki SMN proteinine ait floresan yoğunluk analiz sonuçları. n=3 biyolojik tekrar/10 hücre. Ordinary One-Way ANOVA., * p <0.05, ** p < 0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001, n.s. (not significant).

4.2.3. SMN'nin Stres Granüllerindeki Yerleşiminin Analizi

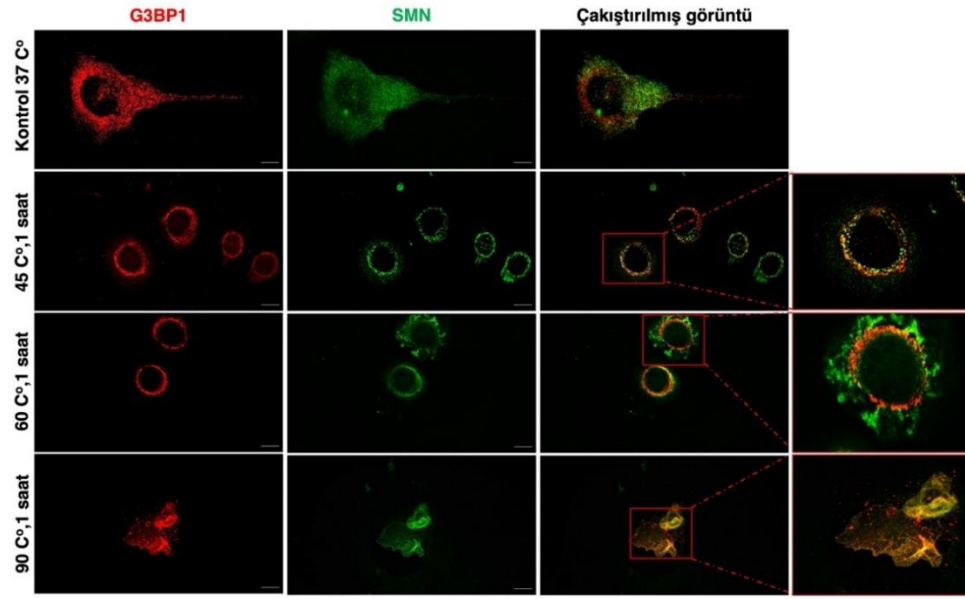
Fizyolojik koşulların yanı sıra, hücresel stres durumunda SMN sitoplazmadaki noktasal yapılar olan stres granüllerinde lokalize olmaktadır (112). Mikrotübül ağının stres granülü oluşumu ve dağılımı süreçlerinde rol alması nedeniyle, *in vitro* SMA modelinde azalan α -tübülün detirozinasyonunun, SMN'nin stres granüllerindeki yerleşimini de etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla hücre kültüründe sıcaklık uygulaması yoluyla stres koşulu oluşturulduktan sonra immünfloresan boyama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. SMN proteini ile birlikte stres granüllerinin belirteci olan G3BP1 (Ras-GAP SH3 domain-binding protein 1) proteini boyanmıştır.

Daha önce NSC34 hücrelerinde sıcaklık ile stres granülü oluşturulmadığından, öncelikle çalışmalarda kullanılacak deneysel koşullar belirlenmiştir. NSC34 hücreleri motor nöron benzeri hücrelere farklılaştırıldıktan sonra 45°C, 60°C ve 90°C sıcaklıklara 1 saat süreyle maruz bırakılarak farklı şiddette stres oluşturulmuştur. Kontrol (stres uygulanmamış) hücrelerde G3BP1 proteininin sitoplazmada yaygın ve dağınık biçimde bulunduğu gözlemlenirken, stres uygulanan hücrelerde G3BP1 sinyalinin çekirdek çevresinde birikerek daha büyük ve yoğun stres granüllerine dönüştüğü tespit edilmiştir. Sıcaklık derecelerine göre yapılan morfolojik değerlendirmelerde, 45°C'de hücrelerin nöritlerinde geri çekilme ve stres granülü oluşumu gözlemlenmiştir. Buna karşın 60°C ve 90°C'de hücrelerin şekil bütünlüklerinde bozulma ve hücre ölümü gözlenmiştir. Bu nedenle, sonraki deneylerde 45°C sıcaklık uygulaması hücrelerde stres granülü oluşumunu indüklemek için uygun koşul olarak belirlenmiştir. İmmünfloresan boyamalara ait örnek fotoğraflar aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.6. A).

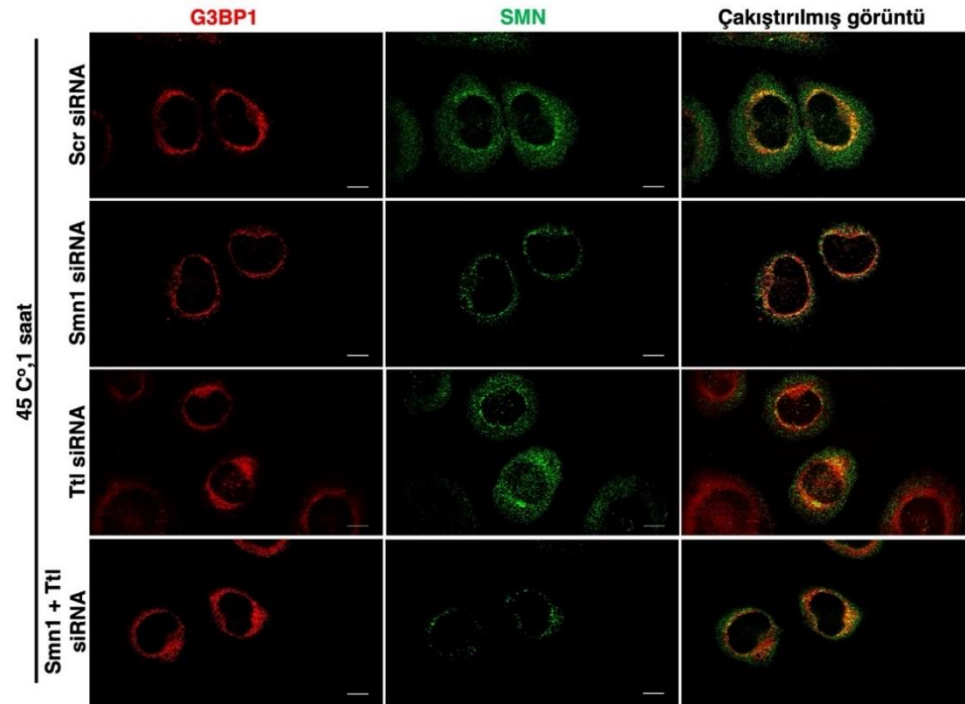
Çalışmanın devamında hücrelerde SMN ve TTL genlerinin baskılanması için trankfeksiyon çalışmaları yürütülmüş; motor nöron benzeri hücrelere farklılaştırma sonrasında hücreler 1 saat süreyle 45°C sıcaklıkta inkübe edilerek stres granülü oluşumu indüklenmiştir. Ardından SMN ile stres granülü belirteci olan G3BP1 proteinin eş-yerleşimi immünfloresan boyama yöntemiyle araştırılmış; bu amaçla konfokal mikroskop ile çekilen floresan görüntüler, ImageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir. SMN ve G3BP1 sinyallerinin eş-yerleşim düzeyi, Pearson's correlation coefficient (PCC) yöntemiyle hesaplanarak nicel olarak

değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda, kontrol hücrelerine kıyasla SMN baskılanan hücrelerde, SMN proteini ile G3BP1-pozitif stres granüllerinin eş-yerleşim düzeyinde belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır. Buna karşılık, eş-baskılama yapılan hücrelerde SMN ile G3BP1-pozitif stres granülleri arasındaki eş-yerleşim düzeyinin, sadece SMN baskılanan hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, *in vitro* SMA modelinde azalan α -tübülün detirozinasyonunun arttırılması sonucunda, SMN'nin stres granüllerindeki yerleşiminin artmadığını göstermiştir (Şekil 4.6. B ve C).

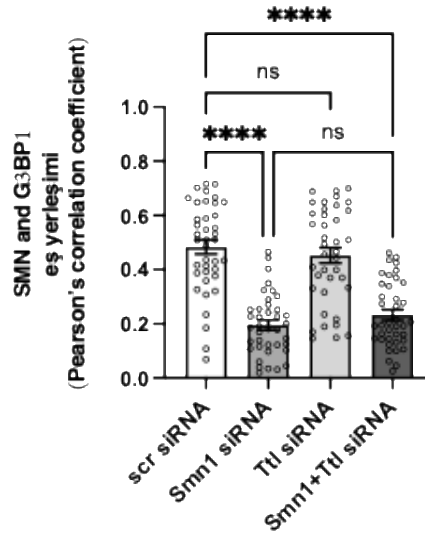
A



B



C



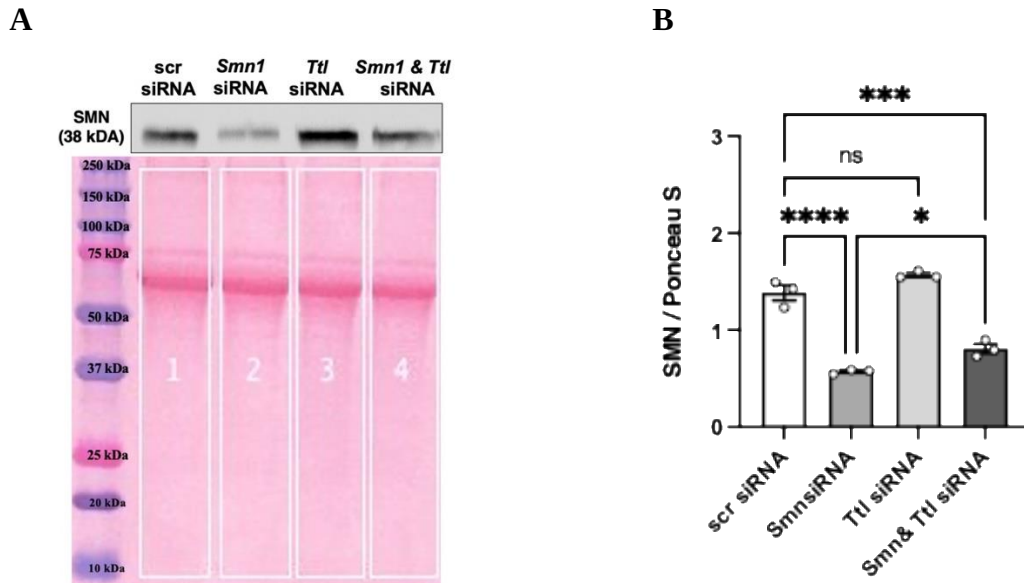
Şekil 4.6. NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve eş baskılama (SMN + TTL) koşullarının SMN'nin stres granüllerindeki lokalizasyonu üzerine etkisi. (A) Farklı sıcaklık uygulamalarında (45°C, 60°C ve 90°C) NSC34 hücrelerinde SMN proteini ile G3BP1 eş-boyamalarına ait, floresan ataçmanlı mikroskop ile 100x objektif kullanılarak çekilen örnek immunofloresan boyama fotoğrafları. Ölçek: 20 µm. (B) NSC34 hücrelerinde *scrambled* kontrol siRNA (scr siRNA), *Smn1* siRNA ve *Ttl* siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerin SMN proteini ile G3BP1 eş-boyamalarına ait, konfokal mikroskop ile 100x objektif kullanılarak çekilen immunofloresan boyama fotoğrafları (C) Eş yerleşim analiz sonuçları. n=4 biyolojik tekrar/10 hücre. Ordinary One-Way ANOVA., ****p<0.0001, n.s. (not significant).

4.3. α -Tübülün Detirozinasyonu Arttırılan Hücrelerde SMN Proteininin Hücre Dışına Salgılanma Düzeyinin Araştırılması

SMN proteininin eksozomlar ve mikroveziküller aracılığıyla hücre dışı ortama salgılandığı bilinmektedir (110). Bu veziküllerin hücre membranına yönlendirilmesi ve taşınması mikrotübül ağı tarafından sağlanmaktadır. Bu nedenle, SMN eksikliği durumunda mikrotübüllerde saptanan stabilite kaybının, SMN proteininin hücre dışı ortama taşınmasını etkileyebileceği öngörülmüş ve *in vitro* SMA modelinde α -tübülün detirozinasyon düzeyi arttırılarak hücre dışına salgılanan SMN düzeyi araştırılmıştır.

