

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİTOKONDRI HASARI İLE İLİŞKİLİ NÖROMÜSKÜLER HASTALIKLARDA  
MİTOKONDRIYAL PROTEİN İMPORT MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Uzm. Evrim AKSU-MENGEŞ

Tıbbi Biyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ

ANKARA  
2024



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİTOKONDRI HASARI İLE İLİŞKİLİ NÖROMÜSKÜLER HASTALIKLARDA  
MİTOKONDRIYAL PROTEİN İMPORT MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Uzm. Evrim AKSU-MENGEŞ

Tıbbi Biyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Burcu BALCI

ANKARA  
2024

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİTOKONDRI HASARI İLE İLİŞKİLİ NÖROMÜSKÜLER HASTALIKLARDA MİTOKONDRIYAL  
PROTEİN İMPORT MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Öğrenci: Evrim AKSU MENGEŞ  
Danışman: Prof. Dr. Burcu BALCI

Bu tez çalışması 19.01.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Tıbbi Biyoloji Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** Dr. Öğr. Üy. Beril TALİM (imza)  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** Prof. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU (imza)  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** Prof. Dr. Yunus Kasım TERZİ (imza)  
*Başkent Üniversitesi*

**Üye:** Prof. Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE (imza)  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** Prof. Dr. Gürler AKPINAR (imza)  
*Kocaeli Üniversitesi*

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

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN  
Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

22/01/2024  
Evrin AKSU MENGEŞ

i

<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.  
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

### **ETİK BEYAN**

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

*Evrin AKSU MENGEŞ*

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana her konuda destek olan, yol gösteren, bilgisini ve değerli katkılarını esirgemeyen, beni her zaman yüreklendiren değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Burcu Balcı'ya;

Tez çalışmalarına değerli yorumları ile katkıda bulunan tez izleme komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Banu Peynircioğlu ve Prof. Dr. Yunus Kasım Terzi'ye ve tez savunma sınavımdaki değerli jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Yusuf Çetin Kocaefe, Doç. Dr. Gürler Akpınar ve Dr. Öğr. Üy. Beril Talim'e;

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan ve eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma ve çalışanlarına;

Saat farkına aldırmadan her zaman yanımda ve bana destek olan sevgili dostlarım Gizem Önal, Gülsüm Kayman Kürekçi ve Nazlı Eskici'ye; doktora eğitimimin zorluklarını birlikte göğüslediğim sevgili Ecem Kural Mangıt'a;

Laboratuvarda çalışmayı ve veri tartışmayı eğlenceli hale getiren sevgili grup arkadaşım Eray Taha Kumtepe'ye;

Çalışmalarım süresince her daim sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana destek olan canım aileme;

Hayatın her alanında olduğu gibi doktora eğitim sürecimde de elinden gelen her türlü yardımı ve fedakârlığı gösteren, sevgisi ve anlayışıyla benden desteğini esirgemeyen sevgili eşim Harun Mengeş'e,

