

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PNPLA1* GENİNDE MUTASYON SAPTANAN
KONJENİTAL İKTİYOZ VAKALARINDA YAĞ DAMLACIKLARININ
LİPOFAJİ ARACILI REGÜLASYONUNUN İNCELENMESİ**

Gizem ÖNAL

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2015

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PNPLA1* GENİNDE MUTASYON SAPTANAN
KONJENİTAL İKTİYOZ VAKALARINDA YAĞ DAMLACIKLARININ
LİPOFAJİ ARACILI REGÜLASYONUNUN İNCELENMESİ**

Gizem ÖNAL

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Serap DÖKMECİ

ANKARA

2015

Anabilim Dalı :Tıbbi Biyoloji
Program :Tıbbi Biyoloji
Tez Başlığı :PNPLA1 Geninde Mutasyon Saptanan Otozomal Resesif
Konjenital İktiyoz Vakalarında Yağ Damlacıklarının
Lipofaji Aracılı Regülasyonunun İncelenmesi
Öğrenci Adı-Soyadı :Gizem ÖNAL
Savunma Sınavı Tarihi :03.02.2015

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Mehmet ALİKAŞIFOĞLU**
(Hacettepe Üniversitesi)
Tez danışmanı: **Prof. Dr. Serap DÖKMECİ**
(Hacettepe Üniversitesi)
Üye: **Prof. Dr. Hayat Erdem YURTER**
(Hacettepe Üniversitesi)
Üye: **Prof. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE**
(Hacettepe Üniversitesi)
Üye: **Doç Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU**
(Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana yol gösteren, cesaret veren ve değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım sayın Prof. Dr. Serap DÖKMECİ'ye,

Tez çalışmama değerli yorumları ile katkıda bulunan tez jüri üyeleri sayın Prof. Dr. Mehmet ALİKAŞİFOĞLU, Prof. Dr. Hayat Erdem YURTER, Prof. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE ve Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU'na,

Tez çalışmam süresince laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Sabancı Üniversitesi öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Devrim GÖZÜAÇIK'a ve çalışmalarım süresince büyük özveri göstererek en yoğun zamanlarında bile desteğini benden esirgemeyen sayın Dr. Özlem ORAL'a,

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

Karşılaştığım en ufak sorunda bile yanımda olan ve her zaman desteklerini hissettiğim sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her türlü fedakarlığı gösteren sevgili anneme, canım babama ve biricik kardeşime,

Her zaman olduğu gibi tez çalışmam süresince de yanımda olan, elinden gelen her türlü yardımı ve fedakarlığı gösteren, sonsuz sevgisi ve anlayışıyla benden desteğini esirgemeyen hayat arkadaşım Deniz ÖNAL'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi BAP-1451 projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

Önal G. *PNPLA1* Geninde Mutasyon Saptanan Konjenital İktiyoz Vakalarında Yağ Damlacıklarının Lipofaji Aracılı Regülasyonunun İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015. Patatin benzeri fosfolipaz domain içeren protein 1 (*PNPLA1*) gen mutasyonları Otozomal Resesif Konjenital İktiyoz (ORKİ) patolojisine neden olmaktadır. Hücrede yağ damlacıklarının üzerinde yerleşim gösteren *PNPLA1* proteininin fosfolipit metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Proteinin mutant olması durumunda hücredeki yağ damlacığı regülasyonunun nasıl etkilendiğinin araştırılması hastalık patolojisine sebep olan yolların aydınlatılması için katkı sağlayacaktır. Bu amaçla, tez kapsamında ilk aşamada *PNPLA1* gen mutasyonu görülen hastaların ve kontrol bireylerin primer fibroblast kültürlerinde yağ damlacıkları birikimi karşılaştırıldı. Hasta fibroblast hücrelerinde yağ damlacıklarının anormal birikimi ve boyutlarında artış tespit edildi. Ek olarak, hasta fibroblast hücrelerinde *PNPLA1* gen mutasyonlarının proteinin hücre içi yerleşimine etkisinin olmadığı ve proteinin hücrelerde ifade edildiği belirlendi. Yağ damlacıklarının lipofaji aracılı regülasyonunun araştırılması amacıyla ise, yağ damlacıklarının otofajik belirteçler (Atg5, LC3, LAMP1, LysoTracker® Red-DND-99) ile eş yerleşimi araştırıldı. Kontrol hücrelerinde yağ damlacıklarının otofajik belirteçlerle eş yerleşiminin belirlenmesi, yağ damlacıklarının bazal seviyede otofaji mekanizması ile yıkımını göstermektedir. Fizyolojik koşullarda, hasta fibroblast hücrelerinde ise yağ damlacıklarının otofajik belirteçler ile belirgin olarak eş yerleşimi saptanmadı. Elde edilen bulgular, *PNPLA1* mutasyonlarının hücrede otofajik akışın otofagozom oluşumu aşamasında aksaklıklar meydana getirebileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, hasta fibroblast hücrelerinde anormal yağ birikimi ve otofaji mekanizmasında aksaklıklar görülmesi, *PNPLA1* proteininin yağ damlacıklarının regülasyonunda önemli rolü olduğunu göstermektedir. Bu proteinin ileri fonksiyon analizlerinin gerçekleştirilmesi hastalık patolojisine neden olan mekanizmaların aydınlatılabilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Otozomal Resesif Konjenital İktiyoz (ORKİ), *PNPLA1*, Yağ Damlacıkları, Lipofaji.

ABSTRACT

Önal G. Investigation of Lipophagy Mediated Regulation of Lipid Droplets in Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis Patients with *PNPLA1* Gene Mutations. Hacettepe University Institute of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara,2015. Patatin Like Phospholipase Domain Containing Protein-1 (*PNPLA1*) gene mutations are shown to be linked with Autosomal Recessive Congenital Ichthyoses (ARCI). *PNPLA1* protein located on phospholipid membrane structure of lipid droplets plays crucial roles in biosynthesis and regulation of phospholipids. Investigating the effects of *PNPLA1* gene mutations on the regulation of lipid droplets will help to enlighten the pathways that cause the pathology of this disease. For this purpose, in the scope of this thesis firstly the accumulation of lipid droplets were compared between the primer fibroblast cultures of patient and control individuals. According to the results, an abnormal increase in number and size of lipid droplets of patient fibroblast cells compared to control cells was detected. In addition, it was determined that *PNPLA1* gene mutations have no effect on the cytoplasmic localization of the protein. In order to investigate lipophagy mediated regulation, colocalization of lipid droplets with designated autophagic markers (Atg5, LC3, LAMP1, LysoTracker[®] Red-DND-99) was studied using fluorescence staining methods. Discovery of colocalization of lipid droplets with autophagic markers is an indicator of degradation of lipid droplets with autophagy at basal levels. However, there was no colocalization of lipid droplets with autophagic markers was detected for patient fibroblast cells. As a result, finding of abnormal lipid accumulations and defects in autophagy mechanisms of patients fibroblast cells is an indicator of crucial role that *PNPLA1* protein playing in lipid droplet regulation. Advanced functional analysis of this protein will definitely help us to shed light on the prevailing mechanisms of the pathology of this disease.

Keywords: Autosomal Recessive Congenital Ichthyoses (ARCI), *PNPLA1*, Lipid Droplets, Lipophagy.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | x |
| ŞEKİLLER | xiii |
| TABLolar | xvi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Otozomal Resesif Konjenital İktiyoz | 3 |
| 2.2. Patatin Benzeri Fosfolipaz Domaini İçeren (PNPLA) Protein Ailesi ve PNPLA1 Proteini | 4 |
| 2.3. Yağ Damlacıkları ve Hücredeki Regülasyonu | 6 |
| 2.4. Lipofaji | 8 |
| 2.5. Amaç | 10 |
| 3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER | 12 |
| 3.1. Çalışmada İncelenen Bireyler | 12 |
| 3.2. Gereçler | 13 |
| 3.2.1. Hücre Kültürü | 13 |

| | Sayfa |
|---|-------|
| 3.2.2. Hücrelere Oleik Asit Uygulaması | 13 |
| 3.2.3. Floresan Boyama | 13 |
| 3.3. Deney Planı | 15 |
| 3.4. Yöntemler | 16 |
| 3.4.1. Hücre Kültürü | 16 |
| 3.4.2. Floresan Boyama Yöntemleri | 18 |
| 3.4.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz | 21 |
| 4. BULGULAR | 23 |
| 4.1. Hasta/Kontrol Fibroblast Hücrelerinde Yağ Damlacıkları Birikiminin Karşılaştırılması | 24 |
| 4.2. Mutant PNPLA1 Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşiminin Belirlenmesi | 27 |
| 4.3. Yağ Damlacıklarının Lipofaji Aracılı Regülasyonunun İncelenmesi | 28 |
| 4.3.1. BODIPY® 493/503 - Anti Atg5 Eş Floresan Boyaması | 28 |
| 4.3.2. BODIPY® 493/503 – Anti LC3 Eş Floresan Boyaması | 31 |
| 4.3.3. BODIPY® 493/503 - Anti LAMP1 Eş Floresan Boyaması | 35 |
| 4.3.4. BODIPY® 493/503-Lysotracker® Red-DND-99 Eş Floresan Boyaması | 38 |
| 5. TARTIŞMA | 41 |
| 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER | 48 |
| 6.1. Sonuçlar | 48 |
| 6.2. Öneriler | 49 |

| | Sayfa |
|---|-------|
| KAYNAKLAR | 50 |
| EKLER | 58 |
| Ek-1 Etik Kurul Onayı | 58 |
| Ek-2 Lipofaji Mekanizması ile İlişkili Eş Floresan Boyama Sonuçları | 59 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|------------------|---|
| % | Yüzde |
| # | Numara |
| µg/µl | Mikrogram/mikrolitre |
| µl | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| µM | Mikromolar |
| °C | Derece santigrat |
| a/h | Ağırlık/hacim |
| ABCA12 | <i>ATP-binding cassette, Subfamily A, Member 12</i> |
| ACAT | Açıl-coA açıl transferaz |
| AF568 | <i>Alexa Flour 568</i> |
| ALOX12B | <i>Arachidonate 12-lypoxygenase, 12R type</i> |
| ALOXE3 | <i>Arachidonate 12-lypoxygenase</i> |
| ANOVA | <i>Analysis of variance</i> |
| Atg | <i>Autophagy related</i> |
| ATGL | Adipoz trigliserit lipaz |
| BODIPY | <i>4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene</i> |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> |
| Ca ⁺⁺ | Kalsiyum iyonu |
| CERS3 | <i>Ceramide Synthase 3</i> |
| CO ₂ | Karbondioksit |
| CYP4F22 | <i>Cytochrome P450, Family 4, Subfamily F, Polypeptide 22</i> |

| | |
|------------------|---|
| DAPI | <i>4', 6 -diamidino-2-phenylindole</i> |
| DGAT | Digliserol açiltransferaz |
| DIC | <i>Differential Interference Contrast</i> |
| dk | dakika |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik asit |
| ER | Endoplazmik Retikulum |
| FBS | <i>Fetal Bovine Serum</i> |
| GS2 | <i>Gene Sequence-2</i> |
| Hİ | Harlequin İktiyoz |
| HSL | Hormon duyarlı lipaz |
| IP ₃ | Inositol 1,4,5-trisfosfat |
| KİE | Konjenital İktiyoziform Eritroderma |
| L | Litre |
| LAMP1 | Lizozomal Asosiy Membran Proteini 1 |
| LC3 | Mikrotübül asosiy hafif zincir protein-3 |
| LIPN | <i>Lipase Family Member N</i> |
| Lİ | Lamellar İktiyoz |
| M | Molar |
| mg/ml | Miligram/mililitre |
| Mg ⁺⁺ | Magnezyum iyonu |
| MGL | Monogliserit lipaz |

| | |
|---------|--|
| ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| mm | Milimetre |
| mTOR | Memeli rapamisin hedefi |
| n | Örnekleme sayısı |
| NaCl | Sodyum klorür |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| NIPAL4 | <i>NIPA-like domain containing 4</i> |
| nM | Nanomolar |
| OMIM | <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> |
| ORKİ | Otozomal Resesif Konjenital İktiyoz |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PFA | Paraformaldehit |
| PNPLA | Patatin Benzeri Fosfolipaz Domaini İçeren Protein |
| PROVEAN | <i>Protein Variation Effect Analyzer</i> |
| rpm | <i>Rotations per minute</i> |
| OSH | Ortalamanın standart hatası (<i>Standard error of means</i>) |
| SE | Sterol ester |
| sn | Saniye |
| TBS | <i>Tris buffered saline</i> |
| TG | Trigliserit |
| TGM1 | <i>Trans-glutaminase 1</i> |

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 2.1. <i>PNPLA1</i> geninin ve primer protein yapısının şematik gösterimi | 5 |
| Şekil 2.2. Yağ damlacıklarının temel yapısı | 6 |
| Şekil 2.3. Makrootofaji (Lipofaji) mekanizması | 9 |
| Şekil 3.1. ORKİ hastalarında görülen mutasyonların <i>PNPLA1</i> geni ve proteini üzerinde gösterimi | 12 |
| Şekil 4.1. p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarının PROVEAN (<i>Protein VariationEffect Analyzer</i>) skorları | 23 |
| Şekil 4.2. Hasta ve kontrol fibroblast hücrelerinde BODIPY®493/503 ile boyanan yağ damlacıklarının konfokal mikroskop görüntüleri | 24 |
| Şekil 4.3. Hasta ve kontrol fibroblast hücrelerinde hücre başına düşen ortalama yağ damlacığı sayısı grafiği | 25 |
| Şekil 4.4. Hasta ve kontrol fibroblast hücrelerindeki ortalama yağ damlacığı boyutu grafiği | 26 |
| Şekil 4.5. BODIPY®493/503-Anti PNPLA1 eş floresan boyama görüntüleri | 27 |
| Şekil 4.6. BODIPY®493/503 - Anti Atg5 eş floresan boyamasının negatif kontrol görüntüleri | 28 |
| Şekil 4.7. Kontrol fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503-Anti Atg5 eş floresan boyama görüntüleri | 29 |
| Şekil 4.8. Hasta #1 (p.Y245del) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503-AntiAtg5 eş floresan boyama görüntüleri | 29 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.9. Hasta #2 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 – Anti Atg5 eş floresan boyama görüntüleri | 30 |
| Şekil 4.10 Hasta #3 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 – Anti Atg5 eş floresan boyama görüntüleri | 30 |
| Şekil 4.11. BODIPY® 493/503-Anti LC3 eş floresan boyamasının negatif kontrol görüntüleri. | 31 |
| Şekil 4.12. Kontrol fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 - Anti LC3 eş floresan boyama görüntüleri | 32 |
| Şekil 4.13. Hasta #1 (p.Y245del) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 – Anti LC3 eş floresan boyama görüntüleri | 32 |
| Şekil 4.14. Hasta #2 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 - Anti LC3 eş floresan boyama görüntüleri | 33 |
| Şekil 4.15. Hasta #3 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 - Anti LC3 eş floresan boyama görüntüleri | 33 |
| Şekil 4.16. Kontrol ve hasta fibroblast hücrelerinde hücre başına düşen LC3 noktacık sayısı grafiği | 34 |
| Şekil 4.17. BODIPY® 493/503 – Anti LAMP1 eş floresan boyamasının negatif kontrol görüntüleri | 35 |

- Şekil 4.18. Kontrol fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 – Anti LAMP1 eş floresan boyama görüntüleri 36
- Şekil 4.19. Hasta #1 (p.Y245del) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 - Anti LAMP1 eş floresan boyama görüntüleri 36
- Şekil 4.20. Hasta #2 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 - Anti LAMP1 eş floresan boyama görüntüleri 37
- Şekil 4.21. Hasta #3 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 - Anti LAMP1 eş floresan boyama görüntüleri 37
- Şekil 4.22. Kontrol fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY® 493/503 - Lysotracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri 39
- Şekil 4.23. Hasta #1 (p.Y245del) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503- Lysotracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri 39
- Şekil 4.24. Hasta #2 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503- Lysotracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri 40
- Şekil 4.25. Hasta #3 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503- Lysotracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri 40

TABLOLAR

Sayfa

| | | |
|------------|---|----|
| Tablo 3.1. | Floresan boyama çalışmaları için planlanan deney seti | 15 |
|------------|---|----|

1. GİRİŞ

Yağ damlacıkları hücrede nötral lipitlerin tek katlı fosfolipit membran ile çevrelenerek depo edildiği hücre içi yapılardır (1). Özgün morfolojisine ek olarak, fosfolipit membran yüzeyinde lipit biyosentezi, yıkımı, hücre membran trafiği, protein yıkımı gibi çeşitli yollarda görev almasını sağlayan çeşitli proteinler tanımlanmıştır (2, 3). Yağ damlacıklarının hücredeki bu dinamik yapısının keşfedilmesi, uzun süre hücrede inert lipit depolama bölgesi olarak kabul edilen yağ damlacıklarının önemli metabolik fonksiyonlara sahip olan bir organel olarak kabul görmesini sağlamış ve araştırmaların bu organel üzerinde yoğunlaşmasına yol açmıştır. Yağ damlacıkları yüzeyinde özellikle hücrede lipit homeostazından sorumlu olan proteinler yer almaktadır (3). Hücrede lipit homeostazının sağlanabilmesi için yağ damlacıklarının biyogenezi, büyümesi ve yıkımı sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu mekanizmalarda oluşabilecek aksaklıklar ve hücresel lipit kompozisyonundaki değişiklikler yağ damlacıklarının morfolojisini etkileyerek hastalıklarda rol oynayabilmektedir (4).

Yağ damlacıkları yüzeyinde yer alan ve lipit metabolizmasında rol oynayan proteinlerden biri de Patatin-benzeri Fosfolipaz Domain İçeren Protein 1 (PNPLA1)'dir. PNPLA1 proteininin diğer PNPLA proteinleri gibi trigiliserit lipaz aktivitesine sahip olmadığı fakat fosfolipit sentezi ve düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (5). *PNPLA1* gen mutasyonlarının kalıtsal keratinizasyon bozukluklarından biri olan Otozomal Resesif Konjenital İktiyoz (ORKİ) patolojisine neden olduğu saptanmıştır (5, 6). ORKİ patolojisi, epiderminis stratum korneum tabakasındaki korneositlerin anormal farklılaşması veya lipit matriks tabakasındaki aksaklıklar sonucunda ortaya çıkmaktadır (7). PNPLA1 proteininin özellikle üst epidermis granüler tabakasında yüksek ekspresyon gösterdiği ve granüler tabakadaki keratinositlerde anormal membranöz ve veziküler lipit birikimine neden olduğu rapor edilmiştir (5). Özellikle fosfolipit metabolizmasında rolü olduğu bilinen PNPLA1 proteininde mutasyon olması durumunda, bu proteinin hücresel membran organizasyonu, membran trafiği ve endositik yolak bozukluklarına yol açarak İktiyoz patolojisinde görülen anormal lipit birikimine neden olabileceği düşünülmektedir (5).