NSC34 hücreleri gen ifadelerinin baskılanması amacıyla siRNA ile transfekte edilmiş ve serumsuz ortamda 72 saat süreyle farklılaştırılmıştır. Ardından kültür süpernatantı toplanarak trikloroasetik asit (TCA) presipitasyonu yöntemi ile protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Western blot çalışmaları ile, yalnızca SMN'nin

baskılandığı ve SMN ile TTL'nin birlikte baskılandığı hücrelerden ekstraselüler ortama salgılanan SMN miktarları belirlenmiş; elde edilen veriler baskılama yapılmayan (*scrambled*) kontrol hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Bant yoğunluklarının normalizasyonunda toplam protein yükleme kontrolü olarak Ponceau S kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda, yalnızca SMN'nin baskılandığı hücrelerden ekstraselüler SMN düzeyinin, baskılama yapılmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır. TTL ifadesinin baskılandığı hücrelerde ise ekstraselüler SMN düzeyinde kontrol grubuna kıyasla herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşılık, SMN ve TTL'nin birlikte baskılandığı hücrelerde ekstraselüler SMN düzeyinin, yalnızca SMN baskılanan hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır (Şekil 4.7. A ve B). Elde edilen sonuçlar, *in vitro* SMA modelinde α -tübülin detirozinasyonundaki artışın, SMN'nin hücre dışına salgılanmasını arttırdığını göstermiştir.



Şekil 4.7. NSC34 hücrelerinde SMN, TTL ve eş baskılama (SMN + TTL) koşullarının hücre dışına salgılanan SMN proteini düzeyine etkisi. (A) NSC34 hücrelerinde *scrambled* kontrol siRNA (scr siRNA), Smn1 siRNA ve TTL siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerden ekstraselüler ortama salgılanan SMN proteininin düzeyini gösteren örnek Western blot görüntüleri. Yükleme kontrolü amacıyla, membran üzerindeki toplam protein miktarı Ponceau S boyaması ile gösterilmiştir. Smn1+TTL, eş-baskılama koşulunu göstermektedir. (B) Ponceau S boyamasına göre normalize edilmiş SMN proteinin densitometrik analiz sonuçları. n=3 biyolojik tekrar. Ordinary One-Way ANOVA., *p<0.05, ****p<0.0001, n.s. (*not significant*)

4.4. SMN Transportundan Sorumlu Olabilecek Aday Motor Proteinin Araştırılması

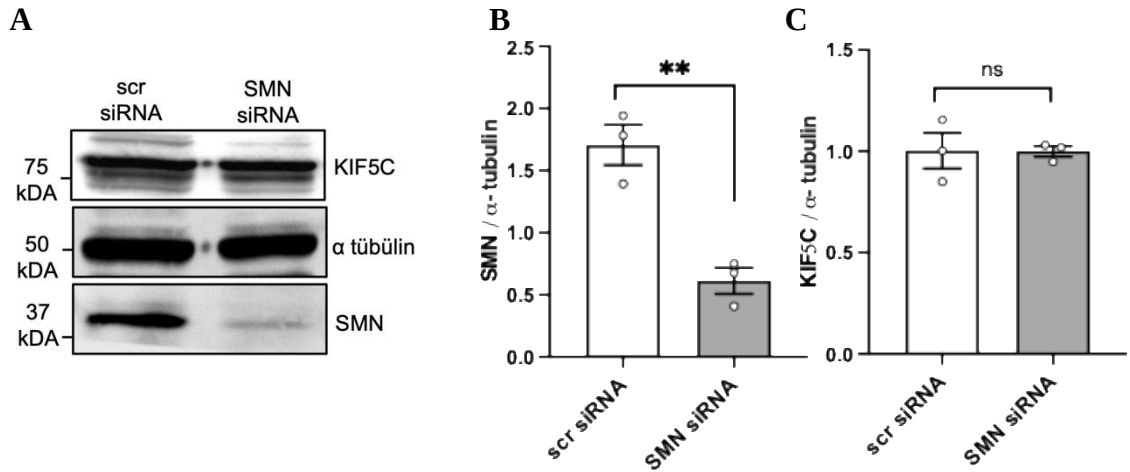
In vitro SMA modelinde azalan α -tübülün detirozinasyon düzeyinin artırılması sonucunda SMN proteininin sitoplazmik yerleşiminin ve hücre dışına salgılanma düzeyinin değiştiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar detirozinasyon değişikliğinin SMN'nin anterograd yöndeki (hücre gövdesinden perifere) transportunu etkileyebileceğini düşündürmüş ve transporttan sorumlu olabilecek aday proteinin belirlenebilmesi amacıyla *in silico* ve *in vitro* çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.4.1. SMN Proteinini İle Etkileşim Potansiyeli Bulunan Motor Proteinlerin Biyoinformatik Analizlerle Belirlenmesi

Literatürde SMN'nin belirli bir motor proteinle doğrudan ya da dolaylı olarak etkileşerek taşındığına dair bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle öncelikle, motor protein adaylarının daraltılarak SMN'nin potansiyel etkileşim ortaklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. SMN'nin motor proteinlerle etkileşiminin olup olmadığı, biyoinformatik veri tabanları olan BioGRID ve STRING kullanılarak incelenmiş, ancak doğrudan bir etkileşim saptanmamıştır. STRING veritabanı kullanılarak gerçekleştirilen protein etkileşim ağı analizleri, SMN'nin ikinci ve üçüncü komşuluk düzeyinde, anterograd yönde taşımada görevli kinezin-1 motor protein ailesi üyelerinin (KIF5A, KIF5B ve KIF5C) ve retrograd yönde taşıma sağlayan sitoplazmik dinein (DYNC1H1) motor proteinin bulunduğunu göstermiş ve bağlantının dolaylı etkileşimlerle kurulduğunu ortaya koymuştur. Deneysel bulgularımız, α -tübülün detirozinasyonundaki değişikliklerin SMN'nin anterograd yöndeki taşınımını etkileyebileceğini düşündürdüğünden, retrograd yönde taşımada görevli dynein proteini sonraki çalışmalara dahil edilmemiş ve kinezin-1 ailesi üyelerine odaklanılmıştır. Kinezin-1 ailesi KIF5A, KIF5B ve KIF5C olmak üzere 3 farklı izoforma sahiptir. KIF5B proteini tüm dokularda ifade edilirken, KIF5A ve KIF5C nöronal motor proteinlerdir. Bu adaylar arasında KIF5C'nin detirozinlenmiş ve stabil mikrotübüllerle tercihlili etkileşim gösterdiği literatürde birden fazla çalışmada tanımlanmıştır (40,41,70). Bu bulgular doğrultusunda, SMN'nin KIF5C aracılığıyla taşınabileceği ve mikrotübül stabilitesindeki artışa bağlı olarak gözlenen SMN

4.4.2. *In vitro* SMA Modelinde KIF5C Protein Düzeyinin Analizi

SMN eksikliğinde KIF5C protein düzeyi daha önce araştırılmamıştır. Bu nedenle, KIF5C'nin SMN yerleşimine etkisi araştırılmadan önce *in vitro* SMA modelinde KIF5C protein düzeyi analiz edilmiştir. Bu amaçla, NSC34 hücreleri SMN gen ifadesinin baskılanması amacıyla siRNA ile transfekte edilmiş; hücrelerin farklılaştırılmasının ardından protein izolasyonu gerçekleştirilerek Western blot çalışmaları yürütülmüştür. Sonuçlar, SMN ifadesi baskılanan hücrelerde KIF5C protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermiştir (Şekil 4.9. A ve C).



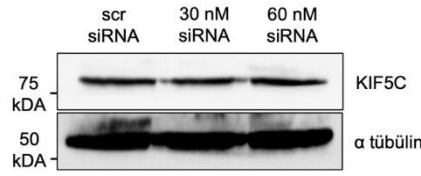
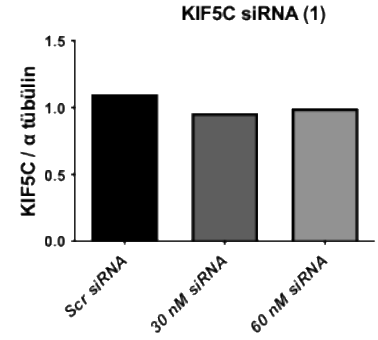
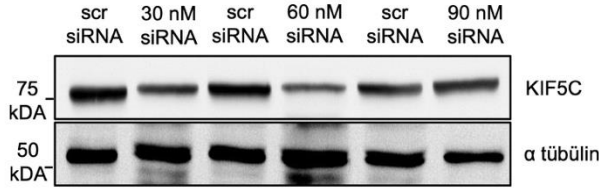
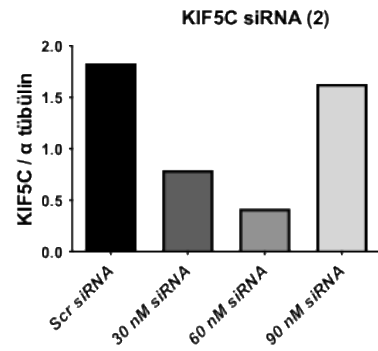
Şekil 4.9. *In vitro* SMA modelinde KIF5C düzeyinin analizi. SMN siRNA ve kontrol amacıyla *scrambled* siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerdeki (A) SMN ve KIF5C protein düzeylerini gösteren Western blot görüntüleri. (B) SMN baskılamasını gösteren bar grafiği (C) KIF5C protein düzeyini gösteren bar grafiği. n=3 biyolojik tekrar, Mann-Whitney U., **p<0.01, n.s.; (*not significant*)

4.4.3. NSC34 Hücrelerinde KIF5C Gen İfadesi Baskılama Koşullarının Belirlenmesi

SMN transportunda KIF5C'nin rolünün araştırılabilmesi amacıyla hücrelerde KIF5C gen ifadesinin baskılanması ve SMN'nin yerleşiminin analiz edilmesi planlanmıştır. NSC34 hücre hattında KIF5C gen ifadesinin daha önce baskılanmamış olması nedeniyle, KIF5C mRNA'sını tanıyan iki farklı siRNA dizisi ile baskılama çalışmaları yürütülmüştür. Bu siRNA dizilerinden bir tanesi olan "KIF5C siRNA (1)" 'Yöntemler' bölümünde anlatıldığı şekilde mRNA'nın 15. ekzonuna bağlanacak

şekilde tasarlanmıştır. Diğer siRNA dizisi ise (KIF5C siRNA (2), Thermo Silencer Select) ticari olarak temin edilmiştir. Bu dizi, KIF5C mRNA'sını 3. ekzondan tanımaktadır.