Bu veriler ışığında, *PNPLA1* gen mutasyonlarının yağ damlacıklarının yıkım mekanizmalarından biri olan lipofaji aracılı regülasyonunu etkileyebileceği hipotezi kurulmuştur. Tez çalışmasında ORKİ hastalarında mutant *PNPLA1* proteininin yağ damlacıklarının birikimine ve lipofaji mekanizması aracılı regülasyonuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

ORKİ tanısı alan ve *PNPLA1* geninde c.514G>A veya c.733_735delTAC mutasyonlarına sahip üç hasta ve bir kontrol bireyden alınan deri biyopsi örneklerinden primer fibroblast hücre kültürleri kurulmuştur. Tez çalışmasında ilk olarak fibroblast hücre kültürlerinde hücre içi yağ damlacıkları floresan boyama yöntemi ile incelenerek yağ damlacıklarının sayı ve boyut kantitasyonu gerçekleştirilmiştir. Hasta ve kontrol bireylerde yağ damlacıkları birikimi karşılaştırılarak *PNPLA1* gen mutasyonlarının bu birikim üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, çalışma kapsamına dahil edilen hastaların *PNPLA1* geninde sahip oldukları mutasyonların proteinin hücre içi yerleşimine etkisinin araştırılması amacıyla yağ damlacıkları ile *PNPLA1* proteininin eş floresan boyaması gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında son olarak, mutant *PNPLA1* proteininin yağ damlacıklarının lipofaji mekanizması ile yıkım sürecine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Yağ damlacıklarının lipofaji mekanizmasında otofagozom yapısının oluşumunda aktif rol oynayan Atg5 (*Autophagy related 5*) ve LC3 (mikrotübül asosiye hafif zincir protein-3) proteinleri ile eş floresan boyaması yapılarak, hasta ve kontrol hücrelerde otofagozom oluşum süreci incelenmiştir. Ayrıca yağ damlacıklarının LAMP1 (lizozomal asosiye membran proteini 1) proteini ve aktif lizozom belirteci olan LysoTracker ile eş floresan boyamaları gerçekleştirilerek yağ damlacıklarının lizozom ile eş yerleşimi incelenmiştir. Yağ damlacıklarının lipofajik belirteçlerle hücre içi lokalizasyonlarının incelenmesi sonucunda *PNPLA1* mutasyonlarının lipofaji sürecindeki olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otozomal Resesif Konjenital İktiyoz

Otozomal Resesif Konjenital İktiyoz (ORKİ) (OMIM #242300) deride anormal pullanma ile karakterize olan, klinik ve genetik açıdan heterojenite gösteren kalıtsal keratinizasyon bozuklukları olarak tanımlanmaktadır (9). ORKİ hastalığı *Harlequin* İktiyoz (HI), Lamellar İktiyoz (LI) ve Konjenital İktiyoziform Eritroderma (KİE) olmak üzere üç ana klinik fenotipi kapsamaktadır (10). Hastaların %60-70'i kolloidon bebek (*colloidon baby*) fenotipi ile birlikte gelişen ağır semptomlar göstermektedir (9). Hastalığın semptomları klinik tiplerine göre değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak ısı duyarlılığı, su kaybı, elektrolit dengesizliği ve solunum güçlüğü gibi semptomların yanı sıra bazı ağır vakalarda neonatal dönemde sepsis sonucu ölümler de görülebilmektedir (11, 12). Literatür kapsamında hastalığın prevalansı 1:200.000-1:300.000 olarak belirlenmiştir (12).

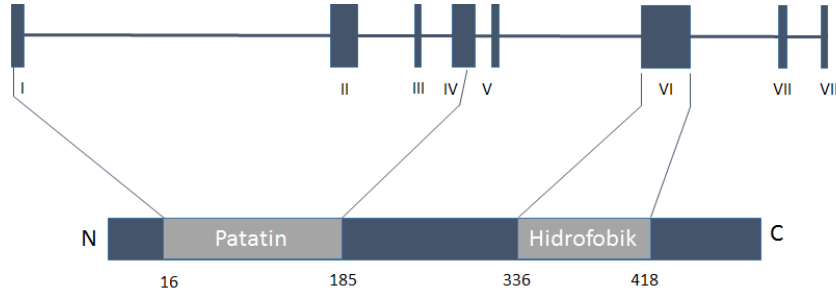
Tüm iktiyozlarda ortak olarak, anormallikler epidermal stratum korneum tabakasında görülmektedir (7). Stratum korneum keratinden zengin korneositler ile bunları çevreleyen lipitten zengin bir matriksten oluşmaktadır. Stratum korneum yapısını oluşturan keratinositlerde veya lipit metabolizmasında görülen genetik bozukluklar, lipit bariyer yapısında ve fonksiyonlarında anormalliklere yol açarak hastalık patolojisine neden olmaktadır (13). ORKİ patolojisi ile ilişkili 9 gen (*TGM1* (14), *ALOXE3* (15), *ALOX12B* (15, 16), *ABCA12* (17, 18), *NIPAL4* (19), *CYP4F22* (20), *PNPLA1* (5, 6), *LIPN* (21) ve *CERS3* (22)) tanımlanmıştır. ORKİ patolojisinin en yaygın sebebi epidermisteki kornifiye zarfın oluşumunda rol alan Trans-glutaminaz 1 enzimini kodlayan *TGM1* genindeki mutasyonlardır (23, 24). Fakat ORKİ patolojisinin epidermin keratinosit tabakasındaki aksaklıklarla sınırlı olmadığı ve *ALOXE3*, *ALOX12B*, *ABCA12*, *NIPAL4*, *CYP4F22*, *PNPLA1*, *LIPN* ve *CERS3* genlerinde tanımlanan mutasyonların lipit metabolizmasını etkileyerek epidermise özgü lipit matriks tabakasında oluşturduğu aksaklıklar sonucu hastalığın gelişimine sebep olduğu gösterilmiştir (9).

2.2. Patatin Benzeri Fosfolipaz Domaini İçeren (PNPLA) Protein Ailesi ve PNPLA1 Proteini

ORKİ patolojisi ile ilişkili olduğu gösterilen PNPLA1 proteini, Patatin Benzeri Fosfolipaz Domaini İçeren (PNPLA) Protein Ailesinin bir üyesidir. Patatin ilk olarak yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu patates yumrularında tanımlanmıştır ve özgül olmayan lipit açılma hidrolaz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (25, 26). Patatin süper ailesine ait patatin benzeri domain içeren proteinler, prokaryotlardan ökaryotlara kadar tüm yaşam formlarında dağılım göstermektedir (PFAM Protein Veri Bankası, #PF01734). Memelilerde tanımlanan PNPLA Protein Ailesinin 9 üyesi (PNPLA1-9) bulunmaktadır (27). PNPLA adiponutrin alt ailesi, PNPLA1 (patatin-benzeri fosfolipaz domain içeren protein-1), PNPLA2 (ATGL, adipoz trigliserit lipaz), PNPLA3 (adiponutrin), PNPLA4 (GS2, *gene sequence 2*) ve PNPLA5 (GS2-benzeri protein, *gene sequence 2*-benzeri protein) proteinlerini içermektedir (28). Tüm adiponutrin ailesi üyeleri, N terminallerinde ortak bir patatin domainine sahiptir. Patatin domaini içerdiği konsensüs GXSXG serin lipaz ve DGG motiflerinde bulunan serin-aspartat katalitik çifti (*catalytic dyad*) aracılığı ile enzimatik aktivite göstermektedir (29). PNPLA proteinleri, N-terminallerinde ortak patatin domaini içermekle birlikte C-terminallerinde bulunan hidrofobik motiflerde varyasyon göstermektedir (30). PNPLA1, PNPLA2, PNPLA3 ve PNPLA5 proteinlerinin C-terminallerinde bulunan korunmuş prolin ve arjinince zengin hidrofobik motifler aracılığıyla, amfipatik heliks ve hidrofobik *stretch* oluşturarak hücre içinde yağ damlacıkları yüzeyine bağlandıkları ve burada lokalize oldukları gösterilmiştir (30). PNPLA4 proteini ise C-terminalinde diğer aile üyelerinde ortak bulunan rezidüleri bulundurmadığından sitozolik yerleşim göstermektedir (30). PNPLA2-5 üyelerinin triaçilgliserol, fosfolipit ve retinol ester gibi farklı substratlar üzerinde lipit hidrolaz ve açıltransferaz aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir (27, 28).

İnsan *PNPLA1* geni (Gen ID 285848), 6p21.31 kromozomunda lokalize olup 8 ekzona sahiptir ve 532 aminoasitten oluşan PNPLA1 proteinini kodlamaktadır (31). PNPLA1 proteini, N-terminalinde patatin domaini (rezidü 16-185) ile C-terminalinde yağ damlacıkları yüzeyinde lokalize olmasını sağlayan prolince zengin hidrofobik

domaini (rezidü 326-451) içermektedir (Şekil 2.1). Patatin domaininin GTSAG katalitik serin motifi (rezidü 51-55) ile DGG motiflerinde (rezidü 172-174) bulunan S53-D172 aminoasitleri, enzim katalitik çiftini oluşturmaktadır (31).



Şekil 2.1. *PNPLA1* geninin ve primer protein yapısının şematik gösterimi.

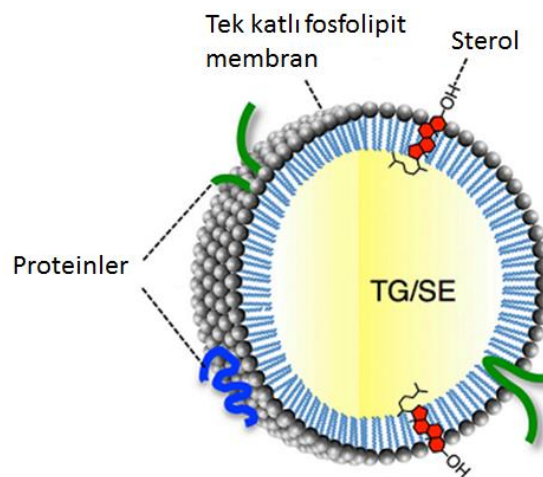
Diğer PNPLA ailesi üyeleri gibi patatin domaini taşıdığından, varsayımsal olarak lipit hidrolaz aktivitesinin olduğu kabul edilse de (Swiss-Prot Veri Tabanı, #Q8N8W4), literatürde *PNPLA1* proteininin fonksiyonuna ilişkin yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Grall ve arkadaşlarının yaptıkları *in vitro* çalışmada, *PNPLA1* proteininin trigliserit lipaz aktivitesinin olmadığı, fakat açıl-coA bağımlı ya da bağımsız açıltransferaz aktivitesine sahip olduğu ve özellikle fosfatidik asit ve fosfatidil etanolamin oranlarını etkileyerek hücrede fosfolipit sentezi ve düzenlenmesinde rol oynayabileceği belirtilmiştir (5).

PNPLA proteinlerinin hücrede yağ damlacıklarının homeostazının sağlanmasında, enerji metabolizmasının düzenlenmesinde ve sinyal iletiminde kritik rol oynadığı bilinmektedir (27, 32). Bu proteinlerin özellikle lipit metabolizması, enerji homeostazi, inflamasyon ve nöronal integrite ile ilişkili patolojilerde doğrudan etkisinin olduğu gösterilmiştir (27). Yapılan çalışmalarda, *PNPLA1* geninde saptanan mutasyonların insan ve köpeklerde ORKİ patolojisine neden olduğu tespit edilmiştir (5, 6). ORKİ patolojisinde, *PNPLA1* geninin epidermis granüler tabakasındaki keratinositlerde yüksek ekspresyon göstermesi, epidermal keratinizasyon farklılaşması ile lipit bariyer organizasyonu ve metabolizmasında anahtar rolü olduğunu göstermiştir (5).

2.3. Yağ Damlacıkları ve Hücredeki Regülasyonu

Yağ damlacıkları hücre içinde nötral yağların depolandığı özelleşmiş sitoplazmik yapılardır (33). Bu yapılar uzun yıllar hücrede *inert* lipid depolama bölgeleri olarak kabul edilmiş olsa da, yüzeyinde yer alan proteinlerin keşfedilmesi ile birlikte önemli metabolik fonksiyonlara sahip olan bir organel olarak kabul görmeye başlamıştır (34). Yağ damlacıkları, yüzeyinde lokalize olan proteinler yardımıyla endoplazmik retikulum (ER), mitokondri, peroksisom, plazma membranı gibi diğer kompartmanlarla etkileşim içindedir (35, 36). Bu interaksiyonlar aracılığı ile hücrede lipidlerin sentezlenmesi ve yıkımını düzenleyerek enerji dengesinin sağlanmasında merkezi rol oynamaktadır (37).

Nötral yağların depolandığı kor kısmı, bu yapıyı çevreleyen tek katlı fosfolipit tabakası ve yüzeyinde yer alan proteinler yağ damlacıklarının özgün morfolojisini oluşturmaktadır (Şekil 2.2) (38). Hidrofobik kor kısmında farklı hücrelerde değişken oranlarda olmak üzere triaçilgliserol (TG) ve sterol esterler (SE) depolanmaktadır (39). Hücredeki diğer membran yapılarından farklı olarak, yağ damlacıklarının hidrofobik kor kısmı tek katlı fosfolipit yapısından oluşan membran ile çevrelenerek sitozolik çevreden ayrılmaktadır.



Şekil 2.2. Yağ damlacıklarının temel yapısı (38) (TG:Trigliserit, SE: Sterol ester).

Fosfolipit membran yapısı ağırlıklı olarak fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolaminden oluşmakta ve bununla birlikte farklı oranlarda fosfatidik asit, fosfatidilinositol, lizo-fosfatidilkolin, lizo-fosfatidiletanolamin ve kolesterol içermektedir (40, 41). Membranın yapısını oluşturan fosfolipit oranları ve kompozisyonlarındaki değişimlerin, hücrede yağ damlacıklarının büyüme ve proliferasyonunu etkileyerek regülasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (42, 43). Yağ damlacıklarının yapısında ayrıca fosfolipit membranı yüzeyinde konumlanan 200'den fazla protein tanımlanmıştır (44-45). Proteomiks analiz çalışmaları ile yüzeyde yer alan bu proteinlerin ağırlıklı olarak yapısal proteinler ile lipit metabolizması, membran trafiği ve sinyal iletimi yollarında görev alan proteinler olduğu saptanmıştır (2). Bunlara ek olarak, membran yüzeyinde çeşitli hücre iskeleti proteinleri, ER ve mitokondri ilişkili proteinler ve şaperonlar da tanımlanmıştır (2, 44).

Hücrede lipit ve enerji homeostazının sağlanabilmesi için yağ damlacıklarının biyogenezi, büyümesi ve yıkımı kontrol edilmektedir. Yağ damlacıkları biyogenezi, trigliserit ve sterol esterlerin, açıl-coA açıl transferaz (ACAT) ve digliserol açıltransferaz (DGAT) nötral lipit sentez enzimleri aracılığıyla çift katlı ER fosfolipit membranı arasında sentezlenip depolanmasıyla gerçekleşmektedir (46, 47). ER fosfolipit membranı arasında oluşan nötral lipitler, ER membranından tomurcuklanma mekanizmaları ile ayrılarak sitozolik yağ damlacıklarını oluşturmaktadır (3, 48). Yağ damlacıklarının büyümesi ise, yağ damlacıklarının füzyonu, yağ damlacıkları arasında nötral lipit transferi veya in situ nötral lipit sentez mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (38, 42). Özellikle yağ damlacıklarının büyümesi sırasında yüzey alanı/hacim oranının korunabilmesi için nötral lipit sentezi ile fosfolipit sentezinin eşgüdümlü olması gerekmektedir. Yağ damlacıkları yüzeyindeki fosfolipit sentezinde oluşabilecek aksaklıklar ve fosfolipit kompozisyonundaki değişiklikler yağ damlacıklarının morfolojisini etkileyerek çeşitli hastalıkların gelişiminde rol oynayabilmektedir (49). Buna ek olarak, fosfolipit sentez enzimlerinin hücredeki yağ damlacıklarının sayısı ve boyutunda belirleyici rol oynadıkları belirtilmiştir (50). Yağ damlacıklarının regülasyonundan sorumlu bir diğer faktör ise yıkım mekanizmalarıdır. Yağ damlacıklarının yıkımı lipoliz ve otofaji olmak üzere iki

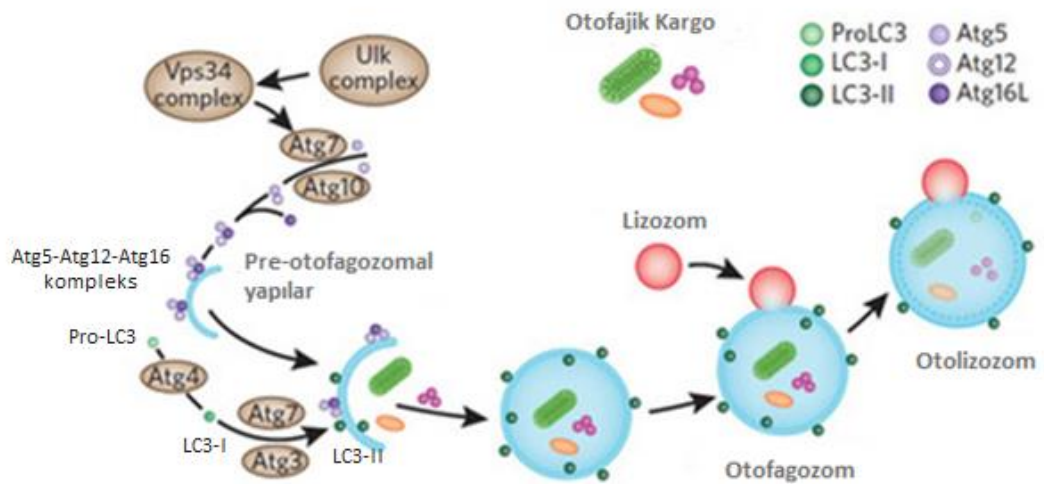
mekanizma ile gerçekleştirilmektedir (38). Yağ damlacıkları kor kısmında depolanan nötral lipitlerin lipoliz mekanizması ile yıkımı, fosfolipit membran yüzeyinde lokalize olan adipoz trigliserit lipaz (ATGL), hormon duyarlı lipaz (HSL), monogliserit lipazlar (MGL) ve nötral kolesterol esterazlar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir (48, 51). Ayrıca, otofaji mekanizmasının da hücrede yağ damlacıkları döngüsünde rolü olduğu ve yağ damlacıklarının "lipofaji" adı verilen bu mekanizma ile yıkıldığı belirtilmiştir (52). Fakat literatürde lipofaji mekanizmasının nasıl düzenlendiği ve bu yıkım mekanizmalarının hücrede yağ damlacıkları döngüsüne hangi oranda katkı sağladıkları henüz net olarak bilinmemektedir (53, 54).

2.4. Lipofaji

Lipofaji, hücrede yağ damlacıklarının seçici olarak yıkımından sorumlu olan makrootofajik bir yıkım mekanizmasıdır (54). Makrootofaji hücre içindeki sitoplazma parçaları, proteinler ve organellerin, çift zarlı, kesecik benzeri yapılar içinde hapsedilmek suretiyle lizozomlara taşınması ve burada sindirilmesidir. Makrootofaji sürecinde oluşan çift zarlı keseciklere "otofajik vezikül" ya da "otofagozom", lizozomla birleşme sonrası ortaya çıkan yapılara ise "otolizozom" adı verilmektedir (55). Bu mekanizma normal fizyolojik koşullarda hücrede bazal seviyede aktivite göstererek, yıkılması gereken intraselüler yapıların geri dönüşümünden ve hücrel enerji dengesinin sağlanmasından sorumludur (55). Çeşitli stres faktörlerinin varlığında ve hücrenin yaşamı için gereken yapıtaşlarını bulunduğu ortamdan elde edemediği koşullarda ise, makrootofaji bazal seviyesinin üzerinde aktive olarak (*upregulation*) hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bir adaptasyon mekanizması olarak görev yapmaktadır (56).

Hücrede otofaji mekanizmasının regülasyonu iki temel yolak ile gerçekleştirilmektedir (57). mTOR (memeli rapamisin hedefi) bağımlı olmayan yolakta, hücre içi inositol monofosfatazların inhibisyonu sonucu azalan inositol and inositol 1,4,5-trisfosfat (IP₃) seviyeleri otofajinin indüklenmesine sebep olmaktadır (58). Otofajik regülasyondan sorumlu bir diğer yolak ise mTOR bağımlı yolaaktır.

Normal fizyolojik koşullar altında, mTORC1 serin/treonin kinaz kompleksi otofajinin baskılanmasından sorumludur (59). Besin yetersizliği durumunda ise mTORC1 kompleksinin inhibisyonu hücre içi otofajik mekanizmaların indüklenmesini sağlamaktadır (59). Otofaji mekanizmasının indüklenmesini, otofaji ilişkili Atg (*Autophagy related*) proteinleri aracılığı ile çift zarlı vezikül oluşumu takip etmektedir. Bu kompleks vezikül sisteminin oluşumunda iki farklı ubiquitin benzeri konjugasyon sistemi rol oynamaktadır (60). Bu sistemlerden ilk olarak, Atg5-Atg12-Atg16 kompleksi oluşturularak otofagozom membran yapısına katılmaktadır (58). Otofagozom oluşumuna katkıda bulunan diğer konjugasyon sisteminde ise, mikrotübül asosiye hafif zincir protein-3 (LC3) proteini fosfatidiletanolamin ile konjuge olarak membran yapısına entegre olmaktadır (58). Sonraki adımda, otofaji mekanizması ile yıkılacak olan sitozolik parçacıklar veya organeller otofajik vezikül içerisine alınarak otofagozom olgunlaşması tamamlanmaktadır (61). Son aşamada, çift zarlı otofagozom lizozom ile füzyon gerçekleştirerek otolizozom yapısını oluşturmakta ve yıkılması planlanan yapıların lizozomal yıkımı gerçekleşmektedir (61). Makrotofaji mekanizmasının basamakları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Makrotofaji (Lipofaji) mekanizması (58).

Otofaji mekanizması ilk olarak Singh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma kapsamında lipit metabolizması ile ilişkilendirilmiştir (52). Yapılan bu çalışmada, otofajinin farmakolojik veya genetik inhibisyonunun, hücresele trigliserit miktarında ve yağ damlacıklarının hacim ve sayısında artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, açlık durumunda yağ damlacıklarının seçici olarak otofaji mekanizması ile yıkıldığı gösterilmiş ve bu mekanizma "lipofaji" olarak adlandırılmıştır (52). Lipofaji mekanizmasının hücredeki en temel fizyolojik rolü yağ damlacıklarının regülasyonunun ve enerji dengesinin sağlanmasıdır (54). Bu fonksiyonları ile ilişkili olarak, lipofaji yollarında meydana gelebilecek aksaklıkların hepatik steatoz, obezite ve metabolik sendrom gibi lipit metabolizması ile ilişkili pek çok hastalıkla bağlantılı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (54,62,63).

2.5. Amaç

Literatürde tanımlanan *PNPLA1* gen mutasyonları epidermal stratum korneum tabakasında lipit bariyer organizasyonunda aksaklıklara neden olarak ORKİ patolojisi ile ilişkilendirilmiştir (5, 6). Hastalık patolojisi ile ilişkili olarak, epidermin stratum korneum tabakasında lipit metabolizmasında görülen aksaklıklardan dolayı yağ damlacıklarının anormal birikimi görülebilmektedir (64, 65). Hücrede yağ damlacıkları yüzeyinde lokalize olduğu bilinen *PNPLA1* proteininin açıltransferaz aktivitesi ile hücrede fosfolipit sentez ve düzenlenmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (5). Membranın yapısını oluşturan fosfolipit oranları ve kompozisyonlarındaki değişimlerin, hücrede yağ damlacıklarının büyüme ve metabolizmasını etkileyerek kendi regülasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (50). Ayrıca, fosfolipit metabolizmasındaki değişimler hücre içi membran trafiğini de etkileyebilmektedir (66). Bu bilgiler doğrultusunda, *PNPLA1* proteinindeki mutasyona bağlı değişikliklerin, yağ damlacıklarının lipofaji aracılı regülasyonunu etkileyebileceği hipotezi kurulmuştur.

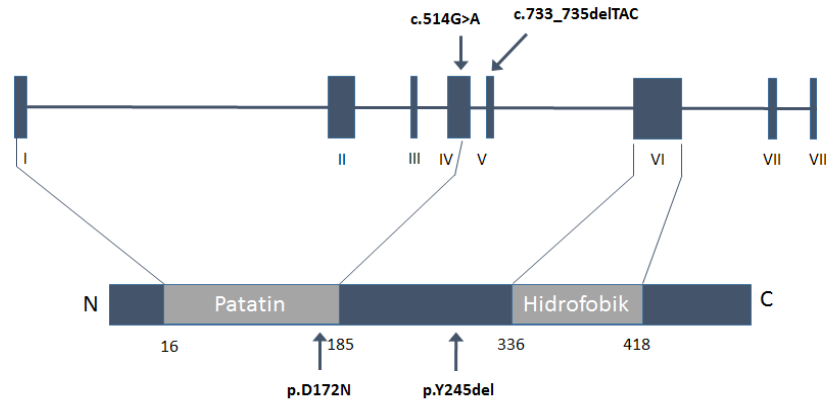
Tez çalışması kapsamında, klinik ve histopatolojik değerlendirmeler sonucu ORKİ tanısı almış ve *PNPLA1* gen mutasyonu taşıdığı saptanmış üç hasta ve bir kontrol bireyden alınan dokulardan elde edilecek fibroblast hücre kültürlerinde;

- hücre içi yağ damlacıkları birikiminin floresan boyama yöntemi kullanılarak sayı ve boyut bakımından karşılaştırılması,
- *PNPLA1* gen mutasyonlarının *PNPLA1* proteininin yağ damlacıkları yüzeyindeki yerleşimine etkisinin floresan boyama tekniği ile araştırılması,
- mutant *PNPLA1* proteininin yağ damlacıklarının lipofaji mekanizması ile yıkımı üzerinde etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, yağ damlacıklarının belirlenen otofajik belirteçler ile (Atg5, LC3, LAMP1, LysoTracker®) eş yerleşiminin floresan boyama tekniği ile araştırılması planlanmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışmada İncelenen Bireyler

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında Hacettepe Üniversitesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı'nda yapılan klinik değerlendirmeler doğrultusunda, ORKİ tanısı alan ve *PNPLA1* geninde mutasyon (c.514G>A ve c. 733_735delTAC)) olduğu saptanan üç hasta birey ile bir kontrol bireyden alınan dokulardan elde edilen primer fibroblast hücre kültürleri ile çalışıldı. Hasta #1'de saptanan c.733_735delTAC mutasyonu 5. ekzonda bulunmaktadır. Primer protein yapısında 245. pozisyondaki Tirozin aminoasitinin delesyonuna neden olmaktadır. Hasta #2 ve Hasta#3'te saptanan c.514G>A mutasyonu ise *PNPLA1* geninin 4. ekzonunda bulunmaktadır. Protein düzeyinde ise patatin domaininde katalitik çifti (*catalytic dyad*) oluşturan aminoasitlerden 172. pozisyondaki Aspartatın Asparjine dönüşmesine neden olmaktadır. Hasta bireylerde tespit edilen mutasyonlar Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. ORKİ hastalarında görülen mutasyonların *PNPLA1* geni ve proteini üzerinde gösterimi.

Yapılan çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 02.04.2014 tarih ve GO 14/183-13 karar numaralı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK 1).

3.2. Gereçler

3.2.1. Hücre Kültürü

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biochrom)

Fetal Dana Serumu (FBS) (Biochrom)

L-Glutamin (Biochrom)

Penisilin/Streptomisin (Biochrom)

Amfoterisin B (Biochrom)

Tripsin/EDTA Solüsyonu (Biochrom)

1X Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS), pH:7,4 (Sigma)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)

3.2.2. Hücelere Oleik Asit Uygulaması

1 M NaOH (Sigma)

Oleik asit (Sigma)

1X Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS) (Sigma)

Yağ Asidi İçermeyen Dana Serum Albümini (BSA) (Sigma)

dH₂O

3.2.3. Floresan Boyama

1X Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS) , pH:7,4 (Sigma)

%4 Paraformaldehit / 1X PBS (a/h), pH:7,2-7,4 (Sigma)

%3 Dana Serum Albümini (BSA) / 1X PBS (a/h) (Sigma)

%0,1 Saponin / 1X PBS (a/h) (Sigma)

Primer Antikorlar:

- Tavşan *Polyclonal* Anti-PNPLA1 (Prestige Antibodies)
- Tavşan *Polyclonal* Anti-LC3 (Sigma)
- Tavşan *Polyclonal* Anti-Atg5 (Sigma)
- Fare Monoclonal Anti-LAMP1 (Abcam)

Sekonder Antikorlar:

- Keçi Anti Tavşan AF568 (Molecular Probes)
- Keçi Anti Fare AF568 (Molecular Probes)

BODIPY[®]493/503 (*4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene*) (Sigma)

Lysotracker[®] Red-DND-99 (Sigma)

DAPI (4', 6 -diamidino-2-phenylindole) (Sigma)

Prolong Antifade Kaplama Solüsyonu (Invitrogen)

150 mM NaCl (Sigma)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)

%100 Etanol (Riedel-de Haen)

3.3. Deney Planı

Tez çalışması kapsamında, belirlenen eş floresan boyama setlerinin oleik asit uygulanmamış ve 12 saat 400 μm oleik asit uygulanmış koşul olmak üzere iki deney koşulu için gerçekleştirilmesi planlandı. Bunun sebebi, fizyolojik şartlar altında fibroblast hücrelerinde çalışılması amaçlanan yağ damlacıklarının mikroskopik olarak görüntülenebilir boyutlarda olmamasıdır. İnsan vücudunda en yaygın görülen yağ asitlerinden biri olan oleik asitin 12 saat 400 μm konsantrasyonda fibroblast kültürlerine uygulanmasının, hücrelerde yağ damlacıkları birikimini indüklemesi sonucu yağ damlacıklarının görüntülenebilir hale getirilmesi amaçlandı. İkili floresan boyama çalışmaları için planlanan deney seti ve kullanılan hücre pasaj numaraları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Floresan boyama çalışmaları için planlanan deney seti.

| Deney Koşulu | Eş Floresan Boyamalar |
|---|---|
| Oleik Asit Uygulanmamış | BODIPY [®] 493/503-PNPLA1 (Pasaj # 2,3,4) BODIPY [®] 493/503-LC3 (Pasaj # 3,4,5) BODIPY [®] 493/503-Atg5 (Pasaj # 3,4,5) BODIPY [®] 493/503-LAMP1 (Pasaj # 3,4,5) BODIPY [®] 493/503-LysoTracker (Pasaj # 5,6,7) |
| 12 saat 400 μm Oleik Asit Uygulanmış | BODIPY [®] 493/503-LC3 (Pasaj # 3,4,5) BODIPY [®] 493/503-Atg5 (Pasaj # 3,4,5) BODIPY [®] 493/503-LAMP1 (Pasaj # 3,4,5) BODIPY [®] 493/503-LysoTracker (Pasaj # 5,6,7) |

3.4. Yöntemler

3.4.1. Hücre Kültürü

3.4.1.1. Primer Fibroblast Kültür Kurulması

- Hacettepe Üniversitesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı'nda 'punch' biyopsi tekniği ile hastalardan alınan dokular %2,5 Penisilin/Streptomisin ve %2,5 Amfoterisin B içeren DMEM besiyeri içerisinde buz üzerinde laboratuvara ulaştırıldı.
- Transfer besiyeri uzaklaştırılarak doku 1 kez %5 Penisilin/Streptomisin ve %5 Amfoterisin B içeren 1X PBS ile ve 2 kez antibiyotik/antimikotik içermeyen 1X PBS ile yıkandı.
- Petri kabına alınan doku steril bistüri aracılığıyla küçük parçalara ayrılarak parçaların petri kabına yapışması sağlandı.
- Dokuların üzerine %10 Fetal Dana Serum, %1 Penisilin/Streptomisin, %1 Amfoterisin B ve %1 L-Glutamin içeren DMEM besiyeri eklenerek 37 °C ve %5 CO₂ etüve kaldırıldı.
- 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek hücreler çoğaltıldı.

3.4.1.2. Primer Fibroblast Hücrelerin Pasajlanması

- Hücreler %90-100 yoğunluğa ulaştığında kültür kabından besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS ile yıkandı.
- 5 dk. 37 °C'de Tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek hücreler kaldırıldı.
- Tripsin inaktivasyonu için 2X hacimde fibroblast proliferasyon besiyeri eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı ve 2000 rpm'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Pellet üzerine proliferasyon besiyeri eklendi ve hücre sayımı yapıldı.
- Thoma lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra kültür kaplarına ekildi.

3.4.1.3. Oleik Asit Uygulaması

Sodyum-Oleat Kompleksinin Hazırlanması

- 50 ml falkon tüp içerisine 15,7 ml dH₂O ve 200 µl 1M NaOH eklenerek su banyosunda 70 °C'ye ısıtıldı.
- Isıtılan solüsyon içerisine 100 µl oleik asit eklendi. Hazırlanan solüsyon 30 dk. 70 °C su banyosunda ara ara karıştırılarak inkübe edildi.
- Solüsyon içerisine 50 µl 1M NaOH eklenip karıştırılarak 5 dk. 70 °C su banyosunda tekrar inkübasyona bırakıldı. Bu aşama falkon tüp içerisinde oluşan miseller görünmez hale gelinceye kadar (yaklaşık 6 kez) tekrarlandı.

Yağ Asidi-Albümin Kompleksinin Hazırlanması

- 50 ml falkon tüp içerisine 11,6 ml yağ asidi içermeyen %5 BSA / dH₂O (a/h) solüsyonu eklenip 37 °C'ye ısıtıldı.
- Üzerine 3,5 ml hazırlanan sodyum-oleat solüsyonu damla damla eklenerek karıştırıldı.

Hazırlanan yağ asidi-albümin kompleksi 160 ml fibroblast proliferasyon besiyerine eklenerek 400 µM konsantrasyonda oleik asit içeren besiyeri hazırlandı. Steril koşullar altında laminar flow kabininde 0,22 µm filtreden geçirilerek 4 °C'de saklandı.

3.4.2. Floresan Boyama Yöntemleri

3.4.2.1. BODIPY®493/503 Floresan Boyama

BODIPY®493/503 apolar ve hidrofobik yapıda olup, hücre membranlarından serbestçe geçerek nötr yağlara bağlanan özel bir florofordur. Hücrede yalnızca nötr yağların özgül olarak floresan işaretlenmesini sağlayarak yağ damlacıkları ile ilişkili çalışmalarda kullanılmaktadır. BODIPY®493/503 floresan boyama protokolü aşağıda belirtilmektedir.

- 6 kuyucuklu hücre kültürü petripleri içerisine yerleştirilen 24*24 mm ebatında 0,17 mm. kalınlığa sahip steril lameller üzerinde çoğaltılan fibroblast hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştığında ($5 \cdot 10^4$ hücre/lamel) kuyucuklardan besiyeri çekildi.
- Hücreler 4 °C'de 30 dk. %4 PFA/1X PBS (a/h) pH:7,2-7,4 solüsyonu içerisinde bekletilerek fikse edildi.
- Fiksasyon sonrası PFA uzaklaştırıldı ve hücreler 3 kez 5 dk. 1X PBS pH:7,4 ile yıkandı.
- BODIPY®493/503 1mg/ml olacak şekilde etanol içinde çözülerek stok solüsyon elde edildi.
- 10 ml 150 mM NaCl içerisine 10 µl 1mg/ml BODIPY®493/503 stok solüsyonu eklenerek BODIPY®493/503 boyama solüsyonu elde edildi.
- Hücreler üzerlerini kapatacak şekilde BODIPY®493/503 boyama solüsyonu ile muamele edilerek 10 dk. oda sıcaklığında ortam ışığından korunarak inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 2 kez 5 dk. 1X PBS ile yıkandı.
- Çekirdek boyaması için 1X PBS ile 1:6000 oranında seyreltilmiş DAPI çözeltisi kesitler üzerinde 1 dk. oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- DAPI uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS ile 2 kez 5 dk. yıkandı.
- Lam üzerine Prolong Gold Antifade çözeltisi damlatılarak lamel kapatıldı ve preparatlar ışık görmeyecek şekilde 4 °C'de saklandı.

Negatif kontrol olarak hücreler yalnızca 150 mM NaCl ile 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

3.4.2.2. Lyotracker® Red-DND-99 Floresan Boyama

Lyotracker® Red-DND-99 hücrede asidik organellerin özgül olarak işaretlenmesini sağlayan bir florofordur. Yapısında bulunan zayıf baz grubu nötral pH değerlerinde yarı protonlanmış haldedir ve hücre membranlarından kolayca geçebilmektedir. Asidik kompartmanlara ulaştığında ise, yapısındaki zayıf baz tamamen protonlanarak floroforun bu kompartmanlarda hapsolmesini sağlayarak bu bölgelerin özgül olarak floresan işaretlenmesini sağlamaktadır. Lyotracker® Red-DND-99 floresan boyama protokolü aşağıda belirtilmektedir.

- 6 kuyucuklu hücre kültürü petripleri içerisine yerleştirilen 24*24 mm ebatında 0,17 mm. kalınlığa sahip steril lameller üzerinde çoğaltılan fibroblast hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştığında ($5 \cdot 10^4$ hücre/lamel) kuyucuklardan besiyeri çekildi.
- Hücreler 2 kez 5 dk. 1X PBS pH:7,4 ile yıkandı.
- Lyotracker® Red-DND-99 DMSO içinde çözülerek 1 mM stok solüsyonu hazırlandı.
- 1X PBS içerisine 100 nM konsantrasyonda Lyotracker® Red-DND-99 boyama solüsyonu hazırlandı.
- Hücreler üzerlerini kapatacak şekilde Lyotracker boyama solüsyonu ile muamele edilerek 1 saat oda sıcaklığında ortam ışığından korunarak inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler 2 kez 5 dk. 1X PBS ile yıkandı.
- Çekirdek boyaması için 1X PBS ile 1:6000 oranında seyreltilmiş DAPI çözeltisi kesitler üzerinde 1 dk. oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.

- DAPI uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS ile 2 kez 5 dk. yıkandı.
- Lam üzerine Prolong Gold Antifade çözeltisi damlatılarak lamel kapatıldı ve preparatlar ışık görmeyecek şekilde 4 °C'de saklandı.

3.4.2.3. İmmü floresan Boyama

- 6 kuyucuklu hücre kültürü petripleri içerisine yerleştirilen 24*24 mm ebatında 0,17 mm. kalınlığa sahip steril lameller üzerinde çoğaltılan fibroblast hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştığında ($5 \cdot 10^4$ hücre/lamel) kuyucuklardan besiyeri çekildi.
- Hücreler 2 kez 5 dk. 1X PBS pH:7,4 ile yıkandı.
- Hücreler 4 °C'de 30 dk. %4 PFA/1X PBS (a/h) pH:7,2-7,4 solüsyonu içerisinde bekletilerek fikse edildi.
- Fiksasyon sonrası PFA uzaklaştırıldı ve hücreler 3 kez 5 dk. 1X PBS pH:7,4 ile yıkandı.
- 1X PBS içerisinde %3 BSA (a/h) ve %0,1 Saponin (a/h) içeren bloklama çözeltisi hazırlandı ve hücreler 45 dk. 4 °C'de bloklama solüsyonu içerisinde inkübe edildi.
- Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve üzerlerine primer antikor sulandırım çözeltisi (%3 BSA/1X PBS) içerisinde 1:100 seyreltme oranında hazırlanan primer antikor eklenen hücreler 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Primer antikor uzaklaştırılıp lameller 3 kez 5 dk. 1X PBS ile yıkandı.
- Primer antikor uygulamasından sonra hücreler sekonder antikor sulandırım çözeltisi (%3 BSA/1X PBS) içerisinde 1:500 seyreltme oranında hazırlanan sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Sekonder antikor uzaklaştırılarak 3 kez 5 dk. 1X PBS ile hücreler yıkandı. Bu ve bundan sonraki aşamalar preparatların ışık görmeyeceği şekilde gerçekleştirildi.