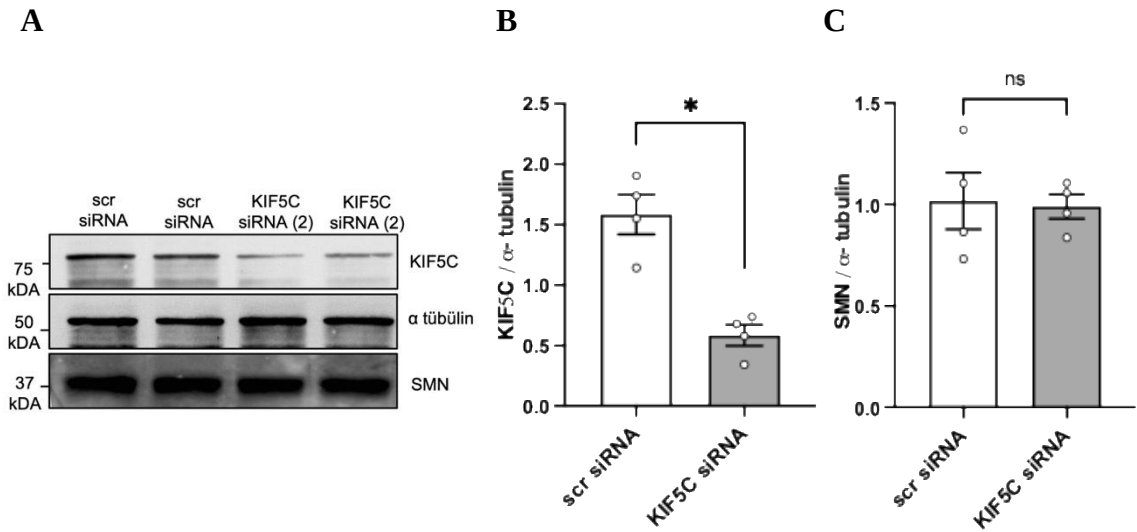
Deneyssel çalışmalara tasarlanan “siRNA (1)” ile başlanmış ve KIF5C gen ifadesinin baskılanması amacıyla 30 nM ve 60 nM konsantrasyonlarda hücrelere transfekte edilmiştir. Transfeksiyon sonrasında, KIF5C gen ifadesindeki baskılanma düzeyinin belirlenmesi için Western blot analizleri yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda KIF5C gen ifadesi, kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere kıyasla sırasıyla % 12 ve % 14 oranlarında azaltılabilmektedir (Şekil 4.10. A ve B). Baskılama oranlarının yeterli bulunmaması nedeniyle ticari olarak temin edilen “siRNA (2)” ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu siRNA da farklı konsantrasyonlarda (30 nM, 60 nM, 90 nM) hücrelere transfekte edilmiş; 72 saat farklılaştırılan hücrelerden protein izole edilerek Western blot ile KIF5C düzeyleri analiz edilmiştir. Çalışmalar sonucunda “KIF5C siRNA (2)” kullanılarak daha yüksek baskılama oranları elde edilebildiği görülmüş; baskılanma oranları 30 nM’da % 56, 60 nM’da % 77 ve 90 nM’da % 10 olarak hesaplanmıştır. En yüksek baskılama oranının elde edildiği 60 nM şartında mikroskopik olarak hücre ölümünde bir artış gözlemlenmediğinden bu şart sonraki çalışmalar için uygun bulunmuştur. Bu çalışmalar sonucunda, NSC34 hücrelerinde KIF5C gen ifadesi baskılanmasına yönelik deneysel koşullar belirlenmiş ve sonraki deneysel aşamalarda bu koşullar kullanılmıştır (Şekil 4.10. C ve D).

A**B****C****D**

Şekil 4.10. NSC34 hücrelerinde KIF5C gen ifadesinin baskılama koşullarının belirlenmesi (A) NSC34 hücrelerinde “KIF5C siRNA (1)” kullanılarak gerçekleştirilen gen ifadesi baskılama çalışmaları sonucunda KIF5C protein düzeyini gösteren örnek Western blot fotoğrafları. (B) Kontrole göre KIF5C protein düzeyini gösteren analiz sonucu. Baskılama elde edilmediğinden deneysel tekrar yapılmamıştır. (C) NSC34 hücrelerinde “KIF5C siRNA (2)” kullanılarak gerçekleştirilen gen ifadesi baskılama çalışmaları sonucunda KIF5C protein düzeyini gösteren örnek Western blot fotoğrafları. (D) Kontrole göre KIF5C protein düzeyini gösteren analiz sonucu. Baskılama yüzdeleri, verilerin ortalama (mean) değerleri dikkate alınarak hesaplanmıştır. En yüksek baskılama oranı 60 nM siRNA konsantrasyonunda elde edilmiş olup deneysel tekrarlarla birlikte sonuçlar sonraki bölümde sunulmuştur. Scr: *Scrambled* kontrol siRNA

4.4.4. KIF5C Gen İfadesindeki Baskılamanın Hücre İçi SMN Protein Düzeyine Etkisinin Analizi

KIF5C'nin SMN yerleşimi üzerindeki etkisinin araştırılmasından önce KIF5C düzeyindeki azalmanın hücre içi SMN protein miktarını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Bu amaçla, NSC34 hücrelerinde KIF5C gen ifadesinin siRNA aracılı baskılanması için belirlenen uygun koşullarda hücreler katyonik lipid kullanılarak transfekte edilmiştir. Hücrelerin farklılaştırılmasının ardından protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve SMN protein düzeyleri Western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Dört biyolojik tekrar haline gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, KIF5C siRNA ile transfekte edilen hücrelerde kontrol grubuna kıyasla yaklaşık % 63 oranında baskılanma elde edilmiştir. Bu hücrelerde SMN protein düzeyinde baskılama yapılmayan kontrol hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.11. A-C).

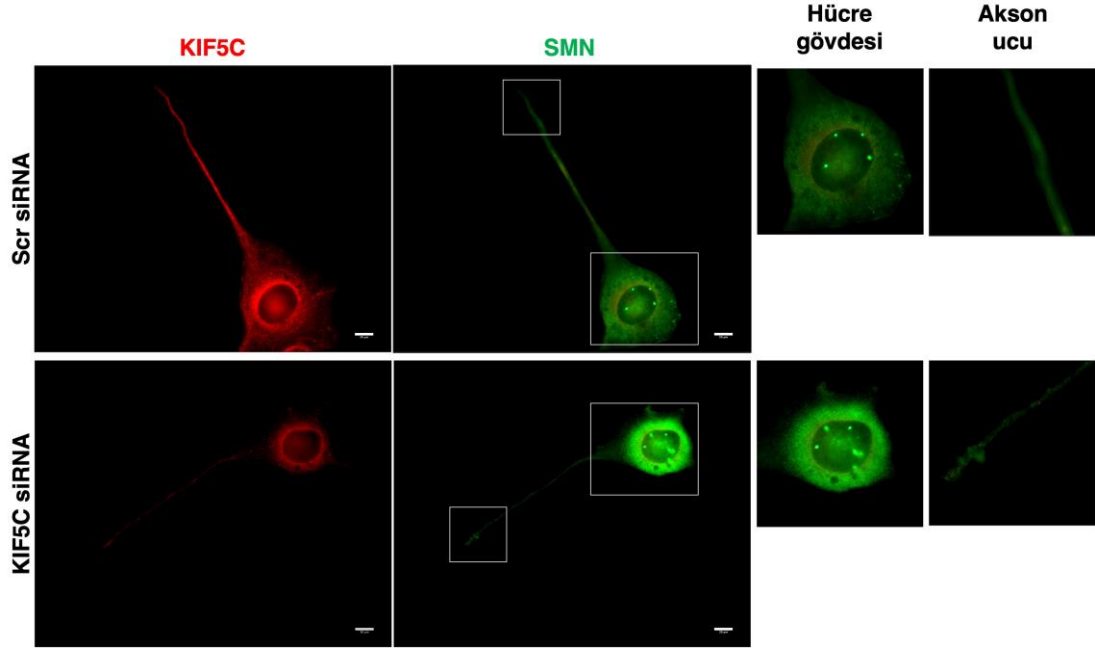


Şekil 4.11. KIF5C gen ifadesi baskılanan NSC34 hücrelerinde SMN düzeyinin analizi. KIF5C siRNA ve kontrol amacıyla *scrambled* siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerdeki (A) SMN ve KIF5C protein düzeylerini gösteren Western blot görüntüleri. (B) KIF5C ve (C) SMN düzeylerini gösteren analiz sonuçlarına ait bar grafikler. n=4 biyolojik tekrar, Mann-Whitney U., *p<0.05, n.s.; (*not significant*).

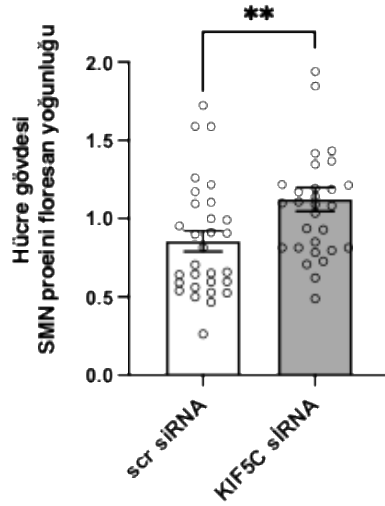
4.4.5. KIF5C Gen İfadesi Baskılanan Hücrelerde SMN'nin Sitoplazmik Yerleşiminin Analizi

KIF5C'nin SMN'nin sitoplazmadaki yerleşimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla gen ifadesi baskılama çalışmaları ve ardından kantitatif mikroskopik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, NSC34 hücrelerine KIF5C siRNA transfeksiyonu yapılmış ve motor nörona farklılaştırıldıktan sonra SMN'nin hücre gövdesindeki ve nörit ucundaki yerleşiminin analizi için KIF5C ve SMN eş-boyamaları gerçekleştirilmiştir. Kantitatif floresan yoğunluk analizleri, KIF5C baskılanan hücrelerde SMN proteininin belirgin şekilde hücre gövdesinde yoğunlaştığını göstermiş ve elde edilen sonuçlar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Buna karşın, nörit uçlarındaki SMN sinyalinde ise kontrol hücrelere göre hafif düzeyde bir azalma gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgular, KIF5C'nin SMN'nin mikrotübül boyunca anterograd yönde taşınmasında rol oynayabileceğini göstermekte ve KIF5C ifadesindeki azalmanın, SMN'nin nörit ucuna taşınmasında hataya yol açabileceğine işaret etmektedir (Şekil 4.12. A-C).

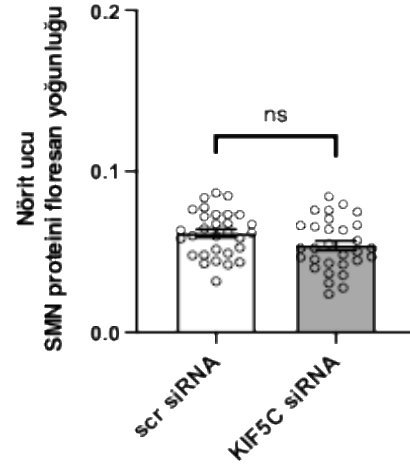
A



B



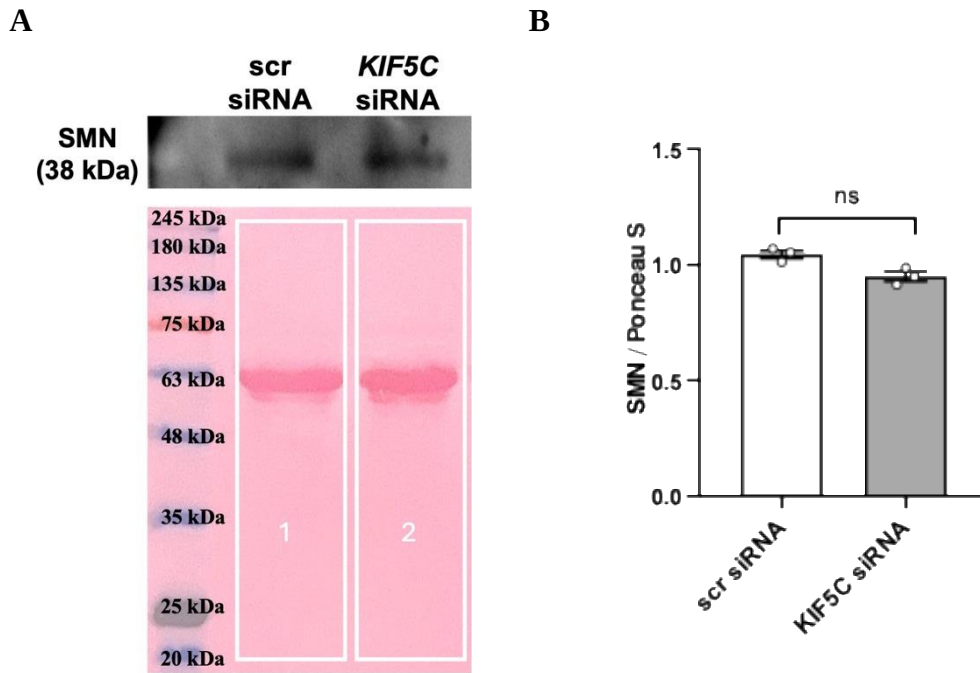
C



Şekil 4.12. NSC34 hücrelerinde KIF5C baskılmasının SMN proteininin yerleşimi üzerindeki etkisi. (A) KIF5C gen ifadesi baskılanan ve baskılama yapılmayan kontrol (scr) NSC34 hücrelerinde SMN proteininin yerleşimini gösteren, floresan ataçmanlı mikroskop ile 63X objektif kullanılarak çekilen örnek immunofloresan boyama fotoğrafları. Ölçek: 20 μ m. (B) Hücre gövdesi ve (C) nörit ucunda gerçekleştirilen floresan yoğunluk analiz sonuçları. n=3 biyolojik tekrar/10 hücre. Mann-Whitney U., ** $p < 0.01$, n.s.; (not significant)