- Çekirdek boyaması için 1X PBS ile 1:6000 oranında seyreltilmiş DAPI çözeltisi kesitler üzerinde 1 dk. oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- DAPI uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS ile 2 kez 5 dk. yıkandı.
- Lam üzerine Prolong Gold Antifade çözeltisi damlatılarak lamel kapatıldı ve preparatlar ışık görmeyecek şekilde 4 °C'de saklandı.

Negatif kontrol olarak hücreler primer antikor yerine yalnızca antikor sulandırım çözeltisi (%3 BSA/1X PBS) içerisinde inkübe edilip ardından sekonder antikor ile inkübe edildi.

Eş floresan boyamalar için, immünfloresan boyamada sekonder antikorun 1X PBS ile uzaklaştırılması sonrası BODIPY® 493/503 veya Lyotracker® Red-DND-99 floresan boyama uygulaması protokollerde belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

3.4.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Floresan boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlar Zeiss LSM-710 Konfokal Mikroskop kullanılarak görüntülendi. 1,4 nümerik açıklığa sahip *plan apochromat* 63X yağ immersiyonlu DIC objektif kullanıldı. Elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri Carl Zeiss ZEN 2012 Black SP1 8.1 yazılımı kullanılarak kaydedilip analiz edildi.

Yağ damlacıklarının ve LC3 noktacıklarının kantitatif analizi için ImageJ programında (<http://imagej.nih.gov/ij/>) bulunan 'Parçacık Analizi' fonksiyonu kullanıldı. Örneklem seçimi birbirinden bağımsız 3 set olarak hazırlanan preparatlardan rastgele seçilerek gerçekleştirildi. Yağ damlacıkları kantitasyonu her bir koşul ve hücre tipi için rastgele seçilen 10'ar adet hücrenin analizi sonucu elde edildi. LC3 noktacıklarının kantitasyonu için ise örneklem sayısı n=5-7 olarak belirlenerek analiz gerçekleştirildi.

Kantitatif verilerin değerlendirilmesinde istatistiksel analiz ve grafik çizimleri GraphPad Prism 6 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Veri setlerinin normalite analizi için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların belirlenebilmesi için iki yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. İki yönlü ANOVA testini takiben veri setindeki alt grupların birbirleriyle karşılıklı ilişkilerinin incelenebilmesi için *Tukey's Çoklu Karşılaştırma (post hoc)* analizi gerçekleştirildi. Grafiklerde gösterilen tüm sayısal sonuçlar ortalama ve ortalamanın standart hatası (OSH) olarak gösterilmiştir.

4. BULGULAR

Tez çalışması kapsamına alınan hastaların sahip oldukları p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarının proteinin biyolojik fonksiyonu üzerindeki tahmini etkilerini gösteren PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*) skorları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Her iki mutasyonun da ORKİ patolojisi ile ilişkili PNPLA1 proteininin fonksiyonuna zararlı (*‘deleterious’*) etkisinin olduğu tahmin edilmektedir. Mutasyonlar sonucunda hastalardaki PNPLA1 proteininin fonksiyon kaybına uğradığı veya işlevsiz olduğu düşünülmektedir.

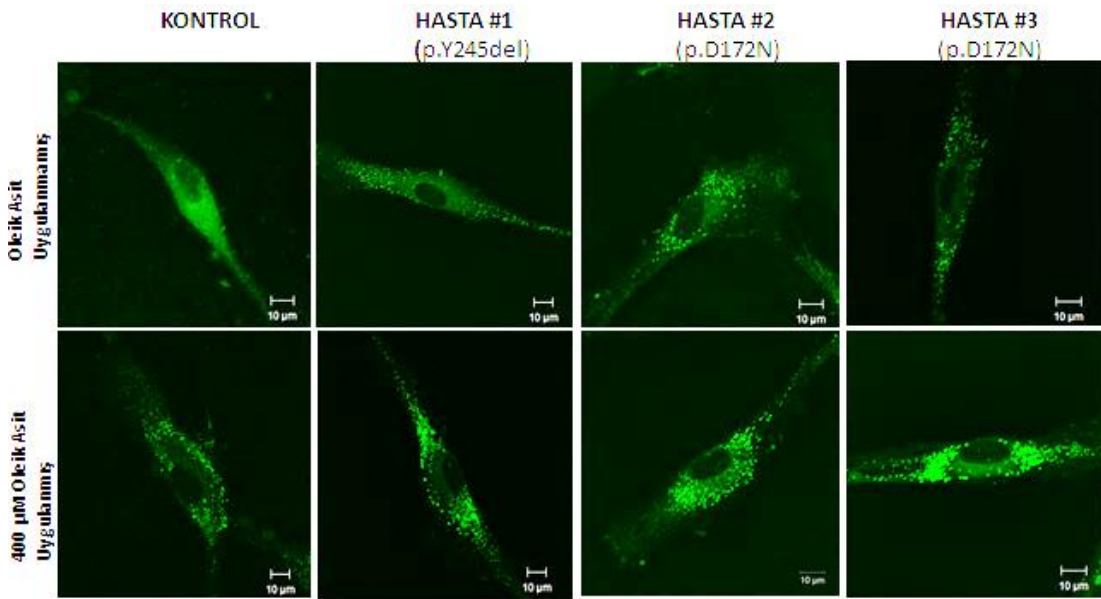
| Variant | PROVEAN score | Prediction (cutoff= -2.5) |
|---------|---------------|---------------------------|
| Y245del | -10.006 | Deleterious |

| Variant | PROVEAN score | Prediction (cutoff= -2.5) |
|---------|---------------|---------------------------|
| D172N | -4.995 | Deleterious |

ekil 4.1. p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarının PROVEAN (*Protein Variation Effect Analyzer*) skorları.

4.1. Hasta/Kontrol Fibroblast Hücrelerinde Yağ Damlacıkları Birikiminin Karşılaştırılması

Hasta ve kontrol bireylerin fibroblast hücre kültürlerinde, yağ damlacıkları birikimi oleik asit uygulanmamış ve 12 saat 400 μ M oleik asit uygulanmış koşullar için BODIPY® 493/503 floresan boyaması ile görüntülendi. Elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



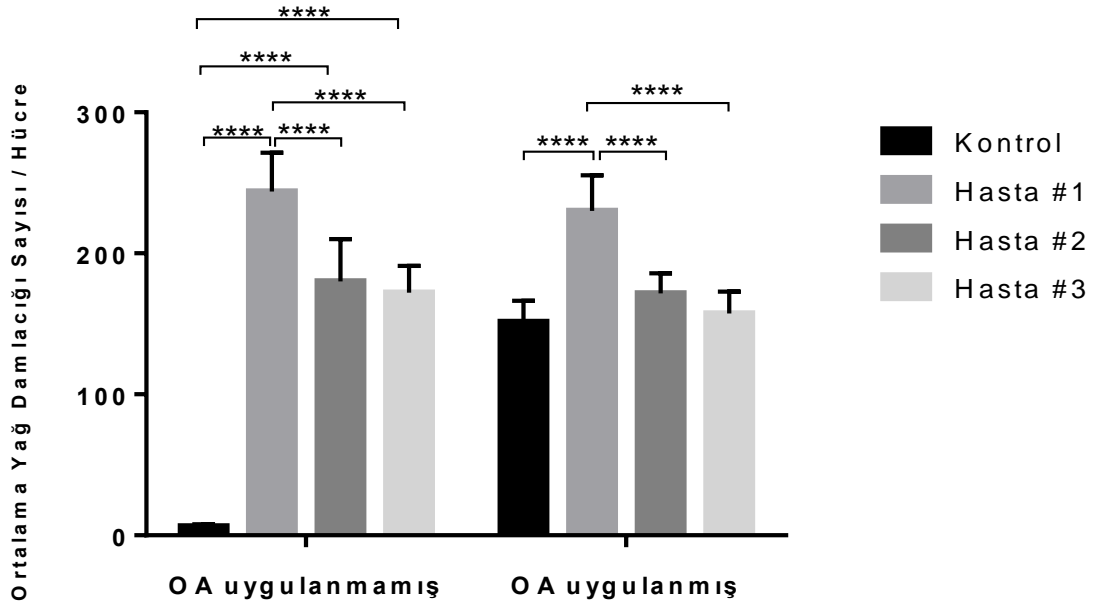
Şekil 4.2. Hasta ve kontrol fibroblast hücrelerinde BODIPY® 493/503 ile boyanan yağ damlacıklarının konfokal mikroskop görüntüleri.

Oleik asit uygulaması yapılmadığı durumda, kontrol fibroblast hücrelerinde mikroskopik düzeyde yağ damlacıkları birikimi gözlemlenmedi. Hasta bireylerde ise aynı koşulda belirgin şekilde yağ damlacıkları birikimi tespit edildi.

Hücelere 12 saat 400 μ M oleik asit uygulaması yapıldığı durumda ise hem kontrol hem de hasta fibroblast hücrelerinde belirgin yağ damlacıkları birikimi gözlemlendi. Hasta fibroblast hücrelerinde oleik asit yüklemesi yapılmış koşulda, kontrol

hücrelerine göre yağ damlacıklarının boyutlarının daha belirgin şekilde arttığı ve özellikle nükleus çevresinde lokalize oldukları gözlemlendi.

Elde edilen konfokal mikroskop görüntüleri, ImageJ ileri görüntü analiz programında bulunan 'Parçacık Analizi' fonksiyonu kullanılarak analiz edildi. Birbirinden bağımsız 3 set olarak boyanan preparatlardan her bir koşul ve hücre tipi için analizi yapılmak üzere 10'ar adet hücre seçilerek yağ damlacıklarının sayı ve boyut kantifikasyonu gerçekleştirildi. Hücre başına düşen ortalama yağ damlacığı sayısını gösteren grafik Şekil 4.3'te verilmiştir.

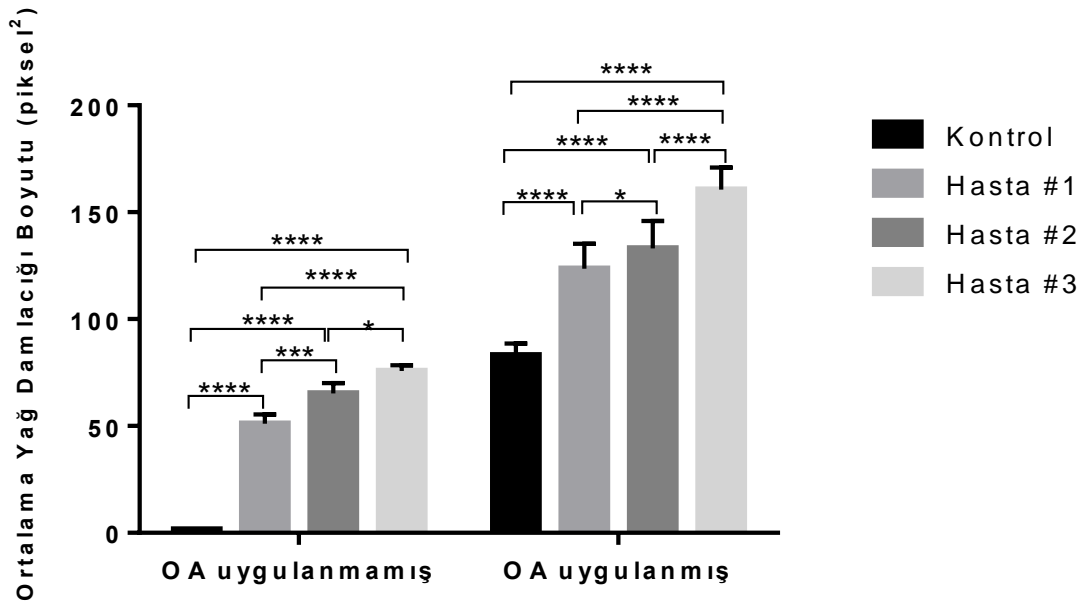


Şekil 4.3. Hasta ve kontrol fibroblast hücrelerinde hücre başına düşen ortalama yağ damlacığı sayısı grafiği (* $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, $n=10$, Hata çubukları: Ortalamanın standart hatası (OSH)).

Hücre başına düşen ortalama yağ damlacığı sayısını gösteren grafiğe göre, hem oleik asit uygulanmamış koşulda hem de oleik asit yüklemesi yapılmış koşulda, hasta fibroblast hücrelerinde kontrole kıyasla hücre başına düşen ortalama yağ damlacığı sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($P \leq 0.0001$). Ayrıca

p.Y245del mutasyonuna sahip Hasta #1 fibroblast hücrelerinde her iki koşulda da p.D172N mutasyonlarına sahip diğer hastalara göre yağ damlacıkları sayısının daha fazla olduğu tespit edildi.

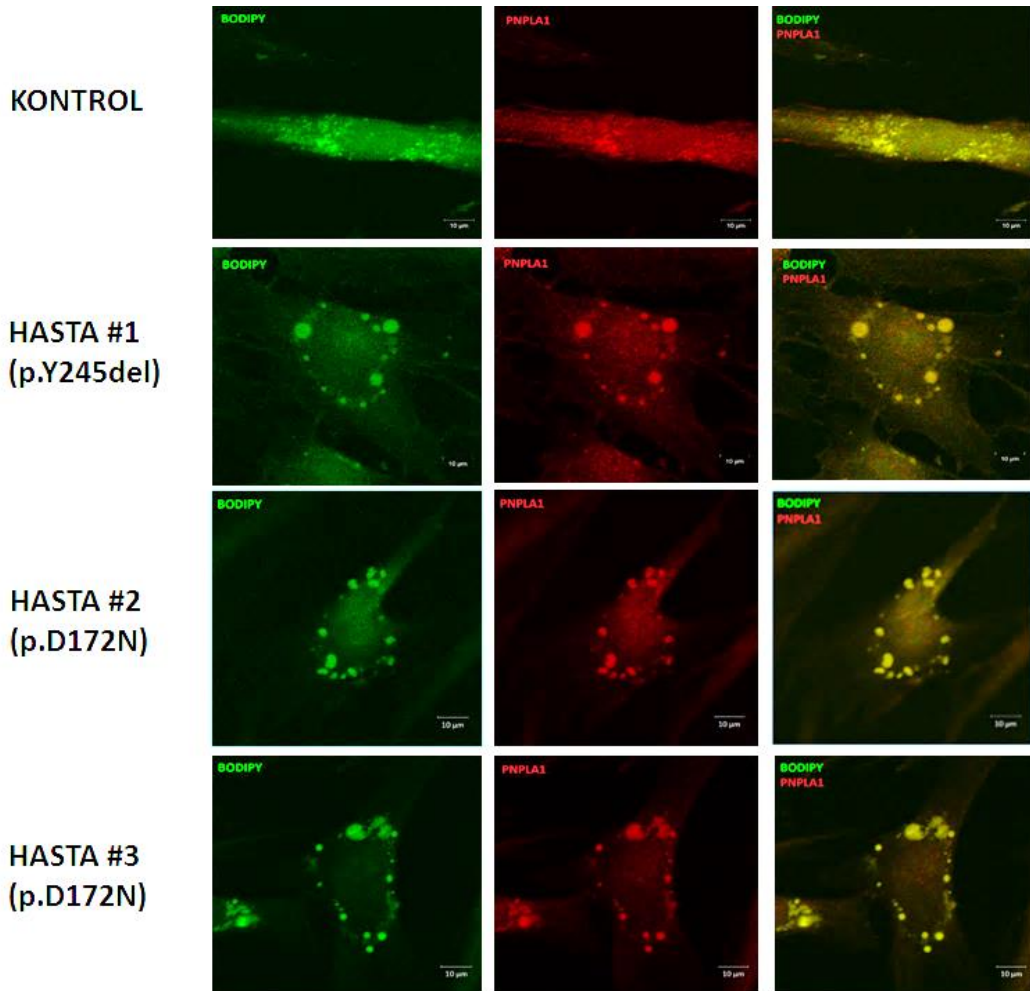
Image J görüntü analiz programı kullanılarak hücrelerdeki yağ damlacıklarının ortalama büyüklükleri (piksel²) hesaplandı ve ortalama yağ damlacığı büyüklükleri Şekil 4.4'te gösterildi. Elde edilen kantifikasyon sonuçlarına göre, hem oleik asit uygulanmamış hem de oleik asit yüklemesi yapılmış koşulda hasta hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla yağ damlacıklarının boyutlarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha büyük oldukları tespit edildi ($P \leq 0.01$).



Şekil 4.4. Hasta ve kontrol fibroblast hücrelerindeki ortalama yağ damlacığı boyutu grafiği (** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, $n=10$, Hata çubukları: Ortalamanın standart hatası (OSH)).

4.2. Mutant PNPLA1 Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşiminin Belirlenmesi

PNPLA1 proteininin C terminallerindeki prolince zengin hidrofobik domainler aracılığıyla hücrede yağ damlacıkları yüzeyinde lokalize olduğu bilinmektedir (31). Tez çalışmasında, p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarına sahip hasta ve kontrol bireylerin fibroblast kültürlerinde, BODIPY® 493/503-Anti PNPLA1 eş floresan boyaması gerçekleştirildi. Eş floresan boyama çalışmaları sonucunda, 12 saat 400 µM oleik asit uygulaması yapılmış durumda kontrol ve hasta fibroblast hücrelerinde PNPLA1 proteininin yağ damlacıkları ile birlikte yerleşimi gösterildi (Şekil 4.5). p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarının PNPLA1 proteininin hücre içi yerleşimine etkisinin olmadığı belirlendi.

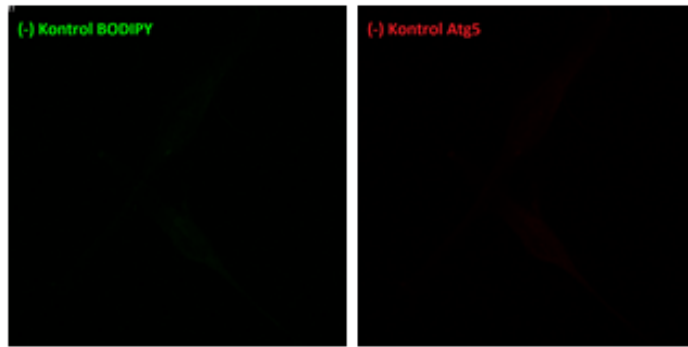


Şekil 4.5. BODIPY® 493/503-Anti PNPLA1 eş floresan boyama görüntüleri.

4.3. Yağ Damlacıklarının Lipofaji Aracılı Regülasyonunun İncelenmesi

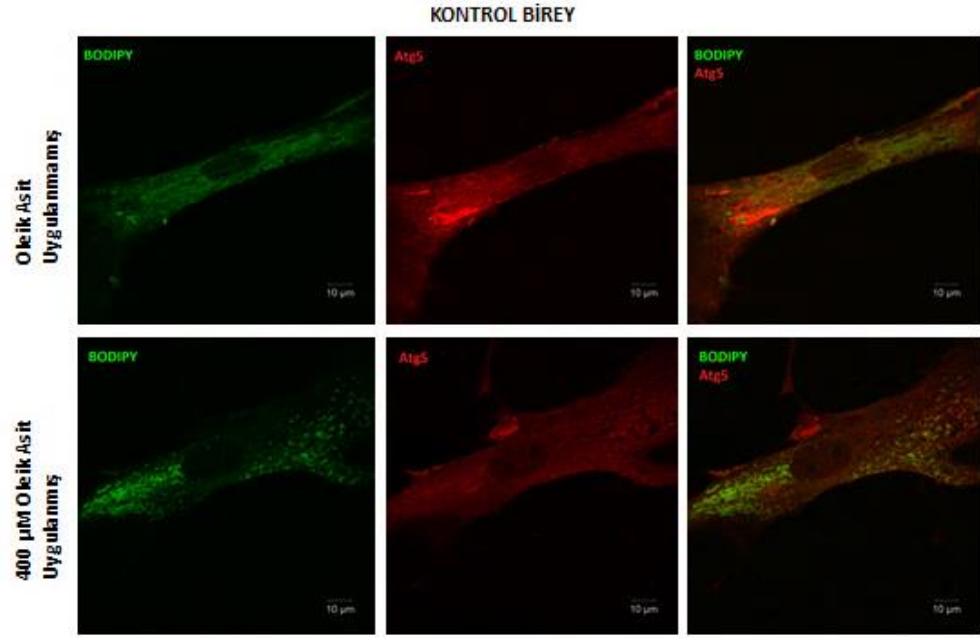
4.3.1. BODIPY®493/503 - Anti Atg5 Eş Floresan Boyaması

Otofagozom oluşum sürecinde görev alan ve otofagozom membran yapısına katılan otofajik belirteçlerden biri olan Atg5 proteininin yağ damlacıkları ile eş yerleşiminin belirlenmesi amacıyla BODIPY®493/503 - Anti Atg5 eş floresan boyaması gerçekleştirildi. BODIPY®493/503 ve antikör boyamasının özgüllüğünün kontrol edilmesi amacıyla hazırlanan negatif kontrol örneklerinden herhangi bir sinyal alınmadı (Şekil 4.6).

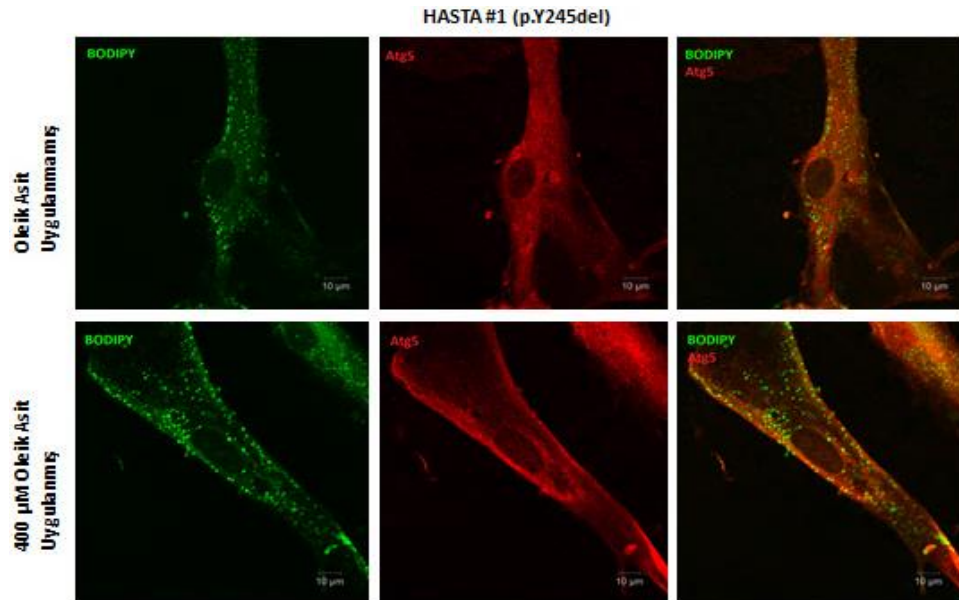


Şekil 4.6. BODIPY®493/503-Anti Atg5 eş floresan boyamasının negatif kontrol görüntüleri.

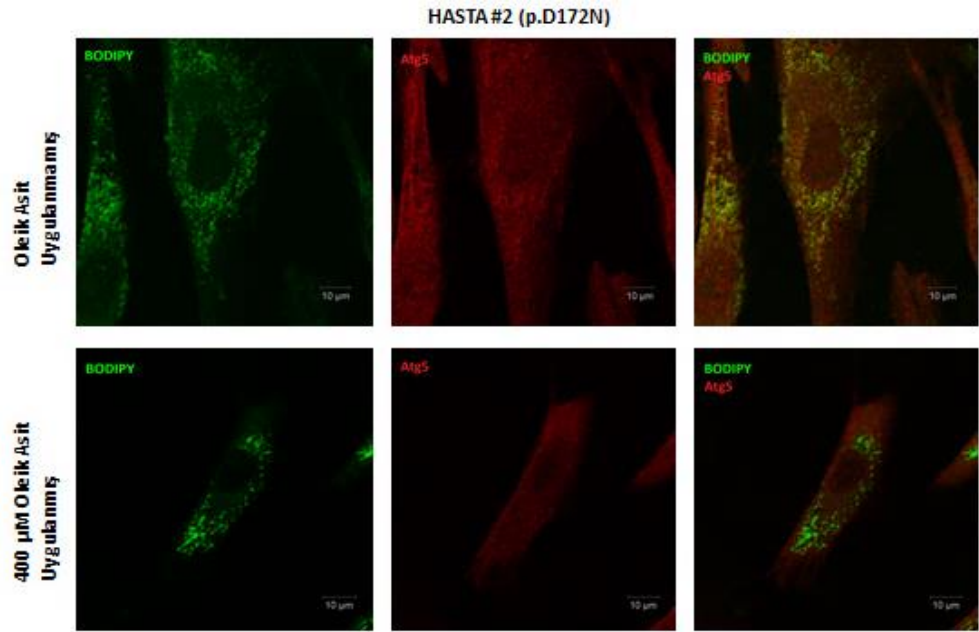
Kontrol ve hasta fibroblast hücrelerinde Atg5 proteininin tüm sitoplazmada ve bazı hücrelerde çekirdekte olmak üzere homojen bir dağılım gösterdiği ve özgül boyanma paternine sahip olmadığı tespit edildi. Elde edilen BODIPY®493/503 - Anti Atg5 eş floresan boyama sonuçlarına göre, her iki koşulda yağ damlacıkları ile Atg5 proteininin belirgin eş yerleşimi tespit edilemedi. Kontrol ve hasta fibroblast hücrelerinde gerçekleştirilen BODIPY®493/503-Anti Atg5 eş floresan boyamasının görüntüleri Şekil 4.7-Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



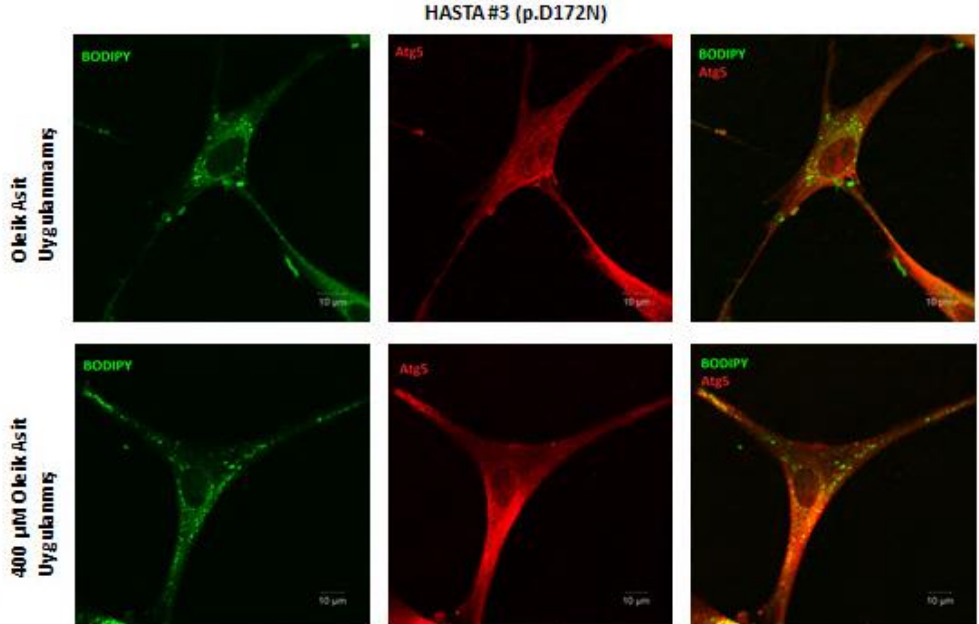
Şekil 4.7. Kontrol fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503-Anti Atg5 eş floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.8. Hasta #1 (p.Y245del) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503-Anti Atg5 eş floresan boyama görüntüleri.



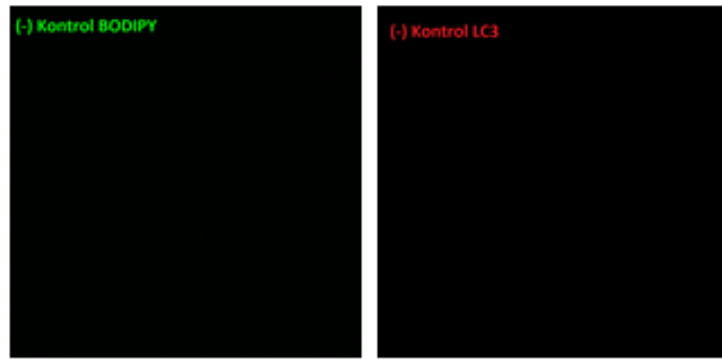
Şekil 4.9. Hasta #2 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503-Anti Atg5 eş floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.10. Hasta #3 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503-Anti Atg5 eş floresan boyama görüntüleri.

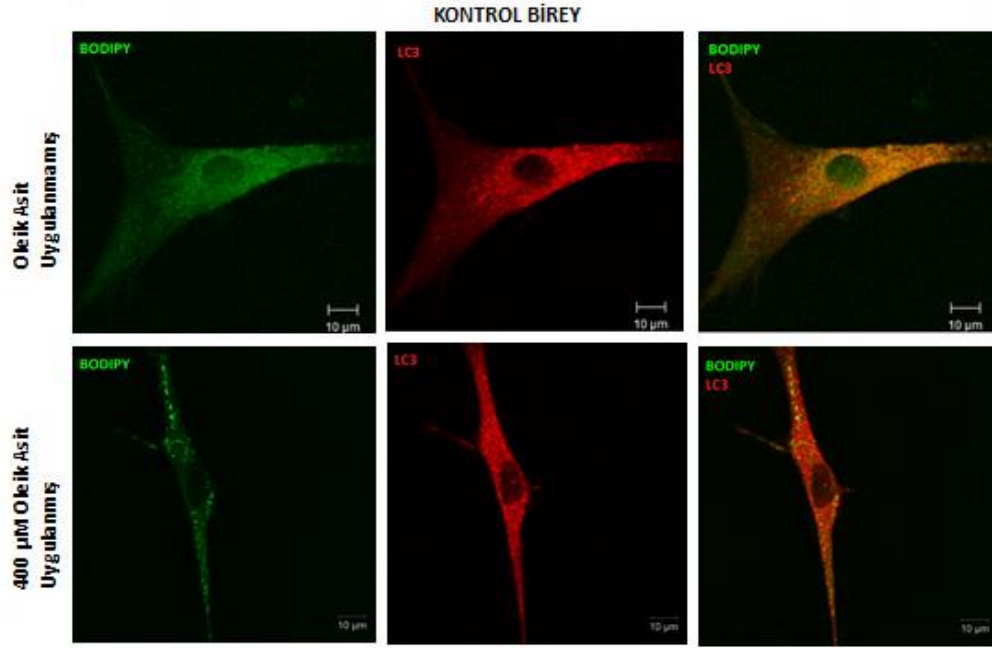
4.3.2. BODIPY®493/503 – Anti LC3 Eş Floresan Boyaması

Mikrotübül asosiye hafif zincir protein-3 (LC3) lipofaji mekanizmasının otofagozom oluşum basamağında önemli bir role sahiptir. LC3 proteini fosfatidil etanolamin ile konjuge olarak membran yapısına entegre olmakta ve yağ damlacıklarını çevreleyen otofagozom membranının uzamasını sağlamaktadır. Lipofaji sürecinde yağ damlacıkları ile otofajik veziküler trafik ilişkisinin araştırılması amacıyla kontrol ve hasta fibroblast hücrelerinde BODIPY®493/503-Anti LC3 eş floresan boyaması gerçekleştirildi. İlk olarak floresan boya ve antikörlerin özgülüğünün kontrol edilmesi amacıyla negatif kontrol preparatları hazırlandı. Hazırlanan negatif kontrol örneklerinden herhangi bir sinyal alınmadı (Şekil 4.11).

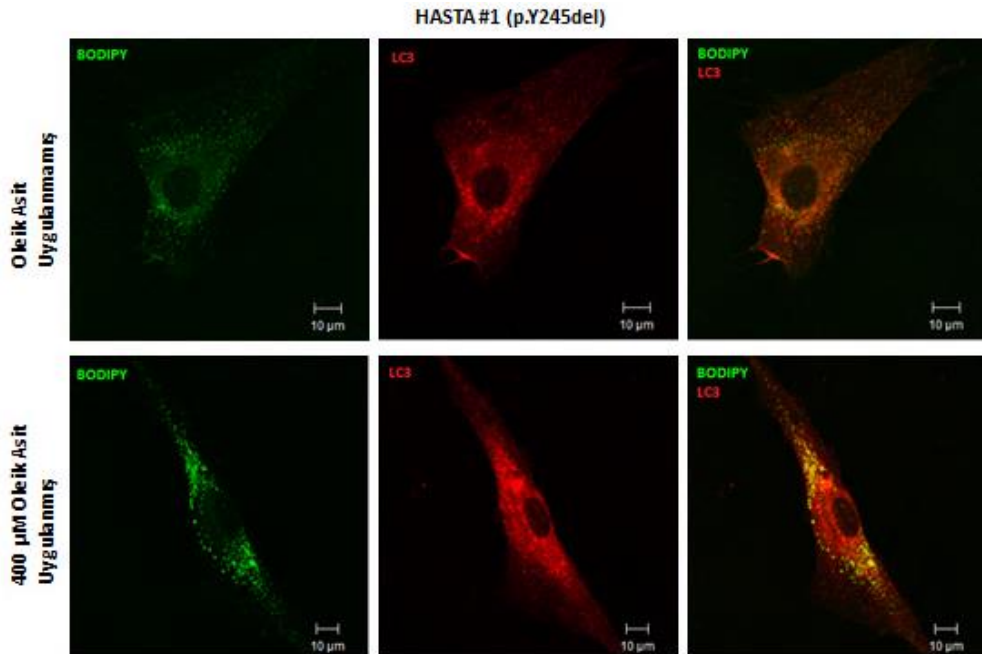


Şekil 4.11. BODIPY®493/503-Anti LC3 eş floresan boyamasının negatif kontrol görüntüleri.

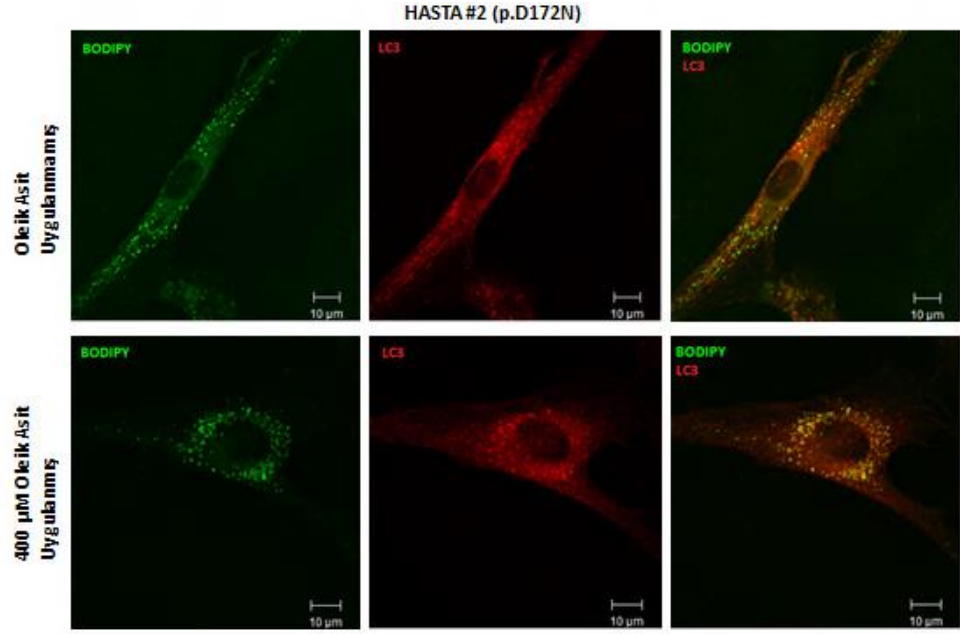
Elde edilen floresan boyama sonuçlarına göre oleik asit yüklemesinin yapılmadığı durumda kontrol fibroblast hücrelerinde BODIPY®493/503-Anti LC3 kolokalizasyonu gözlemlendi. Aynı koşulda, hasta fibroblast hücrelerinde ise yağ damlacıklarının ve LC3 proteini ile hücrede belirgin şekilde ayrı yerleşim gösterdikleri saptandı. Hücrelere oleik asit yüklemesi yapıldığı durumda ise hem kontrol hem de hasta fibroblast hücrelerinde yağ damlacıkları ile LC3 proteininin kolokalizasyonu gözlemlendi (Şekil 4.12 - Şekil 4.15).



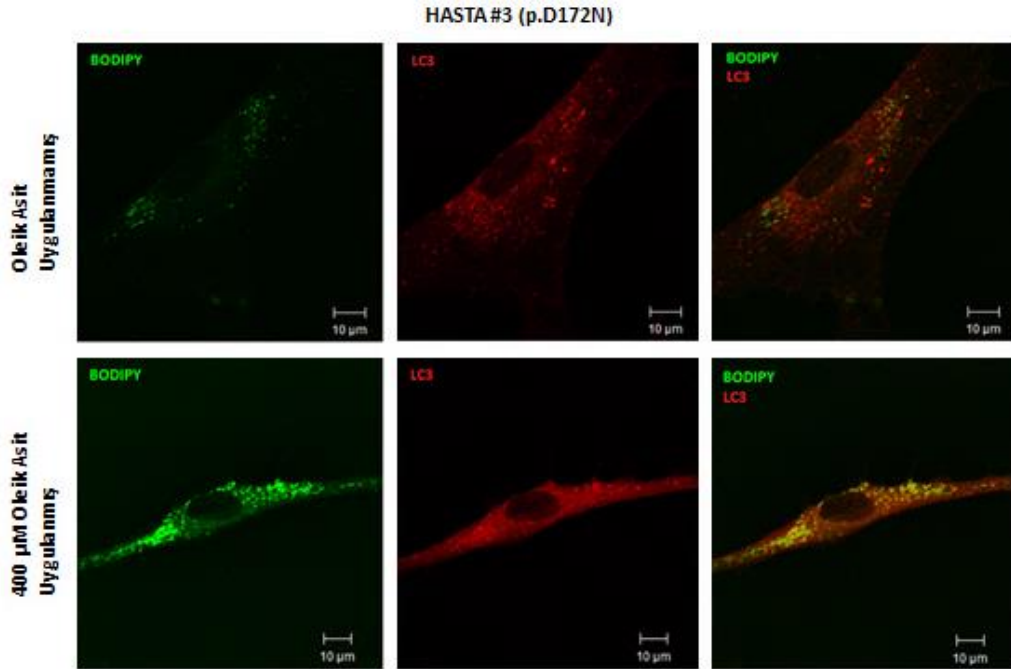
Şekil 4.12. Kontrol fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY[®]493/503-Anti LC3 eş floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.13. Hasta #1 (p.Y245del) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY[®]493/503-Anti LC3 eş floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.14. Hasta #2 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY[®]493/503-Anti LC3 eş floresan boyama görüntüleri.