4.4.6. KIF5C Gen İfadesi Baskılanan Hücrelerde SMN Proteininin Hücre Dışı Salgılanma Düzeyinin Araştırılması

In vitro SMA modelinde α -tübülün detirozinasyonundaki artışın, SMN'nin sitoplazmik yerleşimine etkisinin yanı sıra, hücre dışına salgılanmasını da arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, KIF5C'nin, SMN'nin hücre dışına salgılanması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla hücreler KIF5C siRNA ile transfekte edilmiş; serumsuz ortamda 72 saat süreyle farklılaştırıldıktan sonra kültür süpernatantları toplanmıştır. Süpernatantlardan TCA presipitasyonu yöntemi kullanılarak protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve Western blot çalışmaları yürütülmüştür. Yapılan analizler sonucunda, KIF5C'nin baskılandığı hücrelerden hücre dışına salgılanan SMN miktarlarında baskılama yapılmayan (*scrambled*) kontrol hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.13. A ve B).



Şekil 4.13. NSC34 hücrelerinde, KIF5C baskılanmasının hücre dışına salgılanan SMN proteini düzeyine etkisi. (A) NSC34 hücrelerinde *scrambled* kontrol siRNA (scr siRNA) ve KIF5C siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerden ekstraselüler ortama salgılanan SMN proteininin düzeyini gösteren örnek Western blot görüntüleri. Yükleme kontrolü amacıyla, membran üzerindeki toplam protein miktarı Ponceau S boyaması ile gösterilmiştir. (B) Ponceau S boyamasına göre normalize edilmiş SMN proteinin densitometrik analiz sonuçları. n=3 biyolojik tekrar. Mann-Whitney U. n.s.; (*not significant*).

5. TARTIŞMA

Nörodejeneratif bir hastalık olan SMA'da, *SMN1* genindeki mutasyonlar nedeniyle fonksiyonel SMN proteini eksikliği görülmektedir. SMN protein düzeyindeki azalma, motor nöronlarda dejenerasyona yol açmakta ve nöromusküler fonksiyon kaybına neden olmaktadır. SMN proteini tüm hücrelerde sentezlenen, özellikle motor nöronların sağkalımında rol alan çok partnerli ve çok işlevli bir proteindir. Bu nedenle SMN protein düzeyinin artırılması, hastalığın tedavisindeki temel yaklaşımdır ve gen tedavisi, antisense oligonükleotit ve küçük molekülü bir ilaç ile gerçekleştirilebilmektedir. “SMN arttırıcı (*SMN enhancing*)” veya “hastalığı modifiye edici (*disease modifying*)” tedaviler olarak adlandırılan bu tedavilerden hastaların farklı düzeylerde fayda sağladığı bilinmektedir. Tedaviler hastalığın doğal seyrini (*natural history*) değiştirmekle birlikte uzun dönem etkileri henüz bilinmemektedir. SMA fare modelleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada, aşırı SMN ekspresyonunun doza bağlı olarak geç başlangıçlı motor bozukluklara, propriyoseptif sinaps kaybına ve nörodejenerasyona neden olduğu saptanmıştır. Sitoplazmada biriken fazla SMN proteininin snRNP bileşenlerini etkileyerek, RNA splicing bozuklukları ve transkriptom değişikliklerine neden olduğu gösterilmiştir. Bulgular, uzun süreli aşırı SMN ekspresyonunun toksik “gain-of-function” mekanizmasına neden olabileceği ve AAV9-SMN gen tedavisinin uzun dönem güvenliği açısından dikkatli olunması gerektiğini ortaya koymuştur (105). Bu etkiler SMA modelinde bildirilmiş olup tedavi alan hastalarda, tedavilerin yan etkileri dışında, SMN artışının olumsuz bir etkisi rapor edilmemiştir. Öte yandan hastaların tedavilerden yararlanımındaki farklılıklar nedeniyle, sadece SMN proteininin arttırılmasının yeterli olmayabileceği, bu tedavilerle birlikte SMN eksikliğinde hücrelerde bozulan moleküler mekanizmaların düzeltilmesi esasına dayanan “SMN arttırılmasından bağımsız (SMN-independent)” tedavi seçeneklerine de ihtiyaç olabileceği düşünülmektedir (84). SMN eksikliğinden çok sayıda hücresel süreç etkilenmekte olup bunlardan biri hücre iskeletinin düzenlenmesidir (115-118).

Hücre iskeletinin temel elemanlarından olan mikrotübüller, nöronlar gibi özelleşmiş hücrelerde akson ve dendrit yapılarının kurulması, hücre içi organel, vezikül ve protein komplekslerinin taşınması, ayrıca hücre dışı salgılanma açısından

önemlidir (7,8). SMA modelleri ile gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımız, SMN eksikliğinde mikrotübüllerle ilişkili bazı proteinlerin ifadelerinde ve post-translasyonel modifikasyonlarında değişiklikler olduğunu göstermiş ve mikrotübül stabilitesinde azalma olduğu belirlenmiştir (49, 127). Mikrotübüllerin hücre içi transportu sağlayan temel filamentler olması nedeniyle, SMN eksikliğine bağlı ortaya çıkan mikrotübül stabilite kaybının, SMN proteininin kendi transportunu da etkileyebileceği, ve mikrotübül stabilitesinin artırılması yoluyla SMN'nin hücre içindeki taşınmasının ve hücre dışına salgılanmasının düzenlenebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, mikrotübül stabilite belirteci olan ve SMN eksikliğine bağlı olarak azalan α -tübülün detirozinasyonu, NSC34 hücrelerinden kurulan *in vitro* SMA modelinde TTL gen ifadesinin %72 oranında siRNA-aracılı baskılanması yoluyla %60 (1.6 kat) oranında arttırılabilmektedir. TTL'nin nöronal gelişim ve nörit uzamasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, sıçan hipokampal nöronlarında TTL gen baskılanmasının tirozinlenmiş α -tübülün düzeyini azalttığı ve nörit uzunluğunu arttırdığı gösterilmiştir (36). Bu nedenle, TTL baskılanan hücrelerde nörit uzunluğu analiz edilmiş ancak çalışmamızda kullanılan NSC34 hücrelerinde TTL baskılanması sonucunda nörit uzunluğunda belirgin bir azalma saptanmamıştır. Bu durum, TTL eksikliğinin nörit morfolojisi üzerindeki etkilerinin hücre tipine ve deneysel modele bağlı olarak farklılık gösterebileceğini düşündürmüştür. Benzer şekilde literatürde farklı hücre tiplerinde SMN eksikliğinin de nörit boyunda kısaltmaya neden olduğu bilinmekle birlikte, çalışmamızda kullandığımız hücresel modelde nörit uzunluğunda kontrole göre bir kısalma saptanmamaktadır (126). NSC34 hücrelerinde gen ifadesi baskılama çalışmaları sonucunda nöronal morfolojide değişiklik görülmemesi, yerleşim analizlerini etkileyebilecek bir unsur olduğundan, olumlu bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın devamında, α -tübülün detirozinasyonu arttırılan *in vitro* SMA modelinde, çekirdekteki SMN proteininin yerleşimindeki değişiklikler araştırılmıştır. SMN'nin çekirdekte Gem ve Cajal cisimciklerde bulunduğu bilinmektedir (101). Çalışmalar sonucunda hücrelerin çekirdeğinde Gem yapıları gözlenmemiş, bu nedenle sadece Cajal cisimciklerde yerleşen SMN üzerinden analizler gerçekleştirilmiş ve SMN baskılanan hücrelerde Cajal cisimcik sayısının azaldığı gösterilmiştir. Literatür ile uyumlu olan bu bulgu, SMN proteininin çekirdek içerisinde Cajal cisimcikleri ile

ilişkili olduğunu desteklemektedir (114). Ancak, SMN ve TTL'nin birlikte baskılandığı ve α -tübülün detirozinasyonunun arttırıldığı hücrelerde, yalnızca SMN baskılanan hücrelerle karşılaştırıldığında Cajal cisimcik sayısında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, α -tübülün detirozinasyonundaki artışın SMN proteininin Cajal cisimciklerdeki yerleşimini etkilemediğini göstermektedir. Bunun temel nedeninin, mikrotübüllerin esas olarak sitoplazmik taşıma süreçlerinde görev alması olabileceği düşünülmektedir. Mikrotübüller, vezikül, organel ve protein komplekslerinin hücre içerisinde uzun mesafeli taşınmasında önemli rol oynarken; çekirdek ve sitoplazma arasındaki moleküler geçiş nükleer por kompleksleri ve importin/exportin sistemi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Mikrotübüller hücre gövdesinden nükleer por komplekslerine kadar olan kısa mesafeli taşınımı sağlamaktadır. Bu nedenle, hücre gövdesinden çekirdeğe kadar gerçekleşen kısa mesafeli SMN transportu, α -tübülün detirozinasyonu ve/veya mikrotübül stabilitesindeki değişimlerden etkilenmemiş olabilir. Grubumuzun aynı hücre kültürü modeliyle gerçekleştirdiği önceki çalışmalarda, SMN eksikliğine bağlı mikrotübül stabilite kaybının periferik doğru belirginleşmesi, tezden elde edilen sonuçları destekleyici niteliktedir (49).

Elde edilen bulgular doğrultusunda, SMN proteininin sitoplazmadan çekirdek içine taşınmasında, α -tübülün detirozinasyonu ve/veya mikrotübül stabilitesindeki değişimlerin doğrudan bir etkisinin olmayabileceği düşünülebilir. Öte yandan, *in vitro* SMA modelinde, α -tübülün detirozinasyonundaki artış sonucunda, SMN yerleşiminin hücre gövdesinde azaldığı, nörit ucunda ise arttığı gösterilmiştir. Bu hücrelerde nörit uzunluğunda değişiklik gözlenmemesi, saptanan değişikliklerin nörit uzunluğundan bağımsız olduğuna ve hücre içi taşıma mekanizmalarındaki değişimlerden kaynaklandığına işaret etmekte; detirozinlanmış mikrotübüllerin SMN'nin distal bölgelere taşınmasını kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir. Mikrotübül detirozinasyonunun kinezin motor proteinlerinin mikrotübüllere bağlanmasını, yürüme hızını ve mesafesini düzenlediği bilinmektedir (40,41). SMN proteininin aksonal büyüme, lokal protein sentezi ve nöromusküler kavşak bütünlüğü açısından nörit uçlarında önemli işlevlere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca SMN proteinin, β -actin mRNA'sı başta olmak üzere bazı RNA bağlayıcı proteinler ve ribonükleoprotein kompleksleriyle birlikte taşındığı, böylece akson gelişimi, büyüme

konisi dinamikleri ve sinaptik bütünlüğün sürdürülmesine görev aldığı gösterilmiştir (133). Çalışmamızda, α -tübülün detirozinasyonundaki artış sonucunda nörit ucundaki SMN düzeyinin kontrol hücrelere yakın seviyelere ulaşması dikkat çekicidir. Bu durum, mikrotübül post-translasyonel modifikasyonlarının SMA patogeneğinde yalnızca yapısal değil, aynı zamanda fonksiyonel sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir. Bulgular ayrıca, azalmış SMN düzeyine rağmen hücre içi dağılımın yeniden düzenlenebilmesinin mümkün olabileceğini ve mikrotübül dinamiklerinin hedeflenmesinin SMA'da potansiyel bir düzenleyici mekanizma olabileceğini düşündürmektedir.

SMN'nin sitoplazmadaki yerleşim bölgelerinden bir diğeri, hücrel stres koşullarında oluşan noktasal yapılar olan stres granülleridir (112). Mikrotübül ağının stres granülü oluşumu ve dağılımı süreçlerinde rol alması nedeniyle, *in vitro* SMA modelinde artan α -tübülün detirozinasyonunun, SMN'nin stres granüllerindeki yerleşimini de etkileyebileceği düşünülmüştür (134). Bu amaçla hücre kültüründe sıcaklık uygulaması yoluyla stres koşulu oluşturulduktan sonra immunfloresan boyama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda, kontrol hücrelerine kıyasla SMN baskılanan hücrelerde, SMN proteini ile G3BP1-pozitif stres granüllerinin eş yerleşim düzeyinde belirgin bir azalma olduğu saptanmış; böylece SMN eksikliğinde stres granüllerindeki yerleşiminin azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgu, literatürde SMN'nin hücrel stres yanıtında ve stres granülü dinamiklerinde görev aldığını bildiren çalışmalarla uyumludur (114). Buna karşılık, eş-baskılama yapılan hücrelerde SMN ile G3BP1-pozitif stres granülleri arasındaki eş-yerleşim düzeyinin, sadece SMN baskılanan hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlenmiştir. Çalışmamızda, α -tübülün detirozinasyonunun artırılmasına rağmen SMN ile G3BP1 arasındaki eş-yerleşimde anlamlı bir değişiklik gözlenmemesi, SMN'nin hücre gövdesinde bulunan stres granülleri içerisine kısa mesafeli transportunun bu değişiklikten etkilenmediği şeklinde yorumlanabilir. Mikrotübüllerin stres granüllerinin hücre içindeki hareketi ve dağılımında rol aldığı bilinmekle birlikte, stres granülü oluşumu ve SMN'nin bu yapılara katılımının büyük ölçüde protein-protein ve RNA-protein etkileşimleriyle düzenleniyor olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, α -tübülün detirozinasyonu ve/veya mikrotübül

stabilitesindeki artışın SMN'nin stres granüllerindeki yerleşimi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

SMN hücre dışına salgılandığı bilinen bir proteindir. Fakat SMN proteini, klasik salgı yolağında görev alan N-terminal sinyal peptidine sahip değildir; bu nedenle ER-Golgi aracılı salgılanması beklenmemektedir. Peter ve ark. (2011)'nın gerçekleştirdiği bir çalışmada, SMN proteininin COPI vezikül kompleksinin α -COP alt birimi ile etkileşim gösterdiği ve akson boyunca birlikte taşındığı gösterilmiştir (106). Başka bir çalışmada ise, NSC34 hücrelerinde SMN granüllerinin trans-Golgi belirteçleri olan Tgn38 ve Golgin-97 ile kolokalizasyon oranının, cis-Golgi belirteci GM130 ile gözlenen kolokalizasyon oranından daha yüksek olduğu gösterilmiştir (107). Bu bulgular, SMN proteininin, COPI vezikülleri ve trans-Golgi ilişkili klasik olmayan (alternatif) hücre içi taşıma/salgı mekanizmaları aracılığıyla akson boyunca taşınabileceğini ve hücre dışına salınabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, SMN proteininin eksozomlar ve mikroveziküller aracılığıyla hücre dışı ortama salındığı da gösterilmiştir (110). Bu veziküllerin hücre membranına yönlendirilmesinde mikrotübül ağı önemli rol oynamaktadır (135). Bu nedenle, *in vitro* SMA modelinde artan α -tübülün detirozinasyonunun, hücre dışına salgılanan SMN proteininin düzeyini etkileyebileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda yalnızca SMN'nin baskılandığı hücrelerde ekstraselüler SMN düzeyinin belirgin şekilde azalması, SMN eksikliğinin yalnızca hücre içi protein miktarını değil, aynı zamanda hücre dışına salgılanan SMN'ni de etkilediğini göstermiştir. Bu bulgu, diğer hücre tiplerinde gerçekleştirilen çalışmalarla uyumludur (110,111). TTL ile eş-baskılama yapılarak α -tübülün detirozinasyonu arttırılan hücrelerde ise, tek başına SMN baskılanan hücrelere göre hücre dışındaki SMN miktarının arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu anterograd yöndeki SMN transportunun α -tübülün detirozinasyonu düzeyinden etkilendiğine yönelik bulguları desteklemektedir.

Tez kapsamında yürütülen çalışmaların hiçbirinde, tek başına TTL baskılamasının SMN yerleşimi ve salgılanması üzerine bir etkisi görülmemiştir. Bu durumun, α -tübülün detirozinasyon değişikliğinin etkisinin özellikle SMN eksikliği bulunan hücrelerde belirgin hale geldiğini düşündürmüştür. SMN baskılanması sonucunda detirozinasyonun yanı sıra mikrotübül asosiye proteinlerin ifadeleri ve post-translasyonel modifikasyonları da değişmektedir. MAP1B, MAP2, EB3, statmin

gibi asosiye proteinlerin yanı sıra, SMA fare modeli ve insan motor nöronları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, kinezin 1 ailesinin diğer bir üyesi olan KIF5A proteininin ifadesinin azaldığı gösterilmiş; KIF5A düzeyinin artırılmasının, SMN eksikliğinin neden olduğu akson rejenerasyonu bozukluklarını düzeltebildiği gösterilmiştir (124). Bu bulgu, SMN eksikliği nedeniyle motor proteinlerin düzeyinin de etkilenebildiğini göstermekle birlikte çalışmamızda SMN baskılanan hücrelerde araştırılan KIF5C protein düzeyinin değişmediği belirlenmiştir. Dolayısıyla SMN eksikliği, farklı yollardan hücre içi taşıma süreçlerinde hatalara neden olabilir. Daha geniş bir çerçeveden bakılırsa, SMN eksikliği sonucunda aktin filamentleri ve ara filamentlerde de hatalar ortaya çıktığından, hücre iskeleti önemli ölçüde etkilenebilmektedir. Bu nedenlerle, SMA durumunda mikrotübül post-translasyonel modifikasyonlarının taşıma süreçleri üzerindeki etkilerinin daha kritik öneme sahip olacağı düşünülebilir.

Tez çalışmasının devamında, α -tübülün detirozinasyonuna bağlı olarak SMN proteininin yerleşiminde saptanan değişikliklerin moleküler nedenleri araştırılmıştır. Biyoinformatik analizler gerçekleştirilerek SMN'nin mikrotübül-aracılı transportunda görev alabilecek motor proteinlerle olası etkileşimleri incelenmiştir. Yapılan protein etkileşim ağı analizlerinde, SMN'nin ikinci ve üçüncü komşuluğunda, anterograd yöndeki taşımada görev yapan kinezin-1 motor protein ailesi üyeleri olan KIF5A, KIF5B ve KIF5C'nin bulunduğu belirlenmiştir. Bu proteinler arasında KIF5C'nin detirozinlenmiş ve stabil mikrotübüllerle tercihlili etkileşim gösterdiği literatürde birden fazla çalışmada tanımlanmıştır (40,41,70). Bu nedenle SMN'nin KIF5C aracılığıyla taşınabileceği ve α -tübülün detirozinasyonundaki artışa bağlı olarak gözlenen SMN yerleşim değişikliklerinde KIF5C'nin rol oynayabileceği öngörülerek deneysel çalışmalar yapılmıştır. Hücrelerde KIF5C gen ifadesi %63 oranında baskılanmış, elde edilen bulgular, KIF5C'nin SMN'in hücre içindeki dağılımı üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir. İmmünfloresan boyama çalışmalarının sonuçları SMN'nin hücre gövdesinde belirgin şekilde yoğunlaştığını göstermiş olup KIF5C'nin SMN'nin distal bölgelere taşınmasında rol oynayabileceğine işaret etmektedir. KIF5C düzeyinin SMN düzeyini etkilemediği belirlenmiş, böylece SMN sinyalinin hücre gövdesindeki artışının ifade değişikliğinden kaynaklanmadığı gösterilmiştir. KIF5C'nin özellikle anterograd aksonal taşımada görev yapan bir motor protein olduğu göz önünde

bulundurulduğunda, bu bulgular SMN içeren ribonükleoprotein komplekslerinin mikrotübül boyunca nörit uçlarına doğru taşınmasında KIF5C'nin katkısı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, KIF5C baskılanan hücrelerde nörit uçlarında gözlenen SMN sinyalindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması, değişimlerin distal bölgeye daha geç yansması nedeniyle olabilir. Bununla birlikte, SMN'nin akson boyunca iki yönlü taşınan bir protein olması nedeniyle, SMN taşınmasında KIF5C dışında farklı kinezin aile üyelerinin ve dinein motor proteininin de görev alıyor olması muhtemeldir. Dolayısıyla, SMN'nin hücre gövdesindeki belirgin yoğunlaşması, taşıma mekanizmasında aksama olduğunu desteklese de, distal bölgelerdeki değişimin daha net ortaya konabilmesi için daha uzun süreli baskılama deneyleri veya canlı hücre görüntüleme yaklaşımları yararlı olacaktır.

Tez çalışmalarına ait bu bulgular, α -tübülün detirozinasyonunun, SMN proteininin anterograd yönde taşınmasında düzenleyici bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Çalışmamızda SMN eksikliğinin sitoplazmik ve ekstraselüler SMN düzeylerini azalttığı gösterilirken, bu hücrelerde α -tübülün detirozinasyonunun artırılmasıyla SMN'nin özellikle nörit uçlarına yönelimi ve hücre dışına taşınmasının yeniden düzenlenerek kısmen arttırılabildiğini gösterilmiştir. Buna karşılık çekirdek ve stres granüllerindeki yerleşiminin belirgin şekilde değişmemesi, α -tübülün detirozinasyonun daha çok mikrotübül-bağımlı uzun mesafeli sitoplazmik taşıma süreçlerini etkilediğini düşündürmektedir. KIF5C eksikliği durumunda SMN'nin hücre gövdesinde yoğunlaşması bu süreçte kinezin-aracılı anterograd taşınmanın kritik olabileceğini desteklemektedir.

SMA patogenezi açısından SMN miktarının yanı sıra, SMN'nin hücre içindeki taşınması ve doğru yerleşiminin de önemli olduğu düşünülmektedir. SMN eksikliğinde aksonlarda organel (örn. mitokondri) ve nöromüsküler kavşakta görevli proteinlere ait mRNA'ların (örn. β aktin mRNA) transportunda hatalar olduğu bildirilmiştir (115-117, 136,137). Bu tez sayesinde ilk defa, SMN yerleşiminin α -tübülün detirozinasyonunun modülasyonu yoluyla düzenlenebileceğine ve bu süreçte KIF5C'nin rol aldığına yönelik bulgular elde edilmiştir. Bu yaklaşımın SMN proteini arttırıcı tedavilerle birlikte uygulanması ve ardından SMN yerleşimindeki düzenlenmenin işlevleri üzerindeki etkilerinin araştırılması değerli olacaktır.

Çalışmalarımız sonucunda, mikrotübül detirozinasyonu ve kinezin temelli taşıma mekanizmalarının SMA için yeni terapötik hedefler oluşturabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

6.1. Sonuçlar

- Motor nöron benzeri NSC34 hücrelerinde TTL gen ifadesinin daha önce baskılanmamış olması nedeniyle, TTL mRNA'sını hedefleyen iki farklı siRNA dizisi ile gen baskılama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda, TTL siRNA (1) dizisi ile TTL gen ifadesinde yaklaşık %75 oranında azalma elde edilebilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

- NSC34 hücrelerinde *in vitro* SMA modelinin oluşturulması ve bu modelde α -tübülün detirozinasyonunun artırılması amacıyla, SMN ve TTL gen ifadeleri birlikte baskılanmıştır. Eş baskılama yapılan hücrelerde, α -tübülün detirozinasyon düzeyinin yalnızca SMN baskılanan hücrelere kıyasla %60 oranında arttırılabildiği gösterilmiştir.