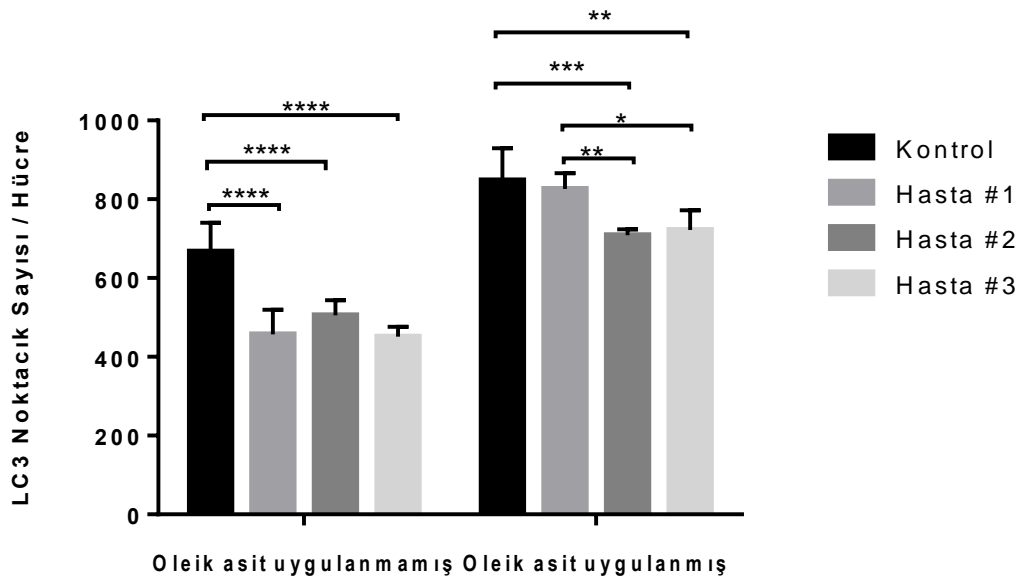


Şekil 4.15. Hasta #3 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY[®]493/503-Anti LC3 eş floresan boyama görüntüleri.

BODIPY[®]493/503-Anti LC3 eş floresan boyama sonucu elde edilen konfokal mikroskop görüntülerinde Image J yazılımı kullanılarak LC3 noktacı (*puncta*) sayımı gerçekleştirildi. LC3 noktacı sayımını gösteren grafik Şekil 4.16'da verilmiştir.

Elde edilen sayısal verilere göre, oleik asit uygulanmamış koşulda hasta fibroblast hücrelerinde kontrole kıyasla hücre başına düşen LC3 noktacı sayısının anlamlı olarak daha az olduğu tespit edildi ($P \leq 0.0001$).

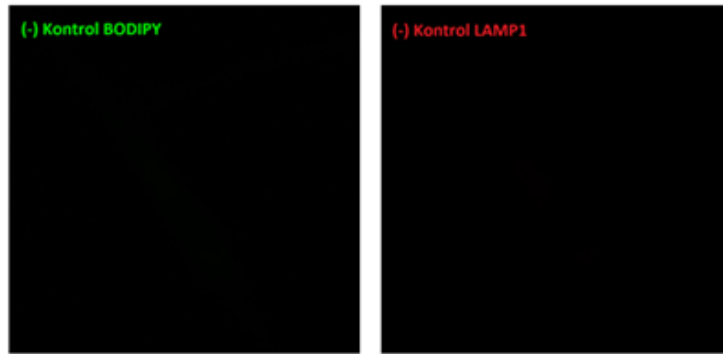
Oleik asit uygulaması yapılmış koşulda ise kontrol ve hasta fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmamış koşula kıyasla LC3 noktacı sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($P \leq 0.0001$).



Şekil 4.16. Kontrol ve hasta fibroblast hücrelerinde hücre başına düşen LC3 noktacı sayısı grafiği (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, $n=5-7$, Hata çubukları: Ortalamanın standart hatası (OSH)).

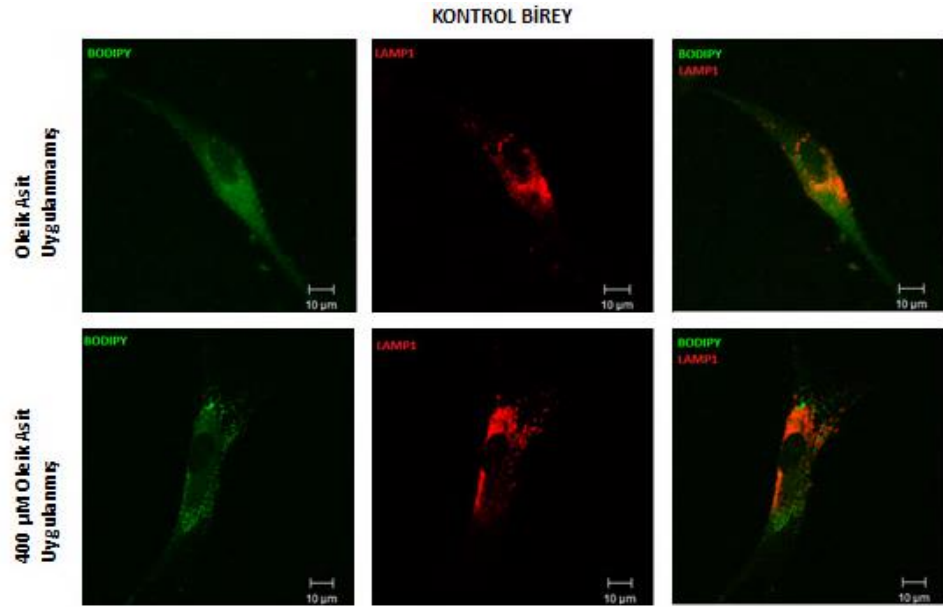
4.3.3. BODIPY®493/503 - Anti LAMP1 Eş Floresan Boyaması

Otofajik süreçte yıkılacak olan sitozolik moleküller veya organeller, otofagozom yapısı içerisine alınarak lizozomlara taşınmakta ve otofagozomların lizozom ile füzyonu sonucunda lizozomal asit hidrolazlar tarafından parçalanmaktadır. Yağ damlacıklarının lipofajik süreçte lizozom ile ilişkisinin incelenmesi amacıyla BODIPY®493/503-Anti LAMP1 (Lizozomal asosiye membran proteini 1) eş floresan boyaması gerçekleştirildi. Hazırlanan negatif kontrol preparatlarından sinyal alınmadı (Şekil 4.17).

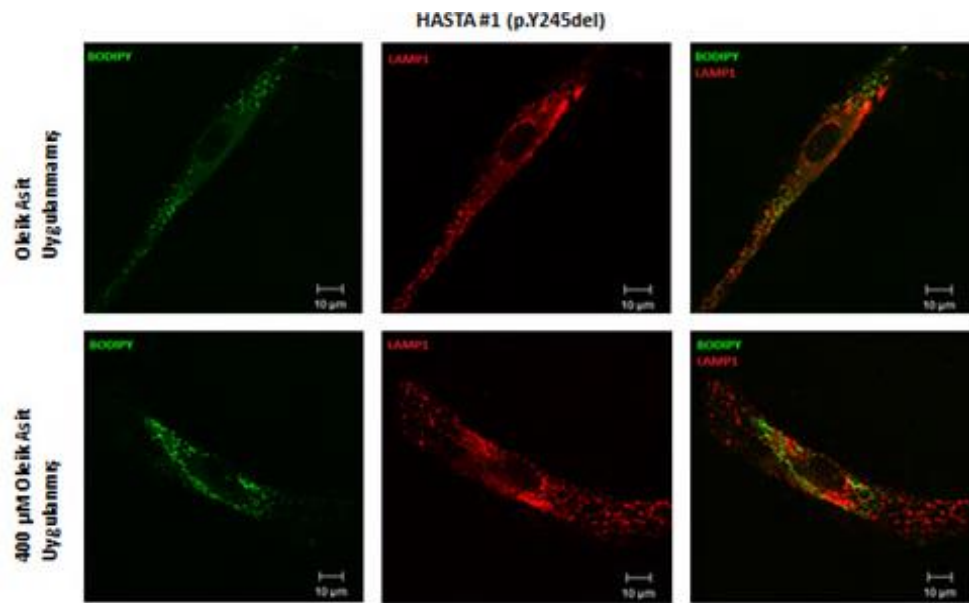


Şekil 4.17. BODIPY®493/503-Anti LAMP1 eş floresan boyamasının negatif kontrol görüntüleri.

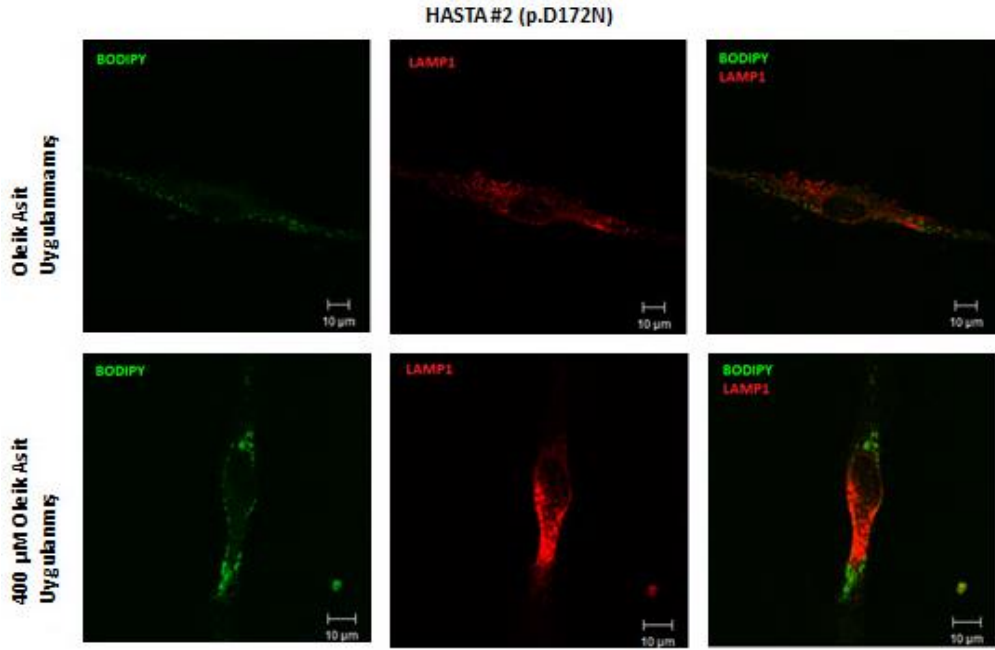
BODIPY®493/503 - Anti LAMP1 eş floresan boyama sonuçlarına göre, oleik asit uygulanmamış durumda kontrol fibroblast hücrelerinde yağ damlacıklarının lizozom ile belirli bölgelerde eş yerleşim gösterdiği gözlemlendi. Hasta fibroblast hücrelerinde ise aynı koşulda yağ damlacıkları ile lizozomların belirgin olarak kolokalizasyonu gözlemlenmedi. Hücrelerin 12 saat süreyle 400 µM oleik asit içeren besiyeri ile muamele edildiği durumda ise hem hasta hem de kontrol fibroblast hücrelerinde yağ damlacıkları ile lizozomun hücrede belirgin olarak kolokalizasyonu gözlemlenmedi (Şekil 4.18-Şekil 4.21).



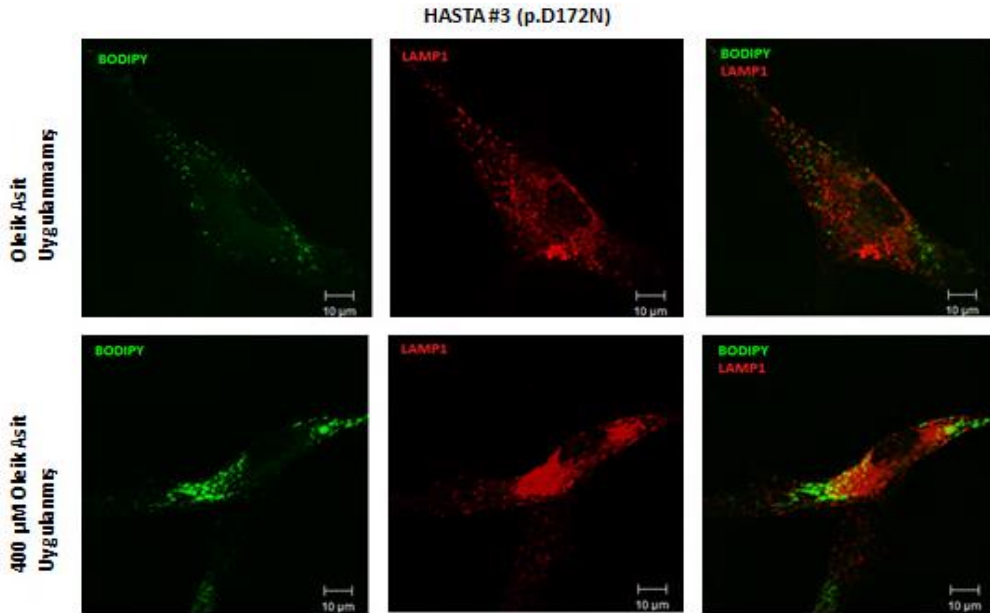
Şekil 4.18. Kontrol fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503 – Anti LAMP1 eş floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.19. Hasta #1 (p.Y245del) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503 – Anti LAMP1 eş floresan boyama görüntüleri.



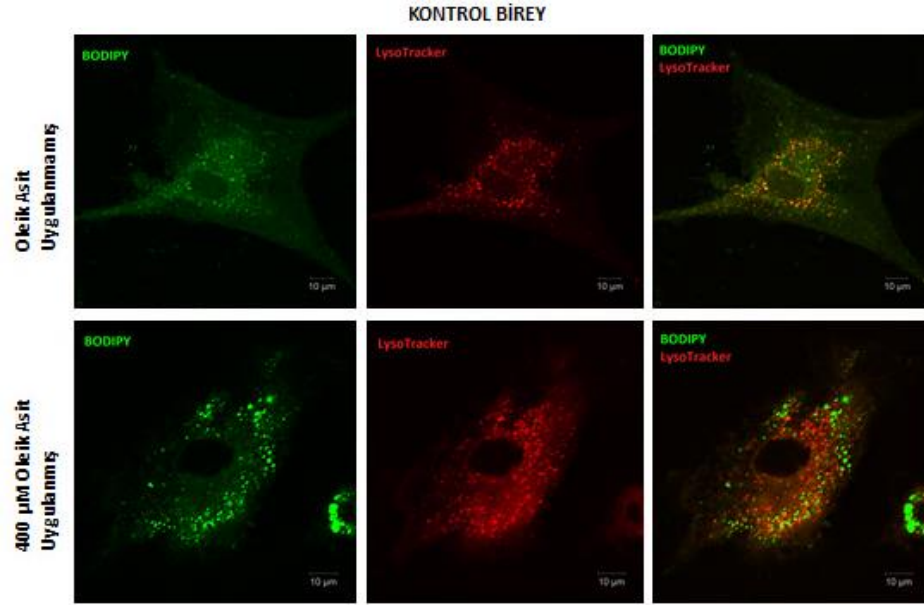
Şekil 4.20. Hasta #2 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503 – Anti LAMP1 eş floresan boyama görüntüleri.



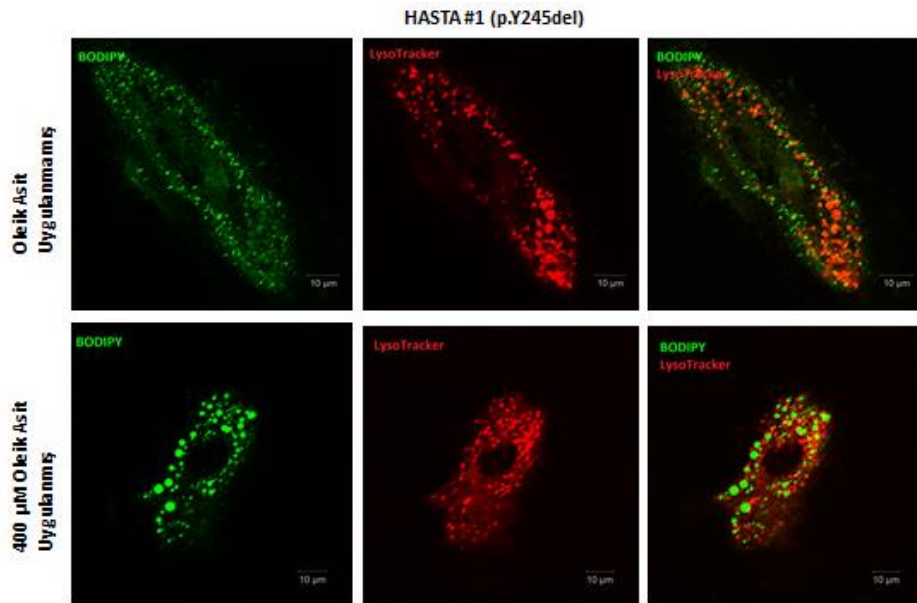
Şekil 4.21. Hasta #3 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503 – Anti LAMP1 eş floresan boyama görüntüleri.

4.3.4. BODIPY®493/503 - Lysotracker® Red-DND-99 Eş Floresan Boyaması

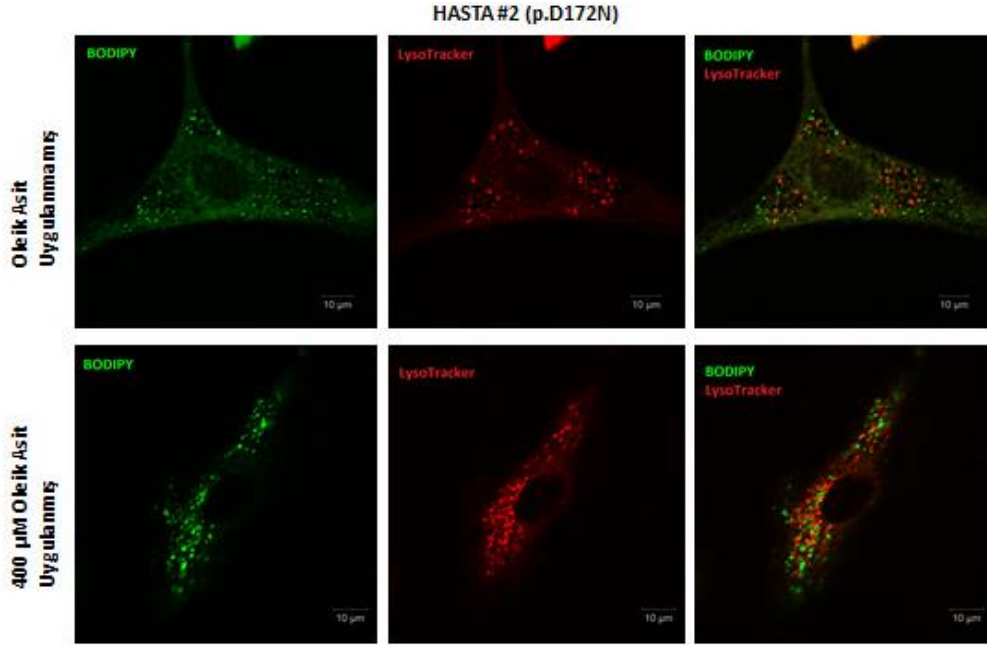
Lysotracker® Red-DND-99 hücrede aktif lizozomların görüntülenmesi için kullanılan asidik kompartmanların özgül olarak boyanmasını sağlayan özel bir floresan boyadır. Nötral pH değerinde serbest olarak membran yapılarından geçip hücrenin asidik kompartmanlarında yerleşerek o bölgelerin floresan olarak tespit edilmesini sağlamaktadır. Tez çalışmasında otofajik süreçte otofagozom/lizozom sürecinin incelenmesinde LAMP1 immünfloresan boyamasına ek olarak özellikle aktif lizozomların belirlenebilmesi için Lysotracker® Red-DND-99 floresan boyama yöntemi kullanıldı. Yağ damlacıklarının aktif lizozomlarla eş yerleşimlerinin araştırılması amacıyla BODIPY®493/503 - Lysotracker® Red-DND-99 eş floresan boyaması gerçekleştirildi. Elde edilen floresan boyama sonuçlarına göre, oleik asit yüklemesi yapılmamış durumda kontrol fibroblast hücrelerinde yağ damlacıklarının aktif lizozomlarla eş yerleşimi olduğu belirlendi. Aynı koşulda, hasta fibroblast hücrelerinde aktif lizozomlarla yağ damlacıklarının eş yerleşimi görülmedi. Oleik asit uygulanmış durumda ise, hem kontrol hem de hasta fibroblast hücrelerinde yağ damlacıklarının aktif lizozomlarla genel olarak ayrı yerleşim gösterdikleri saptandı. BODIPY®493/503 - Lysotracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri Şekil 4.22- Şekil 4.25'te gösterilmiştir.



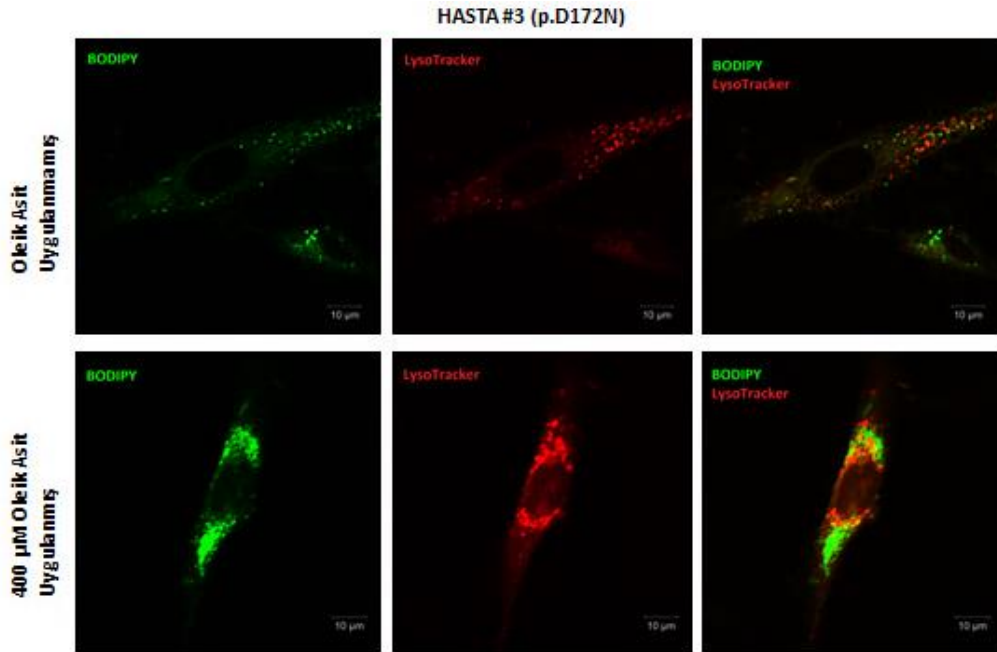
Şekil 4.22. Kontrol fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503 – LysoTracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.23. Hasta #1 (p.Y245del) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503 – LysoTracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.24. Hasta #2 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503 – LysoTracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri.



Şekil 4.25. Hasta #3 (p.D172N) fibroblast hücrelerinde oleik asit uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda BODIPY®493/503 – LysoTracker® Red-DND-99 eş floresan boyama görüntüleri.

5. TARTIŞMA

Otozomal Resesif Konjenital İktiyoz (ORKİ) patolojisi ile ilişkilendirilmiş genlerde tanımlanan mutasyonların epidermise özgü lipit matris tabakasında aksaklıklara neden olarak hastalığın gelişimine sebep olduğu bilinmektedir (9). ORKİ patolojisine sebep olan genlerden biri olan *PNPLA1* geninin fosfolipit metabolizmasında rolü olduğu gösterilmiştir (5). *PNPLA1* gen mutasyonlarının ORKİ patolojisi ile ilişkili olarak epidermal granüler tabakadaki hücrelerde anormal membranöz ve veziküler lipit birikimine neden olduğu rapor edilmiştir (5). Yağ damlacıkları üzerinde yerleşim gösterdiği bilinen *PNPLA1* proteininin mutant olması halinde lipit metabolizmasında aksaklıklara neden olarak yağ damlacıkları regülasyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir. Özellikle fosfolipit metabolizmasındaki rolü sebebiyle hücrel membran organizasyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasının ilk bölümünde p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarına sahip hasta ve kontrol bireylerin fibroblast hücrelerinde yağ damlacıkları birikiminin karşılaştırılması amaçlandı. Elde edilen kantitatif analiz sonuçlarına göre hasta fibroblast hücrelerinde kontrole kıyasla hem normal fizyolojik şartlar altında hem de eksojenik oleik asit yüklemesi yapılmış koşulda belirgin yağ damlacıkları birikimi tespit edildi. Ayrıca, özellikle oleik asit yüklemesi yapılmış durumda hasta hücrelerinde birikimin perinükleer bölgede yoğunlaştığı gözlemlendi. Hastalar kendi aralarında kıyaslandığında ise p.Y245del mutasyonu görülen hücrelerdeki birikimin p.D172N mutasyonu görülen hücrelere göre anlamlı olarak daha fazla olduğu belirlendi. Literatürde de ORKİ alt tiplerinde epidermin stratum korneum tabakasında yağ damlacıkları birikimi olduğu belirtilmiştir (64, 65). Grall ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *PNPLA1* mutasyonlarının granüler tabakadaki keratinosit hücrelerinin nükleus çevresinde anormal membranöz ve veziküler materyal birikimine neden olduğu belirtilmiştir (5). Bu sonuçlara göre, hasta fibroblast hücrelerinde görülen anormal yağ damlacığı birikimlerinin *PNPLA1* gen mutasyonları sonucu lipit metabolizmasında oluşan aksaklıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *PNPLA1* proteininin özellikle fosfatidik asit ve fosfatidiletanolamin metabolizmasında

rol oynadığı ve mutasyonu durumunda hücrede bu fosfolipitlerin oranlarında değişimler görüldüğü bilinmektedir (5). Buna bağlı olarak, fosfolipit sentezi ve metabolizmasında görevi olduğu bilinen PNPLA1 proteininin mutant olması halinde, fosfolipit metabolizmasında oluşacak değişimlerin veya hasarların özellikle membran organizasyonu ve hücre içi membran trafiğini etkileyebileceği düşünülmektedir (66, 67). Özellikle hasta bireylerde birikimin nükleus çevresinde yoğunlaşmasının, Endoplazmik Retikulum (ER) yapısından ayrılarak oluşan yağ damlacıklarının hücre içi taşınmasındaki aksaklıklardan kaynaklanabileceğini göstermektedir. *PNPLA1* gen mutasyonlarının hem yağ damlacıkları birikimine neden olması hem de fosfolipit metabolizmasında aksaklıklara neden olarak hücre içi membran trafiğini etkileme olasılığı, bu proteinin yağ damlacıklarının lipofaji aracılı regülasyonu üzerinde etkisinin olabileceği hipotezini doğrulamaktadır.

Ortalama yağ damlacığı sayısında görülen farklılıklara ek olarak, yapılan kantitatif analizlerde hücrelerdeki ortalama yağ damlacığı boyutlarında da farklılıklar tespit edildi. Uygulanan her iki deney koşulunda da hasta fibroblast hücrelerinde kontrole göre yağ damlacıkları boyutunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha büyük olduğu belirlendi. Memeli hücrelerinde yağ damlacıkları membranının ağırlıklı olarak fosfatidil kolin (%50-60) ve fosfatidil etanolaminden (%20-30) oluşmakla birlikte farklı oranlarda fosfatidik asit, fosfatidil inositol, lizo-fosfatidilkolin, lizo-fosfatidiletanolamin ve kolesterol de içerdiği bilinmektedir (41). Literatürde fosfolipit biyosentez enzimlerinin fonksiyonel genomik tarama çalışmaları sonucunda, bu enzimlerin yağ damlacıklarının sayı ve boyutlarında belirleyici rol oynadığı gösterilmiştir (50). Özellikle fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin biyosentezinde görevli enzimlerin yağ damlacıkları füzyonunu etkileyerek bu yapıların biyosentez ve düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir (68, 69). Yağ damlacıkları yüzeyinde lokalize olan ve fosfolipit metabolizmasında görev alan PNPLA1 proteininin mutant olması halinde, yağ damlacıklarının boyutunda artış görülmesi bu artışın hücrelerdeki fosfolipit oranlarındaki değişiminden kaynaklıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, çalışma kapsamına dahil edilen farklı *PNPLA1* gen mutasyonlarına sahip hasta fibroblast hücrelerinde, mutasyonların proteininin lokalizasyonuna etkisi araştırıldı. Literatürde COS7 hücrelerinde *PNPLA1* proteininin yağ damlacıkları yüzeyinde lokalize olduğu gösterilmiştir (31). *PNPLA1* proteini, C terminalinde bulunan prolince zengin hidrofobik domaini (rezidü 326-451) aracılığıyla yağ damlacıkları yüzeyinde yerleşim göstermektedir (31). Yapılan floresan boyama sonuçlarına göre, hasta fibroblast hücrelerinde kontrol hücrelerde olduğu gibi *PNPLA1* proteininin yağ damlacıkları yüzeyinde yerleşim gösterdiği belirlendi. p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarının *PNPLA1* proteininin hücredeki yerleşimine etkisinin olmadığı tespit edildi.

Çalışmanın son aşamasında ise, hasta fibroblast hücrelerinde yağ damlacıkları birikimine neden olduğu tespit edilen *PNPLA1* gen mutasyonlarının, yağ damlacıklarının temel yıkım mekanizmalarından biri olan lipofaji mekanizmasına etkilerinin araştırılması planlandı. Bu amaçla, belirlenen otofajik belirteçlerle yağ damlacıklarının hücredeki eş yerleşimleri floresan boyama tekniği kullanılarak araştırıldı.

Belirlenen otofajik belirteçlerden biri olan Atg5 proteininin otofagozom oluşum aşamasında Atg12 ve Atg16 proteinleri ile konjuge olarak otofagozom yapısına katıldığı ve bu süreçte direkt rolü olduğu bilinmektedir (58). Yağ damlacıklarının lipofajik yıkımı sürecinde, otofagozomların yağ damlacıkları ile eş yerleşiminin araştırılması için BODIPY[®]493/503 - Anti Atg5 eş floresan boyaması gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre Atg5 proteininin sitoplazmada ve özellikle bazı hücrelerde çekirdekte olmak üzere homojen olarak ifade edildiği tespit edildi. Atg5 proteininin çekirdekte ifade olması, bu proteinin otofaji ile ilgili olmayan fonksiyonları ile ilişkilendirilmektedir (70). Atg5 proteininin sitoplazmada homojen dağılım göstermesi, hasta ve kontrol fibroblast hücrelerinde bu proteinin otofajik akışı nasıl etkilediğini tam olarak açıklayamamaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda da, immünohistokimyasal olarak Atg5 proteininin otofajik indüklenme yapılmış veya

yapılmamış durumlarda farklı boyanma paternleri göstermediği ve sitoplazma dışında çekirdekte de ifade edildiği gösterilmiştir (70, 71). Bu çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda, hücrede Atg5 proteininin özgül olarak ifade edilmemesi nedeniyle, bu proteinin immünohistokimyasal tespiti otofajik akışın izlenmesi için uygun bir yöntem olmadığı belirtilmiştir (71).

Atg5 proteinine ek olarak, otofajik akış sürecinde otofagozom oluşumunu gösteren önemli belirteçlerden bir diğeri olan LC3 proteini analiz edildi. Elde edilen floresan mikroskopi sonuçlarına göre, normal fizyolojik koşullarda, kontrol hücrelerinde yağ damlacıklarının LC3 proteini ile eş yerleşim gösterdiği tespit edildi. Hasta hücrelerinde ise bu koşulda yağ damlacıklarının ve LC3 noktacılarının belirgin biçimde ayrı yerleşim gösterdikleri belirlendi. Yağ damlacıkları ile otofagozom membranının yapısına katılan LC3 proteininin eş yerleşiminin gösterilmesi, hücrede yağ damlacıkları çevresinde otofagozom membranının oluşumunu ve yağ damlacıklarının lipofajik yıkım sürecine girdiğini göstermektedir (72). Bu verilere göre, normal koşullar altında kontrol fibroblast hücrelerinde LC3 proteini ile eş yerleşim gösteren yağ damlacıklarının bazal seviyede lipofajik mekanizması ile yıkımının gerçekleştiği belirlenmiştir. Fakat aynı koşullar altında hasta hücrelerinde yağ damlacıklarının LC3 ile tamamen farklı yerleşim göstermesi, bu hücrelerde yağ damlacıklarının çevresinde otofagozom membran oluşumunda aksaklıklar olabileceğini göstermektedir.

Floresan mikroskopi görüntülemesine ek olarak, hücrelerdeki ortalama LC3 noktacıları (puncta) analizi gerçekleştirildi. Hücrelerde floresan LC3 noktacılarının sayımı, otofajik akış mekanizmasının başlangıcını ve otofagozom oluşumunu temsil eden yöntemlerden biri olarak kullanılmaktadır (73). İleri görüntüleme analizi sonucunda elde edilen sayısal verilere göre, oleik asit yüklemesi yapılmamış durumda LC3 noktacıları sayısının hasta hücrelerde kontrole göre anlamlı olarak daha az olduğu tespit edildi. Hasta hücrelerindeki LC3 noktacı sayısındaki anlamlı farklılık, bu hücrelerdeki otofagozom sayısında azalma olduğunu göstermektedir. Elde edilen

verilere göre, oleik asit uygulanmamış durumda hasta fibroblast hücrelerinde hem LC3 ile eş yerleşim görülememesi hem de LC3 noktacık sayımında azalma görülmesi bu hücrelerde PNPLA1 mutasyonlarının otofajik akış sürecinde otofagozom oluşumunda ve bazal seviyedeki lipofajik yıkımında aksaklıklara neden olabileceğini düşündürmektedir.

Oleik asit yüklemesi yapılan koşulda ise, yağ damlacıkları ve LC3 proteininin hem kontrol hem de hasta fibroblast hücrelerinde birlikte yerleşim gösterdikleri belirlendi. Oleik asit yüklenmemiş koşula kıyasla oleik asit yüklemesi yapıldığında hem kontrol hem de hasta hücrelerde yağ damlacıklarının LC3 ile eş yerleşim göstermesi yağ damlacıklarının otofagozom membran yapısı içerisine alındığını göstermektedir. Ayrıca, yapılan LC3 noktacık sayım analizine göre, oleik asit yüklemesi yapılan durumda kontrol ve hasta fibroblast hücrelerinde LC3 noktacık sayısında oleik asit yüklemesi yapılmamış koşula kıyasla artış görüldü. Farklı mutasyon taşıyan hasta hücrelerinde bu artış oranlarının farklılık gösterdiği saptanmıştır. Literatür kapsamında da bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile tutarlı olarak, hücrelere akut yağ yüklemesi yapıldığında otofagozom oluşumunda artış görüldüğü tespit edilmiştir (52, 74). Bu verilere göre, hücre içi ani serbest yağ asidi artışında biriken yağ damlacıklarını temizlemek amacıyla lipofaji mekanizmasının aktive edildiği düşünülmektedir. Hücrede LC3 artışının total otofajik akışın bir ölçütü olamayacağı, ancak otofajik indüklenmenin veya otofagozom oluşum mekanizmalarındaki aksaklıkların göstergesi olabileceği belirtilmiştir (73). Bu sebeple, otofajik akışın bir basamağındaki aksaklığın tüm mekanizmayı temsil etmeyeceği ve her bir basamağın ayrı analiz edilmesi gerekliliği belirtilmektedir (73).

Hücrede otofajik akışın otofagozom/lizozom füzyon aşamasının araştırılabilmesi için önemli belirteçlerden LAMP1 proteininin ve aktif lizozomların belirlenmesi amacıyla kullanılan LysoTracker® Red-DND-99 floresan boyasının yağ damlacıkları ile eş yerleşim analizi gerçekleştirildi.

BODIPY®493/503 - Anti LAMP1 eş floresan boyaması sonuçlarına göre, oleik asit yüklemesi yapılmamış durumda kontrol hücrelerinde yağ damlacıkları ile LAMP1 proteininin eş yerleşimi gösterildi. Bu sonuç, kontrol hücrelerinde yağ damlacıklarının bazal seviyede lizozomlarda yıkıldığını ve lipofaji mekanizması ile hücredeki dönüşümünü göstermektedir. Fakat aynı koşulda hasta hücrelerinde lizozomlar ile yağ damlacıklarının eş yerleşim göstermediği belirlendi. Gerçekleştirilmiş olan BODIPY®493/503 - Anti LC3 eş floresan boyama sonuçlarına göre hasta hücrelerinde yağ damlacıklarının otofagozom yapısı içerisine alınmasında aksaklıklar görülmesi, otofagozom/lizozom füzyonunun da gerçekleşmemesine neden olduğunu desteklemektedir.

Oleik asit yüklemesi yapılmış koşulda ise, hem hasta hem de kontrol fibroblast hücrelerinde yağ damlacıklarının lizozomlar ile ayrı yerleşim gösterdikleri saptandı. LC3 floresan boyama sonuçlarına göre, oleik asit yüklemesi yapılmış koşulda hasta ve kontrol hücrelerde LC3 ile yağ damlacıkları beraber yerleşim göstermesi nedeniyle otofagozom oluşumunun gerçekleştiği belirlenmişti. Aynı koşulda, LAMP1 ile yağ damlacıklarının ayrı yerleşim göstermesi otofagozom/lizozom füzyonu aşamasındaki aksaklıkları göstermektedir. Bu sonuçlara benzer şekilde, Koga ve arkadaşlarının yüksek yağ diyeti uygulanmış fareler üzerinde yaptıkları çalışmada da, yüksek yağ diyeti uygulamasının otofagozom membran oluşması aşamasında etkisinin olmadığı fakat otofagozom lizozom füzyonu aşamasında aksaklıklara neden olduğu gösterilmiştir (75). Aşırı yağ yüklemesi sonucu membran kompozisyonundaki değişimlerin otofagozom lizozom füzyonunda azalmalara neden olabileceği düşünülmektedir (75). Buna ek olarak, oleik asit yüklendiği durumda yağ damlacıklarının LAMP1 ile ayrı yerleşim göstermesi ani yağ asidi artışına hücrelerin adaptasyon gösteremediği şeklinde yorumlanabilir.

Yağ damlacıklarının Lysotracker® Red-DND-99 floresan boyama sonuçlarına göre, oleik asit yüklemesi yapılmamış durumda yalnızca kontrol hücrelerinde aktif lizozomlar ile yağ damlacıklarının eş yerleşimi belirlendi. Aynı koşulda hasta

hücrelerinde aktif lizozomların boyandığı noktacıklar ile yağ damlacıklarının belirgin şekilde ayrı lokalizasyon gösterdiği belirlendi. Oleik asit yüklemesi yapılan koşulda ise, hem kontrol hem de hasta hücrelerinde yağ damlacıklarının aktif lizozomlarla ayrı yerleşim gösterdiği tespit edildi.

Lysotracker® Red-DND-99 floresan boyama sonuçlarının, LAMP1 immünfloresan sonuçları ile tutarlı olması, normal fizyolojik koşullarda kontrol hücrelerinde yağ damlacıklarının lizozomal yıkımında aksaklık görülmezken, hasta hücrelerinde yağ damlacıklarının lizozomal yıkımında aksaklık olduğunu göstermektedir. Oleik asit yüklemesi yapılmış durumda ise kontrol ve hasta hücrelerinde aktif lizozomlarla yağ damlacıklarının eş yerleşim göstermemesi, LAMP1 boyama sonuçlarında olduğu gibi, aşırı serbest yağ asidi yüklemesinin otofajik akış sürecinde otofagozom lizozom füzyonu aşamasında aksaklıklara neden olabileceğini ve hücrelerin bu ani yağ yüklemesine adapte olamadığını göstermektedir.