- *In vitro* SMA modelinde, α -tübülün detirozinasyonunun artırılmasının nöronal morfoloji üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla, SMN tek başına ve TTL ile birlikte baskılanmıştır. Farklılaşan hücrelerde gerçekleştirilen nörit uzunluk analizlerinde, çekirdek bitiminden nörit ucuna kadar ölçüm yapılmıştır. SMN'nin tek başına baskılandığı hücrelerde, önceki ölçümlerimizle uyumlu olarak nörit uzunluğunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Benzer şekilde, TTL'nin baskılanarak α -tübülün detirozinasyonunun artırıldığı *in vitro* SMA modelinde de nörit uzunluğunda anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir.

- *In vitro* SMA modelinde, α -tübülün detirozinasyonundaki artışın SMN proteininin çekirdekteki yerleşimi üzerine etkisi araştırılmıştır. SMN ve Cajal cisimcik belirteci olan coilin proteini birlikte boyanmış ve kantitatif mikroskopik analizler gerçekleştirilmiştir. Bulgular, SMN baskılanan hücrelerde Cajal cisimcik sayısının literatürle uyumlu şekilde azaldığını göstermiştir. Ancak SMN ve TTL'nin birlikte baskılanarak detirozinasyonun arttırıldığı hücrelerde, yalnızca SMN baskılanan hücrelere kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Böylece α -tübülün detirozinasyon artışının SMN'nin çekirdekteki yerleşimini etkilemediği sonucuna varılmıştır.

- *In vitro* SMA modelinde, α -tübülün detirozinasyonundaki artışın SMN proteininin sitoplazmik yerleşimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. SMN ifadesi baskılanan hücrelerde, beklendiği şekilde SMN düzeyinin hem hücre gövdesinde hem de nörit ucunda azaldığı belirlenmiştir. Buna karşın, SMN ve TTL'nin birlikte baskılandığı hücrelerde, yalnızca SMN baskılanan hücelere kıyasla hücre gövdesindeki SMN düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı, nörit ucundaki SMN düzeyinin ise arttığı saptanmıştır. Bu bulgular, SMN baskılanan hücrelerde azalan α -tübülün detirozinasyonu arttırıldığında SMN'nin hücre içi dağılımının düzenlenebileceğini göstermiştir.

- *In vitro* SMA modelinde, α -tübülün detirozinasyonundaki artışın SMN proteininin stres granüllerindeki yerleşimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. SMN baskılanan hücrelerde, SMN proteini ile stres granülü belirteci olan G3BP1-pozitif stres granülleri arasındaki eş-yerleşim düzeyinin baskılama yapılmamış kontrol hücrelerine kıyasla azaldığı belirlenmiştir. Ancak SMN ve TTL'nin birlikte baskılandığı hücrelerde, yalnızca SMN baskılanan hücelere göre anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu sonuçlar, SMN'nin stres granülleri ile ilişkili olduğunu, ancak α -tübülün detirozinasyonundaki artışın bu süreç üzerinde ek bir etkisinin bulunmadığını göstermiştir.

- *In vitro* SMA modelinde, α -tübülün detirozinasyonundaki artışın SMN'nin hücre dışı ortama taşınması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. SMN baskılanan hücrelerden ekstraselüler ortama salınan SMN düzeyinin baskılama yapılmayan kontrol hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir. Literatürde başka hücre tiplerinde elde edilen bu bulgu, ilk defa NSC34 hücrelerinde gösterilmiştir. SMN ve TTL'nin birlikte baskılanarak α -tübülün detirozinasyonunun arttırıldığı hücrelerde ise ekstraselüler SMN düzeyinin, yalnızca SMN baskılanan hücelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. Bu bulgular, α -tübülün detirozinasyonundaki artışın SMN'nin hücre dışına taşınmasını düzenleyebileceğini göstermiştir.

- *In vitro* SMA modelinde azaldığı bilinen α -tübülün detirozinasyon düzeyinin artırılması sonucunda, SMN proteininin sitoplazmik yerleşiminin ve hücre dışına salgılanma düzeyinin düzenlenebildiği belirlenmiştir. Bu bulgular, detirozinasyon değişikliğinin SMN'nin anterograd yönde taşınmasını etkileyebileceğini

düşündürmüştür. SMN yerleşimi ve α -tübülün detirozinasyonu arasındaki ilişkinin mekanizmasının araştırılabilmesi amacıyla SMN ile motor proteinler arasındaki protein etkileşimleri incelenmiştir. Gerçekleştirilen *in silico* analizlerde, SMN'nin motor proteinlerle doğrudan etkileşimi saptanmamış ancak kinezin-1 ailesi üyeleri (KIF5A, KIF5B ve KIF5C) ve dinein (DYNC1H1) dolaylı etkileşim gösterebileceği belirlenmiştir. Bulgular literatür verileriyle birlikte değerlendirildiğinde, detirozinlenmiş mikrotübüllerle tercihli etkileşim gösteren KIF5C'nin SMN taşınmasında rol oynayabileceği öngörülmüştür.

- Öncelikle *in vitro* SMA modelinde KIF5C protein düzeyi araştırılmış; Western blot analizleri sonucunda, SMN baskılanan NSC34 hücrelerinde KIF5C protein düzeyinde baskılama yapılmayan kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.

- KIF5C'nin SMN taşınmasındaki rolünün araştırılabilmesi amacıyla siRNA-temelli gen ifadesi baskılaması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. NSC34 hücrelerinde KIF5C gen ifadesinin daha önce baskılanmamış olması nedeniyle, KIF5C mRNA'sını hedefleyen iki farklı siRNA dizisi ile gen baskılama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda, KIF5C siRNA (2) dizisi ile KIF5C gen ifadesinde yaklaşık %66 oranında azalma elde edilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

- NSC34 hücrelerinde KIF5C'nin SMN yerleşimine etkisinin araştırılmasından önce, KIF5C baskılanan hücrelerde SMN protein düzeyi kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, KIF5C gen ifadesi baskılanan hücrelerde baskılama yapılmayan kontrol hücrelere göre SMN protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermiştir.

- Ardından KIF5C baskılanan hücrelerde SMN proteininin yerleşimi araştırılmıştır. Baskılama yapılan hücrelerde SMN proteininin hücre gövdesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yoğunlaştığı gösterilmiştir. Nörit uçlarındaki SMN düzeyinde ise azalma gözlenmesine rağmen bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgular, KIF5C'nin SMN'nin mikrotübül boyunca anterograd yönde taşınmasında rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

- Son olarak NSC34 hücrelerinde KIF5C'nin SMN proteininin hücre dışına salgılanması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, KIF5C gen ifadesi baskılanan hücrelerde ekstraselüler SMN düzeyinin baskılama yapılmayan kontrol

grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermediğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, SMN'nin farklı motor protein/ler aracılığıyla hücre dışı ortama salınabileceğine işaret etmiştir.

6.2. Öneriler

- α -tübülün detirozinasyonunun etkisinin primer motor nöron kültürleri ve SMA fare modellerin de araştırılması, farklı hücre tipleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilebilmesi açısından önerilmektedir.

- Mikrotübül stabilitesini düzenleyen diğer post-translasyonel modifikasyonların (örn. asetilasyon, poliglutamilasyon), özellikle delta 2 tübülün'in, SMN yerleşimi ve taşınması üzerindeki etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.

- SMN'nin hücre dışına neden salgılandığı ve bu sürecin biyolojik anlamı henüz tam olarak bilinmemektedir. Özellikle salgılanan SMN'nin komşu hücreler tarafından alınarak işlevsel bir rol üstlenip üstlenmediğinin araştırılması, SMA patogenezi ve hücreler arası iletişim mekanizmalarının araştırılması açısından kıymetli olacaktır. α -tübülün detirozinasyonunun SMN'nin hücre dışına salgılanmasını nasıl düzenlediğinin anlaşılması için, eksozom ve mikroveziküllerin içeriklerinin yanı sıra SMN'nin bu veziküllere yüklenme ve taşınma süreçlerinin incelenmesi gelecekteki çalışmalar açısından önem taşımaktadır.

- α -tübülün detirozinasyonunun SMN taşınımı üzerindeki etkisinin daha ayrıntılı anlaşılabilmesi için, canlı hücre görüntüleme yöntemleri ile SMN granüllerinin aksonal taşınım dinamiklerinin incelenmesi yararlı olacaktır. SMN floresan işaretli olarak canlı hücrelerde takip edilirse (ör. SMN-GFP), time-lapse canlı hücre görüntüleme ile SMN granül hareket yönü, taşınma hızı, duraklama süreleri, büyüme bölgesine ulaşma zamanı, retrograd/anterograd hareket oranı nicel olarak analiz edilebilir.

- Tez çalışmasında KIF5C'nin SMN'nin anterograd yönde taşınımında rol oynayabileceği gösterilmiş olmakla birlikte, SMN ile KIF5C arasındaki etkileşimin canlı hücre görüntüleme ve/veya protein etkileşim analiz (örn; BioID, TurboID, FRET) yöntemleri ile doğrulanması önerilmektedir.

- KIF5C dışında, *in silico* analizlerde belirlenen diğer motor proteinlerin (KIF5A, KIF5B ve DYNC1H1 gibi) SMN taşınımındaki rollerinin de araştırılması önerilmektedir.

- Mikrotübül stabilitesinin düzenlenmesine yönelik yaklaşımların, SMA’da SMN yerleşimi ve dağılımı üzerindeki etkilerinin araştırılması; SMN’nin hücre içindeki yerleşim değişikliğinin; aksonal transport, RNA metabolizması, ve spliceozom dinamikleri gibi temel hücresel süreçler üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle gelecekteki çalışmaların, SMN düzeylerindeki artışın yanı sıra SMN yerleşimindeki değişimlerin fonksiyonel sonuçlarını da incelemesi, ayrıca bu yaklaşımın SMN arttırıcı tedavilerin etkinliğini yükselterek SMA’nın kombine tedavisi açısından uygunluğunun değerlendirilmesi, gelecekte yeni ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Fletcher D, Mullins R. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463:485-92.
2. Pfaendtner J, Lyman E, Pollard TD, Voth GA. Structure and dynamics of the actin filament. *J Mol Biol*. 2009;396(2):252-63.
3. Pradeau-Phélut L, Etienne-Manneville S. Cytoskeletal crosstalk: A focus on intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 2024;87:102325.
4. Das A, Kunwar A. Septins: Structural insights, functional dynamics, and implications in health and disease. *J Cell Biochem*. 2025;126(1):e30660.
5. Mostowy S, Cossart P. Septins: The fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(3):183-94.
6. Muroyama A, Lechler T. Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development*. 2017;144(17):3012-21.
7. Huang L, Peng Y, Tao X, Ding X, Li R, Jiang Y ve ark. Microtubule organization is essential for maintaining cellular morphology and function. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1623181.
8. Akhmanova A, Kapitein LC. Mechanisms of microtubule organization in differentiated animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(8):541-58.
9. Conde C, Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(5):319-32.
10. Akhmanova A, Steinmetz M. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:309-22.
11. Wiese C, Zheng Y. Microtubule nucleation: Gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 20):4143-53.
12. Brouhard GJ, Rice LM. Microtubule dynamics: An interplay of biochemistry and mechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(7):451-63.
13. Schulze E, Kirschner M. Dynamic and stable populations of microtubules in cells. *J Cell Biol*. 1987;104(2):277-88.
14. Baas PW, Rao AN, Matamoros AJ, Leo L. Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2016;73(9):442-60.
15. Janke C, Bulinski JC. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: Mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12:773-86.
16. Moutin MJ, Bosc C, Peris L, Andrieux A. Tubulin post-translational modifications control neuronal development and functions. *Dev Neurobiol*. 2021;81(3):253-72.

17. Binarová P, Tuszyński J. Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease. *Cells*. 2019;8(10):1294.
18. Song Y, Brady ST. Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol*. 2015;25(3):125-36.
19. Bär J, Popp Y, Bucher M, Mikhaylova M. Direct and indirect effects of tubulin post-translational modifications on microtubule stability: Insights and regulations. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2022;1869(6):119241.
20. Wloga D, Gaertig J. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 20):3447-55.
21. Eshun-Wilson L, Zhang R, Portran D, Nachury MV, Toso DB, Löhr T ve ark. Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(21):10366-71.
22. Cappelletti G, Calogero AM, Rolando C. Microtubule acetylation: A reading key to neural physiology and degeneration. *Neurosci Lett*. 2021;755:135900.
23. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelières FP, King SJ, Humbert S ve ark. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci*. 2007;27(13):3571-83.
24. Simões-Pires C, Zwick V, Nurisso A ve ark. HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: What makes it different from the other HDACs? *Mol Neurodegener*. 2013;8:7.
25. Li G, Jiang H, Chang M, Xie H, Hu L. HDAC6 α -tubulin deacetylase: A potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2011;304(1-2):1-8.
26. Adalbert R, Kaieda A, Antoniou C, Loreto A, Yang X, Gilley J ve ark. Novel HDAC6 inhibitors increase tubulin acetylation and rescue axonal transport of mitochondria in a model of Charcot–Marie–Tooth type 2F. *ACS Chem Neurosci*. 2019;11(3):258-67.
27. Barra HS, Arce CA, Argaraña CE. Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. In: Humana Press eBooks. 1989:133-53.
28. Viar GA, Pigino G. Tubulin posttranslational modifications through the lens of new technologies. *Curr Opin Cell Biol*. 2024;88:102362.
29. Janke C, Magiera MM. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(6):307-26.
30. Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H. Tubulin post-translational modifications and microtubule dynamics. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2207.

31. Westermann, S., Weber, K. 2003. "Post-translational modifications regulate microtubule function" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4, 12, 938-47.
32. Aillaud C, Bosc C, Peris L, Bosson A, Heemeryck P, Van Dijk J ve ark. Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. *Science*. 2017;358(6369):1448-53.
33. Nieuwenhuis J, Adamopoulos A, Bleijerveld OB, Mazouzi A, Stickel E, Celie P ve ark. Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. *Science*. 2017;358(6369):1453-6.
34. Sanyal C, Pietsch N, Ramirez Rios S, Peris L, Carrier L, Moutin MJ. The detyrosination/re-tyrosination cycle of tubulin and its role and dysfunction in neurons and cardiomyocytes. *Semin Cell Dev Biol*. 2023;137:46-62.
35. Sanyal C, Pietsch N, Ramirez Rios S, Peris L, Carrier L, Moutin MJ. The detyrosination/re-tyrosination cycle of tubulin and its role and dysfunction in neurons and cardiomyocytes. *Semin Cell Dev Biol*. 2023;137:46-62
36. Prota AE, Magiera MM, Kuijpers M, Bargsten K, Frey D, Wieser M ve ark. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J Cell Biol*. 2013;200(3):259-70.
37. Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M ve ark. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7853-8.
38. Webster DR, Gundersen GG, Bulinski JC, Borisy GG. Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9040-4.
39. Peris L, Thery M, Fauré J, Saoudi Y, Lafanechère L, Chilton JK ve ark. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol*. 2006;174(6):839-49.
40. Konishi Y, Setou M. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci*. 2009;12(5):559-67.
41. Dunn S, Morrison EE, Liverpool TB, Molina-París C, Cross RA, Alonso MC ve ark. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci*. 2008;121(7):1085-95.
42. Makarov D, Kielkowski P. Chemical proteomics reveals protein tyrosination extends beyond the alpha-tubulins in human cells. *ChemBioChem*. 2022;23(23):e202200414.
43. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res*. 2025.

44. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
45. Szyk A, Deaconescu AM, Piszczek G, Roll-Mecak A. Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(11):1250-8.
46. Zink S, Grosse L, Freikamp A, Bänfer S, Müksch F, Jacob R. Tubulin detyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 24):5998-6008.
47. Lavrsen K, Rajendraprasad G, Leda M, Eibes S, Vitiello E, Katopodis V ve ark. Microtubule detyrosination drives symmetry breaking to polarize cells for directed cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(22):e2300322120
48. Peris L, Parato J, Qu X, Soleilhac JM, Lanté F, Kumar A ve ark. Tubulin tyrosination regulates synaptic function and is disrupted in Alzheimer's disease. *Brain*. 2022;145(7):2486-506.
49. Bora G, Hensel N, Rademacher S, Koyunoğlu D, Sunguroğlu M, Aksu-Mengeş E ve ark. Microtubule-associated protein 1B dysregulates microtubule dynamics and neuronal mitochondrial transport in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2020;29(24):3935-44.
50. Bodakuntla S, Jijumon AS, Villablanca C, Gonzalez-Billault C, Janke C. Microtubule-associated proteins: Structuring the cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 2019;29(10):804-19.
51. Peng N, Nakamura F. Microtubule-associated proteins and enzymes modifying tubulin. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2023;80(3-4):60-76.
52. Wattanathamsan O, Pongrakhananon V. Emerging role of microtubule-associated proteins on cancer metastasis. *Front Pharmacol*. 2022;13:935493.
53. Barlan K, Gelfand VI. Microtubule-based transport and the distribution, tethering, and organization of organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(5):a025817.
54. Asthana J, Kuchibhatla A, Jana SC, Ray K, Panda D. DYNein Light Chain 1 (LC8) association enhances microtubule stability and promotes microtubule bundling. *J Biol Chem*. 2012;287(48):40793-805.
55. Canty JT, Tan R, Kusakci E, Fernandes J, Yildiz A. Structure and mechanics of dynein motors. *Annu Rev Biophys*. 2021;50:549-74.
56. Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. 1998;279(5350):519-26.
57. Drummond DR. Regulation of microtubule dynamics by kinesins. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(9):927-34.

58. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y ve ark. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:682-96.
59. Franker MAM, Hoogenraad CC. Microtubule-based transport – basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 11):2319-29.
60. Sirajuddin M, Rice L, Vale R. Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat Cell Biol.* 2014;16:335-44.
61. Verhey KJ, Hammond JW. Traffic control: Regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(11):765-77.
62. Yildiz A. Mechanism and regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2025;26(2):86-103.
63. Verhey KJ, Ohi R. Causes, costs and consequences of kinesin motors communicating through the microtubule lattice. *J Cell Sci.* 2023;136(5):jcs260735
64. Loughlin R, Riggs B, Heald R. SnapShot: Motor proteins in spindle assembly. *Cell.* 2008;134(3):548-548.e1.
65. Mayr MI, Hümmer S, Bormann J, Grüner T, Adio S, Woehlke G ve ark. The human kinesin KIF18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr Biol.* 2007;17(6):488-98.
66. Gumy LF, Chew DJ, Tortosa E, Katrukha EA, Kapitein LC, Tolkovsky AM ve ark. The kinesin-2 family member KIF3C regulates microtubule dynamics and is required for axon growth and regeneration. *J Neurosci.* 2013;33(28):11329-45.
67. Saadh MJ, Ahmed HH, Kareem RA, Chandra M, Monsi M, Walia C ve ark. From motor proteins to oncogenic factors: The evolving role of kinesin superfamily proteins in breast cancer development. *Mol Biotechnol.* 2026;68(3):1023-46.
68. Dietrich KA, Sindelar CV, Brewer PD, Downing KH, Cremo CR, Rice SE. The kinesin-1 motor protein is regulated by a direct interaction of its head and tail. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(26):8938-43.
69. Kanai Y, Okada Y, Tanaka Y, Harada A, Terada S, Hirokawa N. KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J Neurosci.* 2000;20(17):6374-84.
70. Cai D, McEwen DP, Martens JR, Meyhofer E, Verhey KJ. Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between kinesin motors. *PLoS Biol.* 2009;7(10):e1000216.
71. Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J ve ark. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol.* 2006;16(21):2166-72.

72. Balabanian L, Berger CL, Hendricks AG. Acetylated microtubules are preferentially bundled leading to enhanced kinesin-1 motility. *Biophys J*. 2017;113(7):1551-60.
73. Kaul N, Soppina V, Verhey KJ. Effects of α -tubulin K40 acetylation and deetyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. *Biophys J*. 2014;106(12):2636-43.
74. Morfini GA, You YM, Pollema SL, Kaminska A, Liu K, Yoshioka K ve ark. Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat Neurosci*. 2009;12(7):864-71.
75. Mercuri E, Sumner CJ, Muntoni F, Darras BT, Finkel RS. Spinal muscular atrophy. *Nat Rev Dis Primers*. 2022;8(1):52.
76. Nicolau S, Waldrop MA, Connolly AM, Mendell JR. Spinal muscular atrophy. *Semin Pediatr Neurol*. 2021;37:100878.
77. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Evlilik Öncesi SMA Taşıyıcı Tarama Programı. Available from: [T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü](#). Erişim tarihi: 27 Mayıs 2026.
78. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L ve ark. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-65.
79. Ogino S, Wilson RB. Spinal muscular atrophy: Molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004;4(1):15-29.
80. Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet*. 1980;1(8174):919-22.
81. Ross LF, Kwon JM. Spinal muscular atrophy: Past, present, and future. *NeoReviews*. 2019;20(8):e437-51.
82. Nishio H, Niba ETE, Saito T, Okamoto K, Takeshima Y, Awano H. Spinal muscular atrophy: The past, present, and future of diagnosis and treatment. *Int J Mol Sci*. 2023;24(15):11939.
83. Schorling DC, Pechmann A, Kirschner J. Advances in treatment of spinal muscular atrophy - New phenotypes, new challenges, new implications for care. *J Neuromuscul Dis*. 2020;7(1):1-13.
84. Hensel N, Kubinski S, Claus P. The need for SMN-independent treatments of spinal muscular atrophy (SMA) to complement SMN-enhancing drugs. *Front Neurol*. 2020;11:45.
85. Aragon-Gawinska K, Daron A, Ulinici A, Vanden Brande L, Seferian A, Gidaro T ve ark. Sitting in patients with spinal muscular atrophy type 1 treated with nusinersen. *Dev Med Child Neurol*. 2020;62:310-14

86. Al-Jedai A, Al-Mudaiheem H, AlSakran A, Bashiri FA, Ghamdi F, Almuhaizea MA ve ark. Pioneering SMA therapies for all types: Survival gains, cost dynamics, and performance-based agreements. *Cost Eff Resour Alloc.* 2025;23(1):40.
87. Yeo CJJ, Tizzano EF, Darras BT. Challenges and opportunities in spinal muscular atrophy therapeutics. *Lancet Neurol.* 2024;23(2):205-18.
88. Butchbach MER. Genomic variability in the survival motor neuron genes (SMN1 and SMN2): Implications for spinal muscular atrophy phenotype and therapeutics development. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):7896.
89. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000;15(3):228-37.
90. Bora G, Ayşe YK, Can Ebru BK, Vildan Göknur H, Haluk Aydın T, Hayat EY ve ark. Recent therapeutic developments in spinal muscular atrophy. *Turk J Med Sci.* 2018;48(2):203-11.
91. Swoboda KJ, Prior TW, Scott CB, McNaught TP, Wride MC, Reyna SP ve ark. Natural history of denervation in SMA: Relation to age, SMN2 copy number, and function. *Ann Neurol.* 2005;57:704-12.
92. Calucho M, Bernal S, Alías L, March F, Venceslá A, Rodríguez-Álvarez FJ, vd. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases Neuromuscular Disorders. 01 Mart 2018;28(3):208-15.
93. Hosseinibarkooie S, Peters M, Torres-Benito L, Rastetter RH, Hupperich K, Hoffmann A ve ark. The power of human protective modifiers: PLS3 and CORO1C unravel impaired endocytosis in spinal muscular atrophy and rescue SMA phenotype. *Am J Hum Genet.* 2016;99(3):647-65.
94. Oprea GE, Kröber S, McWhorter ML, Rossoll W, Müller S, Krawczak M ve ark. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science.* 2008;320(5875):524-7.
95. Coover DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR ve ark. The Survival Motor Neuron Protein in Spinal Muscular Atrophy. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1205-1214.
96. Singh RN, Howell MD, Ottesen EW, Singh NN. Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2017;1860(3):299-315.
97. Anbo H, Sato M, Okoshi A, Fukuchi S. Functional Segments on Intrinsically Disordered Regions in Disease-Related Proteins. *Biomolecules.* 2019;9(3):88.