Yağ damlacıklarının otofajik belirteçler ile eş yerleşim sonuçlarını özetleyen tablo Ek-2'de gösterilmiştir.

Sonuç olarak, kontrol fibroblast hücrelerinde normal fizyolojik koşullarda, otofagozom oluşumu ve otofagozom/lizozom füzyonu ile ilişkili belirteçlerin yağ damlacıkları ile eş yerleşim gösterdiği saptandı. Hasta fibroblast hücrelerinde ise otofagozom oluşum aşamasında belirlenen aksaklıkların paralelinde otofagozom/lizozom füzyonu aşamasının da etkilendiği ve yağ damlacıklarının lizozomlarla eş yerleşim göstermediği belirlendi. Ek olarak, hasta fibroblast hücrelerinde normal fizyolojik koşullarda belirgin biçimde anormal yağ damlacıkları birikimi tespit edildi. Bu verilere göre, ORKİ hastalarında görülen *PNPLA1* gen mutasyonlarının yağ damlacıklarının lipofaji aracılı regülasyonunda aksaklıklara (inhibisyona) neden olduğu kanısına varılmıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

- PNPLA1 proteininde p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarına sahip ORKİ hastalarının fibroblast hücrelerinde normal fizyolojik koşullarda belirgin olarak anormal yağ damlacıkları birikimi olduğu belirlendi.
- Hücelere eksojenik oleik asit yüklemesi yapıldığı koşullarda hasta fibroblast hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla yağ damlacıkları boyutlarında anlamlı olarak artış tespit edildi.
- p.Y245del ve p.D172N mutasyonlarının PNPLA1 proteininin hücre içi lokalizasyonuna herhangi bir etkisinin olmadığı ve PNPLA1 proteininin fibroblast hücrelerinde ekspresyonunun olduğu gösterildi.
- Oleik asit yüklemesi uygulanmamış ve uygulanmış durumlarda hasta ve kontrol hücrelerinde Atg5 proteininin sitoplazmada ve bazı hücrelerde çekirdekte homojen dağılım gösterdiği belirlendi. Yağ damlacıkları ile Atg5 eş yerleşimi saptanamadı.
- Kontrol fibroblast hücrelerinde normal fizyolojik koşullarda yağ damlacıklarının otofagozomlarla ve lizozomlarla eş yerleşimi gösterildi. Hasta fibroblast hücrelerinde normal fizyolojik koşullarda yağ damlacıklarının hem otofagozomlarla hem de lizozomlarla eş yerleşimi görülmedi. Otofagozom oluşumunu belirten LC3 noktacık sayısının anlamlı olarak daha az olduğu belirlendi.
- Oleik asit uygulaması yapılmış koşulda hem kontrol hem de hasta fibroblast hücrelerinde hücre başına düşen ortalama LC3 noktacık sayısında artış ve yağ damlacıkları ile LC3 proteinlerinin eş yerleşimi tespit edildi.
- Oleik asit yüklemesi yapılmadığı durumda kontrol fibroblast hücrelerinde yağ damlacıklarının LAMP1 ve LysoTracker ile eş yerleşimi gözlemlendi. Aynı koşulda, hasta fibroblast hücrelerinde yağ

damlacıklarının LAMP1 ve LysoTracker ile eş yerleşimi görülmedi. Oleik asit uygulaması yapılmış koşulda hem kontrol hem de hasta fibroblast hücrelerinde yağ damlacıklarının LAMP1 ve LysoTracker ile eş yerleşimi olmadığı belirlendi.

6.2. Öneriler

Tez çalışması sonucunda elde edilen bulguların doğrulanması ve desteklenmesi için yapılabilecek öneriler aşağıda belirtilmiştir.

- Hasta hücrelerindeki yağ damlacıkları birikim nedenlerinin aydınlatılabilmesi için temel yıkım mekanizmalarından bir diğeri olan lipoliz mekanizması araştırılmalıdır.
- PNPLA1 proteininin lipit metabolizmasındaki fonksiyonunun aydınlatılabilmesi için hasta ve kontrol hücrelerde nötral yağlar ve fosfolipit oranları analiz edilmelidir.
- Lipofaji mekanizmasının ORKİ patolojisi ile ilişkisinin daha iyi aydınlatılabilmesi için farklı otofajik belirteçler ve tespit yöntemleri kullanılarak elde edilen veriler doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Thiele, C., Spandl, J. (2008). Cell biology of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology*, 20, 378-385.
2. Hodges, B. D. M., Wu, C. C. (2010). Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *Journal of Lipid Research*, 51, 262-273.
3. Guo, Y., Cordes, K. R., Farese Jr., R. V., Walther, T. C. (2009). Lipid droplets at a glance. *Journal of Cell Science*, 122, 749-752.
4. Greenberg, A. S., Coleman, R. A., Kraemer, F. B., McManaman, J. L., Obin, M. S., Puri, V., Yan, Q. W., Miyoshi, H. (2011). The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2102–2110.
5. Grall, A., Guaguère, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., Hitte, C., Gallo, M. L., Derbois, C., Kim, G. J., Lagoutte, L., Degorce-Rubiales, F., Radner, F. P. W., Thomas, A., Küry, S., Bensignor, E., Fontaine, J., Pin, D., Zimmermann, R., Zechner, R., Lathrop, M., Galibert, F., André, C., Fischer, J. (2012). PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nature Genetics*, 44(2), 140–147.
6. Fachal, L., Rodríguez-Pazos, L., Ginarte, M., Carracedo, a, Toribio, J., Vega, A. (2014). Identification of a novel PNPLA1 mutation in a Spanish family with autosomal recessive congenital ichthyosis. *The British Journal of Dermatology*, 170(4), 980–982.
7. Karaduman, A. (2011). Kalıtsal keratinizasyon bozuklukları. *Turkderm*, 45(2), 73–80.
8. Guaguere, E., Bensignor, E., Küry, S., Degorce-Rubiales, F., Muller, a, Herbin, L., André, C ve diğerleri. (2009). Clinical, histopathological and genetic data of ichthyosis in the golden retriever: a prospective study. *The Journal of Small Animal Practice*, 50(5), 227–35.
9. Fischer, J. (2009). Autosomal recessive congenital ichthyosis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 129(6), 1319–21.

10. Oji, V., Tadini, G., Akiyama, M., Bardon, B., Harper, J., Hashimoto, T., Hausser, I. ve diğerleri. (2010). Revised nomenclature and classification of inherited ichthyoses : Results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Soreze 2009. *American Academy of Dermatology*, 63(4), 607-641.
11. Rodriguez-Pazos, L., Ginarte, M., Vega, A., Toribio, J. (2013). Autosomal recessive congenital ichthyosis. *Actas Dermosifiliograficas*, 104(4), 270–284.
12. Richard G, Bale SJ. (1993). Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis. In: GeneReviews™. University of Washington, Seattle, Seattle (WA); Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1420>.
13. Madison, K. C. (2003). Barrier Function of the Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 121(2), 231–241.
14. Herman, M. L., Farasat, S., Steinbach, P. J., Wei, M., Fleckman, P., Blake, P., Bale, S. J., Toro, J. R. (2011). Transglutaminase-1 (TGM1) Gene Mutations in Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis: Summary of Mutations (Including 23 Novel) and Modeling of TGase-1. *Human Mutation*, 30(4), 537–547.
15. Jobard, F., Lefevre, C., Karaduman, A., Blanchet-Bardon, C., Emre, S., Weissenbach, J., Özgüç, M., Lathrop, M., Prud'homme, J. F., Fisher, J. (2002). Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Human Molecular Genetics*, 11,107–113.
16. Lesueur, F., Bouadjar, B., Lefèvre, C., Jobard, F., Audebert, S., Lakhdar, H., Martin, L., Tadini, G., Karaduman, A., Emre, S., Saker, S., Lathrop, M., Fischer, J. (2007). Novel mutations in ALOX12B in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and evidence for genetic heterogeneity on chromosome 17p13. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127(4), 829–834.
17. Goldsmith, T., Fuchs-Telem, D., Israeli, S., Sarig, O., Padalon-Brauch, G., Bergman, R., Indesman, M., Sprecher, E., Nussbeck, J. (2013). The sound of silence: autosomal recessive congenital ichthyosis caused by a synonymous mutation in ABCA12. *Experimental Dermatology*, 22(4), 251–254.

18. Akiyama, M. (2010). ABCA12 mutations and autosomal recessive congenital ichthyosis: a review of genotype/phenotype correlations and of pathogenetic concepts. *Human Mutation*, 31(10), 1090–1096.
19. Wajid, M., Kurban, M., Shimomura, Y., Christiano, A. M. (2010). NIPAL4/ichthyin is expressed in the granular layer of human epidermis and mutated in two Pakistani families with autosomal recessive ichthyosis. *Dermatology*, 220(1), 8–14.
20. Lefèvre, C., Bouadjar, B., Ferrand, V., Tadini, G., Mégarbané, A., Lathrop, M., Prud'homme, J. F., Fischer, J. (2006). Mutations in a new cytochrome P450 gene in lamellar ichthyosis type 3. *Human Molecular Genetics*, 15(5), 767–776.
21. Israeli, S., Khamaysi, Z., Fuchs-Telem, D., Nousbeck, J., Bergman, R., Sarig, O., Sprecher, E. (2011). A mutation in LIPN, encoding epidermal lipase N, causes a late-onset form of autosomal-recessive congenital ichthyosis. *American Journal of Human Genetics*, 88(4), 482–487.
22. Radner, F. P. W., Marrakchi, S., Kirchmeier, P., Kim, G.-J., Ribierre, F., Kamoun, B., Abid, L., Leipoldt, M., Turki, H., Schempp, W., Heilig, R., Lathrop, M., Fischer, J. (2013). Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. *PLoS Genetics*, 9(6), e1003536.
23. Huber, M., Rettler, I., Bernasconi, K., Frenk, E., Lavrijssen, S. P., Ponc, M., Bon, A., Lautenschlager, S., Schorderet, D. F., Hohl, D. (1995). Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science*, 267, 525–528.
24. Russell, L. J., DiGiovanna, J. J., Rogers, G. R., Steinert, P. M., Hashem, N., Compton, J. G., Bale, S. J. (1995). Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nature Genetics*, 9, 279–283.
25. Racusen, D., Foote, M. (1980). A major soluble glycoprotein of potato tubers, *Journal of Food Biochemistry*, 4(447), 43–52.
26. Rydel, T. J., J. M. Williams, E. Krieger, F. Moshiri, W. C. Stallings, S. M. Brown, J. C. Pershing, J. P. Purcell, M. F. Alibhai. (2003). The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry*, 42, 6696–6708.

27. Kienesberger, P. C., Oberer, M., Lass, A., Zechner, R. (2009). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *Journal of Lipid Research*, 50, 63–68.
28. Lake, A. C., Sun, Y., Li, J.-L., Kim, J. E., Johnson, J. W., Li, D., Revett, T., Shih, H. H., Liu, W., Paulsen, J. E., Gimeno, R. E. (2005). Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *Journal of Lipid Research*, 46(11), 2477–2487.
29. Saarela, J., Jung, G., Hermann, M., Nimpf, J., Schneider, W. J. (2008). The patatin-like lipase family in *Gallus gallus*. *BMC Genomics*, 9, 281.
30. Murugesan, S., Goldberg, E. B., Dou, E., Brown, W. J. (2013). Identification of diverse lipid droplet targeting motifs in the PNPLA family of triglyceride lipases. *PloS One*, 8(5), e64950.
31. Chang, P.-A., Sun, Y.-J., Huang, F.-F., Qin, W.-Z., Chen, Y.-Y., Zeng, X., Wu, Y.J. (2013). Identification of human patatin-like phospholipase domain-containing protein 1 and a mutant in human cervical cancer HeLa cells. *Molecular Biology Reports*, 40(10), 5597–605.
32. Zechner, R., Kienesberger, P. C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., Lass, A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research*, 50, 3–21.
33. Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research*, 40(5), 325–438.
34. Digel, M., Eehalt, R., Füllekrug, J. (2010). Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy. *FEBS Letters*, 584(11), 2168–2175.
35. Goodman, J. M. (2008). The gregarious lipid droplet. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28005–28009.
36. Zehmer, J. K., Huang, Y., Peng, G., Pu, J., Anderson, R. G. W., Liu, P. (2009). A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics*, 9(4), 914–921.
37. Beller, M., Thiel, K., Thul, P. J., Jäckle, H. (2010). Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus. *FEBS Letters*, 584, 2176–2182.

38. Ohsaki, Y., Suzuki, M., Fujimoto, T. (2014). Open questions in lipid droplet biology. *Chemistry Biology*, 21, 86-96.
39. Fujimoto, T., Parton, R. G. (2011). Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), 1–17.
40. Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(2), 263–279.
41. Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., Fujimoto, T. (2002) The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *Journal of Biological Chemistry*, 277:44507–44512.
42. Yang, H., Galea, A., Sytnyk, V., Crossley, M. (2012). Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(4), 509–516.
43. Fei, W., Shui, G., Zhang, Y., Krahmer, N., Ferguson, C., Kapterian, T. S., Lin, R.C., Dawes, I. W., Brown, A. J., Li, P. (2011). A role for phosphatidic acid in the formation of “supersized” lipid droplets. *PLoS Genetics*, 7(7):e1002201.
44. Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S. P., Welte, M. A. (2006). The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Current Biology*, 16(18), 1783–1795.
45. Brasaemle, D. L., Dolios, G., Shapiro, L., Wang, R. (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 46835–46842.
46. Khandelia, H., Duelund, L., Pakkanen, K. I., Ipsen, J. H. (2010) Triglyceride Blisters in Lipid Bilayers: Implications for Lipid Droplet Biogenesis and the Mobile Lipid Signal in Cancer Cell Membranes. *PLoS ONE* 5(9): e12811.
47. Buhman, K. K., Chen, H. C., Farese, R. V. (2001). The enzymes of neutral lipid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40369–40372.

48. Walther, T. C., Farese Jr., V. R. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*, 1791(6), 459–466.
49. Greenberg, A. S., Coleman, R. A., Kraemer, F. B., McManaman, J. L., Obin, M. S., Puri, V., Yan, Q. W., Miyoshi, H. (2011). The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2102–2110.
50. Guo, Y., Walther, T. C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G. (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature*, 453: 657–661.
51. Ducharme, N. A., Bickel, P. E. (2008). Minireview: Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis. *Endocrinology*, 149(3):942–949.
52. Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 458(7242), 1131–1135.
53. Thiam, A. R., Farese, R. V, Walther, T. C. (2013). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(12), 775–786.
54. Liu, K., Czaja, M. J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death and Differentiation*, 20 (1), 3–11.
55. Tukaj, C. (2013). The significance of macroautophagy in health and disease. *Folia Morphologica*, 72(2), 87–93.
56. Feng, Y., He, D., Yao, Z., Klionsky, D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, 24(1), 24–41.
57. Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*, 41, 1103-1130.
58. Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T., Rubinsztein, D. C. (2010). Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 7,9-17.

59. Jung, C. H., Ro, S., Cao, J., Otto, N. M., Kim, D. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, 584(7), 1287–1295.
60. Geng, J., Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO Reports*, 9, 859-864.
61. Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Rubinsztein, D. C. (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(11), 1707–1711.
62. Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S., Hotamisligil, G. S., (2010). Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metabolism*; 11: 467–478.
63. Czaja, M. J. (2010). Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 298: 973–978.
64. Niemi, K., Kanerva, L., Kuokkanent, K. (1992). Clinical, light and electron microscopic features of recessive congenital ichthyosis type I. *British Journal of Dermatology*, 130, 626-633.
65. Kawashima J, Akiyama M, Takizawa Y, Takahashi S, Matsuo I, Shimizu H. (2005). Structural enzymatic and molecular studies in a series of non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma patients. *Clinical and Experimental Dermatology*, 30, 429–431.
66. Haucke, V., Di Paolo, G. (2007). Lipids and lipid modifications in the regulation of membrane traffic. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(4), 426–435.
67. Kooijman, E. E., Burger, K. N. (2009). Biophysics and function of phosphatidic acid: a molecular perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(9), 881-888.
68. Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A., Thiele, C. (2011). Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. *The Journal of Biological Chemistry*, 286:21330–21339.

69. Hörl, G., Wagner, A., Cole, L. K., Malli, R., Reicher, H., Kotzbeck, P., Köfeler, H., Höfler, G., Frank, S., Bogner-Strauss, J. G., Sattler, W., Vance, D. E., Steyrer, E. (2011). Sequential synthesis and methylation of phosphatidylethanolamine promote lipid droplet biosynthesis and stability in tissue culture and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 286:17338–17350.
70. Simon, H. U., Robert, F. (2014). Atg5: A distinct role in the nucleus, *Autophagy*, 10(1), 176-177.
71. Martinet, W., Schrijvers, D. M., Timmermans, J. P., Bult, H. De Meyer, G. R. Y. (2013). Immunohistochemical analysis of macroautophagy, *Autophagy*, 9(3), 386-402.
72. Weidberg, H., Shvets, E., Elazar, Z. (2009). Lipophagy: selective catabolism designed for lipids. *Developmental Cell*, 16:628–630.
73. Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S. ve ark. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4, 151–175.
74. Mei, S., Ni, H. M., Manley, S., Bockus, A., Kassel, K. M., Luyendyk, J. P., Copple, B. L., Ding, W. X. (2011). Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339(2), 487–498.
75. Koga, H., Kaushik, S., Cuervo, A. M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *The FASEB Journal*, 24(8), 3052–3065.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onay Raporu



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

Sayı : 16049357 - 630

08 Ocak 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 02.04.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/06
Proje No : GO 14/183 (Değerlendirme Tarihi: 19.03.2014)
Karar No : GO 14/183 - 13

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Serap DÖRMECİ'nin sorumlu araştırmacı olduğu Prof. Dr. Ayşen KARADUMAN, Uzm. Dr. Ayşe YÜZBAŞIOĞLU ve Arş.Gör. Gizem ÖNAL ile birlikte çalışacakları GO 14/183 kayıt numaralı ve "Konjenital İktiyoz Vakalarında Yağ Damlacıklarının Lipofüji Aracılı Regülasyonunun İncelenmesi" başlıklı proje önerisi araştırmanın gereğiçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nürten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduyus (Üye) |
| GÖREVLİ | GÖREVLİ |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Baken (Üye) | 10. Prof. Dr. Cansın Şaçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yılmaz Sara (Üye) | 11. Prof. Dr. R. Küksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensöğ (Üye) | GÖREVLİ |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| GÖREVLİ | GÖREVLİ |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizanoğlu (Üye) | 14. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| GÖREVLİ | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin Tamagül (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

EK 2: Lipofaji Mekanizması ile İlişkili Eş Floresan Boyama Sonuçları

Tablo EK 2: Lipofajik belirteçler ile yağ damlacıklarının eş floresan boyama sonuçlarının genel olarak gösterimi.

| Eş Floresan Boyamalar | BODIPY-Atg5 Kokalizasyonu | | BODIPY-LC3 Kokalizasyonu | | BODIPY-LAMP1 Kokalizasyonu | | BODIPY-LysoTracker Kokalizasyonu | |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| | Oleik asit uygulanmamış | Oleik asit uygulanmış | Oleik asit uygulanmamış | Oleik asit uygulanmış | Oleik asit uygulanmamış | Oleik asit uygulanmış | Oleik asit uygulanmamış | Oleik asit uygulanmış |
| Koşullar Bireyler | | | | | | | | |
| Kontrol | — | — | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✗ |
| Hasta #1 (p.Y245del) | — | — | ✗ | ✓ | ✗ | ✗ | ✗ | ✗ |
| Hasta #2 (p.D172N) | — | — | ✗ | ✓ | ✗ | ✗ | ✗ | ✗ |
| Hasta #3 (p.D172N) | — | — | ✗ | ✓ | ✗ | ✗ | ✗ | ✗ |