98. Matera AG, Frey MR. Coiled bodies and gems: Janus or gemini? *Am J Hum Genet.* 1998;63(2):317-21.
99. Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G. Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol.* 2007;22(8):990-4.
100. Detering NT, Schüning T, Hensel N ve ark. The phospho-landscape of the survival of motoneuron protein (SMN) protein: Relevance for spinal muscular atrophy (SMA). *Cell Mol Life Sci.* 2022;79:497.
101. Lafarga V, Tapia O, Sharma S, Bengoechea R, Stoecklin G, Lafarga M ve ark. CBP-mediated SMN acetylation modulates Cajal body biogenesis and the cytoplasmic targeting of SMN. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(3):527-546.
102. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 1996;15(14):3555-65.
103. Cauchi RJ. Gem depletion: Amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy crossover. *CNS Neurosci Ther.* 2014;20:574-81.
104. Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ. Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci.* 2003;23(16):6627-37.
105. Van Alstyne M, Tattoli I, Delestrée N, Recinos Y, Workman E, Shihabuddin LS ve ark. Gain of toxic function by long-term AAV9-mediated SMN overexpression in the sensorimotor circuit. *Nat Neurosci.* 2021;24(7):930-40.
106. Peter CJ, Evans M, Thayanithy V, Taniguchi-Ishigaki N, Bach I ve ark. The COPI vesicle complex binds and moves with survival motor neuron within axons. *Hum Mol Genet.* 2011;20:1701-11.
107. Ting CH, Wen HL, Liu HC, Hsieh-Li HM, Li H, Lin-Chao S. The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Golgi network. *PLoS One.* 2012;7(12):e51826.
108. Custer SK, Foster JN, Astroski JW, Androphy EJ. Abnormal Golgi morphology and decreased COPI function in cells with low levels of SMN. *Brain Res.* 2019;1706:135-46.
109. Zobaroğlu Özer P, Gözübüyük M, Çetin Ö, Hensel N, Emecen G, Malik A ve ark. Modulating microtubule stability via α -tubulin acetylation partially restores Golgi fragmentation in spinal muscular atrophy. *Turk J Biol.* 2026;50(2):158-69.
110. Nash LA, McFall ER, Perozzo AM ve ark. Survival motor neuron protein is released from cells in exosomes: A potential biomarker for spinal muscular atrophy. *Sci Rep.* 2017;7:13859.
111. René CA, Parks RJ. Extracellular vesicles efficiently deliver survival motor neuron protein to cells in culture. *Sci Rep.* 2025;15(1):5674.

112. Hua Y, Zhou J. Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules. *FEBS Lett.* 2004;572(1-3):69-74.
113. Yuan L, Mao LH, Huang YY, et al. Stress granules: emerging players in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener.* 2025;14:22.
114. Zou T, Yang X, Pan D, Huang J, Sahin M, Zhou J. SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31(4):541-50.
115. Bora-Tatar G, Erdem-Yurter H. Investigations of curcumin and resveratrol on neurite outgrowth: Perspectives on spinal muscular atrophy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:709108.
116. Bowerman M, Shafey D, Kothary R. Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J Mol Neurosci.* 2007;32(2):120-31
117. Jablonka S, Karle K, Sandner B, Andreassi C, von Au K, Sendtner M. Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2006;15(3):511-8.
118. Schüning T, Zeug A, Strienke K ve ark. The spinal muscular atrophy gene product regulates actin dynamics. *FASEB J.* 2024;38:e70055.
119. Jablonka S, Karle K, Sandner B, Andreassi C, von Au K, Sendtner M. Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2006;15(3):511-8.
120. Wen HL, Lin YT, Ting CH, Lin-Chao S, Li H, Hsieh-Li HM. Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2010;19(9):1766-78.
121. Wen HL, Ting CH, Liu HC, Li H, Lin-Chao S. Decreased stathmin expression ameliorates neuromuscular defects but fails to prolong survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis.* 2013;52:94-103.
122. Villalón E, Kline RA, Smith CE, Lorson ZC, Osman EY, O'Day S ve ark. AAV9-Stathmin1 gene delivery improves disease phenotype in an intermediate mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2019;28(22):3742-54.
123. Fuller HR, Mandefro B, Shirran SL, Gross AR, Kaus AS, Botting CH ve ark. Spinal muscular atrophy patient iPSC-derived motor neurons have reduced expression of proteins important in neuronal development. *Front Cell Neurosci.* 2016;9:506.
124. Miller N, Feng Z, Edens BM, Yang B, Shi H, Sze CC ve ark. Non-aggregating tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5 contributes to motor neuron degeneration in spinal muscular atrophy. *J Neurosci.* 2015;35(15):6038-50.

125. Akiyama T, Zeng Y, Guo C, Gautier O, Koepke L, Lyons H ve ark. KIF5A downregulation in spinal muscular atrophy links axonal regeneration defects with ALS. *JCI Insight*. 2026:e197941.
126. Baklou M, Valsecchi V, Laudati G, Kolici X, Brancaccio P, De Iesu N ve ark. MiR-140-3p regulates axonal motor protein KIF5A and contributes to axonal transport degeneration in SMA. *Cell Death Discov*. 2025;11(1):446.
127. Zobaroglu Özer P, Koyunoğlu D, Son ÇD, Erdem-Yurter H, Bora G. SMN loss dysregulates microtubule-associated proteins in spinal muscular atrophy model. *Mol Cell Neurosci*. 2022;120:103746.
128. Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT ve ark. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn*. 1992;194(3):209-221.
129. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E ve ark. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676-682.
130. Szklarczyk D ve ark. The STRING database in 2025: protein networks with directionality of regulation. *Nucleic Acids Res*. 2025;53(D1):D730-D737.
131. Oughtred R ve ark. The BioGRID database: a comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D529-D541.
132. GraphPad Prism version 10.0 for Windows. GraphPad Software, Boston, MA, USA. Available from: [GraphPad Software](#)
133. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR ve ark. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol*. 2003;163:801-812.
134. Chernov KG, Barbet A, Hamon L, Ovchinnikov LP, Curmi PA, Pastré D. Role of microtubules in stress granule assembly: Microtubule dynamical instability favors the formation of micrometric stress granules in cells. *J Biol Chem*. 2009;284(52):36569-36580.
135. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(1):108-120.
136. Chang T, Zheng W, Tsark W, Bates S, Huang H, Lin RJ ve ark. Brief report: phenotypic rescue of induced pluripotent stem cell-derived motoneurons of a spinal muscular atrophy patient. *Stem Cells*. 2011;29(12):2090-2093.
137. Dubey J, Ratnakaran N, Koushika SP. Neurodegeneration and microtubule dynamics: death by a thousand cuts. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:343:1-15.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Tezin tam başlığı; Spinal Musküler Atrofi’de Mikrotübül Stabilesindeki Azalmanın SMN Proteini Transportuna Etkisinin Araştırılması

Öğrencinin Adı Soyadı: Pelin Zobaroglu Özer

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 109

SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ’DE MİKROTÜBÜL STABİLİTESİNDEKİ AZALMANIN SMN PROTEİNİ TRANSPORTUNA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%9

BENZERLİK ENDEKSİ

%9

İNTERNET KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

2

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

3

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

4

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

5

openaccess.hacettepe.edu.tr

İnternet Kaynağı

6

www.jove.com

İnternet Kaynağı

7

ecommons.cornell.edu

İnternet Kaynağı

8

df6sxcketz7bb.cloudfront.net

İnternet Kaynağı

9

Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

10

acikerisim.harran.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

11

elib.uni-stuttgart.de

İnternet Kaynağı

12

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

13

theses.hal.science

İnternet Kaynağı

14

Gamze BORA, Dila KOYUNOĞLU, Merve SUNGUROĞLU, Hayat ERDEM YURTER. "Microtubule Structure, Organization and Defects: Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis", Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2019

EK-2. Tez Çalışması Dijital Makbuz

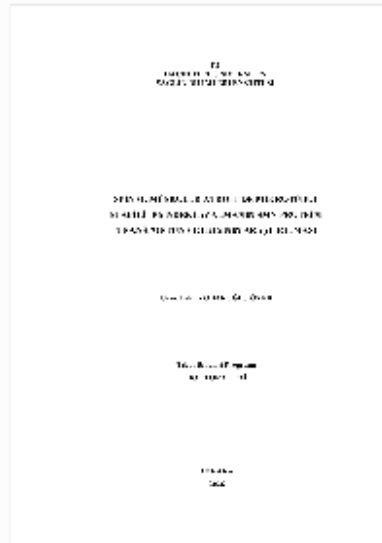


Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Pelin Zobaroglu Özer
 Ödev başlığı: Quick Submit
 Gönderi Başlığı: SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'DE MİKROTÜBÜL STABİLİTESİNDEKİ...
 Dosya adı: Pelin_Zobarog_lu_tez_son_kopyas.docx
 Dosya boyutu: 162.98K
 Sayfa sayısı: 109
 Kelime sayısı: 18,177
 Karakter sayısı: 135,052
 Gönderim Tarihi: 29-Haz-2026 11:34ÖÖ (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2991203382



EK-3. Uniprot Veritabanından Elde Edilen Fare (*Mus musculus*) Motor Protein Listesi

Gen Adı (<i>Mus musculus</i>)	Protein Adı
DYNC1H1	Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1
DYNC1I1	Dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 1
DYNC1I2	Dynein cytoplasmic 1 intermediate chain 2
DYNC1LI1	Dynein cytoplasmic 1 light intermediate chain 1
DYNC1LI2	Dynein cytoplasmic 1 light intermediate chain 2
DYNC2H1	Dynein cytoplasmic 2 heavy chain 1
DYNLL1	Dynein light chain LC8-type 1
DYNLL2	Dynein light chain LC8-type 2
DYNLRB1	Dynein light chain roadblock-type 1
DYNLRB2	Dynein light chain roadblock-type 2
DYNLT1	Dynein light chain Tctex-type 1
DYNLT3	Dynein light chain Tctex-type 3
KIF1A	Kinesin family member 1A
KIF1B	Kinesin family member 1B
KIF1C	Kinesin family member 1C
KIF2A	Kinesin family member 2A
KIF2B	Kinesin family member 2B
KIF2C	Mitotic centromere-associated kinesin
KIF3A	Kinesin family member 3A
KIF3B	Kinesin family member 3B
KIF3C	Kinesin family member 3C
KIF4A	Kinesin family member 4A
KIF5A	Kinesin family member 5A
KIF5B	Kinesin family member 5B
KIF5C	Kinesin family member 5C
KIF6	Kinesin family member 6
KIF7	Kinesin family member 7
KIF9	Kinesin family member 9
KIF10	CENPE
KIF11	Kinesin family member 11
KIF12	Kinesin family member 12
KIF13A	Kinesin family member 13A
KIF13B	Kinesin family member 13B
KIF14	Kinesin family member 14
KIF15	Kinesin family member 15
KIF16A	Kinesin family member 16A
KIF17	Kinesin family member 17
KIF18A	Kinesin family member 18A
KIF18B	Kinesin family member 18B
KIF19	Kinesin family member 19
KIF20A	Kinesin family member 20A
KIF20B	Kinesin family member 20B
KIF21A	Kinesin family member 21A
KIF21B	Kinesin family member 21B
KIF22	Kinesin family member 22
KIF23	Kinesin family member 23
KIF24	Kinesin family member 24
KIF25	Kinesin family member 25
KIF26A	Kinesin family member 26A
KIF26B	Kinesin family member 26B
KIF27	Kinesin family member 27
KIFC1	Kinesin family member C1
KIFC2	Kinesin family member C2
KIFC3	Kinesin family member C3

9. ÖZGEÇMİŞ