Dünyaya gelişiyle tüm hayatımı değiştiren ve anlamlandıran sonsuz enerji kaynağım, sevgili kızım Ilgın Mengeş'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Aksu Mengeş, E. Mitokondri Hasarı ile İlişkili Nöromusküler Hastalıklarda Mitokondriyal Protein İmport Mekanizmasının Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2024.** Mitokondrilerin işlevlerini doğru olarak yerine getirebilmeleri için, gDNA tarafından kodlanan ve sitozoldeki serbest ribozomlarda sentezlenen mitokondriyal proteinlerin organel taşınımının hatasız gerçekleşmesi gerekmektedir. Anormal mitokondri morfolojisinin, membran potansiyeli ve ATP üretimi azalışının, ROS artışının mitokondriyal protein importunu etkilediği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, nadir nöromusküler hastalıklarda gözlenen sekonder mitokondri hasarının düzenlenmesinde rol alan ortak miRNA'ların olası hedef genlerinin mitokondriyal protein importu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu amaçla tez çalışmasında DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD etiopatogenezinde ortak ve sekonder bir bulgu olarak iskelet kasında gözlenen mitokondri hasarının mitokondriyal protein import mekanizması ile ilişkisi araştırılmıştır. İlk aşamada; mitokondriyal sinyal dizisi içeren pcDNA3/Mito-GFP plazmidi kontrol ve hasta gruplarına ait primer miyoblastlarına transfekte edilmiş ve tüm hastalarda MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlenmiştir. Sekonder mitokondri hasarı ile direkt ilişkilendirdiğimiz miR-382-5p, pcDNA3/mito-GFP ile birlikte C2C12 hücrelerine transfekte edildiğinde, MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde kontrole kıyasla anlamlı şekilde azalma saptanmıştır. İkinci aşamada; primer miyoblastlardan mitokondri izolasyonu sonrasında, LC-MS/MS ile proteomik analizler gerçekleştirilmiştir. Aday proteinler arasında, ATP/ADP *transporter* olarak görev yapan SLC25A4'ün total hücrede RNA ve protein seviyesinde ifadesinin değişmediği, ancak mitokondriyal fraksiyondaki miktarının tüm hastalarda azaldığı qRT-PCR ve *Western Blot* ile gösterilmiştir. Hastalara ait primer miyoblastlarda SLC25A4'ün mitokondrilerde yerleşiminin azaldığı SLC25A4-TOM20 eş immüno floresan boyaması ile doğrulanmıştır. Tez çalışması ile, patogenezinde sekonder mitokondri hasarının görüldüğü nadir nöromusküler hastalıklarda mitokondriyal import mekanizmasının potansiyel rolü aydınlatılmış, organel hasarının önlenmesi/geriye döndürülmesi amacıyla yeni ve farklı hastalık grupları için ortak tedavi hedefleri tanımlanabilmesine olanak sağlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Mitokondri hasarı, mitokondriyal protein importu, nöromusküler hastalıklar, proteomik analizler

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: TSA-2021-19199) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Proje No: 123Z178) tarafından desteklenmiştir.



### ABSTRACT

**Aksu Mengeş, E. Investigation of Mitochondrial Protein Import Mechanism in Neuromuscular Diseases Associated with Mitochondrial Damage. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2024.** The transport of mitochondrial proteins, which are encoded by gDNA and synthesized by free ribosomes in the cytosol, to the organelle must be error-free for the proper functioning of mitochondria. It has been shown that abnormal mitochondrial morphology, decreased membrane potential and ATP production, and increased ROS affect mitochondrial protein import. Also, possible target genes of common miRNAs, which are involved in the regulation of secondary mitochondrial damage observed in rare neuromuscular diseases, have been found to be associated with mitochondrial protein import. For this purpose, the relationship between mitochondrial protein import mechanism and mitochondrial damage observed as a common and secondary finding in the etiopathogenesis of DMD, Megaconial CMD, and Ullrich CMD was investigated. As the first step, the pcDNA3/Mito-GFP plasmid containing a mitochondrial targeting signal sequence was transfected into primary myoblasts of the control and patient groups, and a significant decrease in MitoGFP-TOM20 co-localization was observed in all patients. When miR-382-5p, which we directly associate with secondary mitochondrial damage, was co-transfected with pcDNA3/mito-GFP into C2C12 cells, a significant reduction in MitoGFP-TOM20 co-localization was detected compared to the control. As the second step, proteomic analyses were performed by LC-MS/MS after isolation of mitochondria from primary myoblasts. Although the amount of SLC25A4, which acts as an ATP/ADP transporter, decreased in the mitochondrial fraction, it was determined that its expression at the RNA and protein level was preserved in total cells by qRT-PCR and Western Blot. Decreased localization of SLC25A4 in mitochondria in primary myoblasts of patients was confirmed by SLC25A4-TOM20 co-immunofluorescence staining. With this thesis, the potential role of the mitochondrial import mechanism in rare neuromuscular diseases in which secondary mitochondrial damage is seen in the pathogenesis has been elucidated, allowing the identification of common therapeutic targets for new and different disease groups to prevent/reverse organelle damage.

**Keywords:** Mitochondrial damage, mitochondrial protein import, neuromuscular disorders, proteomic analysis

This thesis study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TSA-2021-19199) and the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) (Project No: 123Z178).

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xix
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Mitokondri ve İşlevleri	4
2.2. Mitokondriyal Protein İmport Mekanizmaları	6
2.3. Mitokondriyal Protein İmport Hataları ile İlişkili Hastalıklar	10
2.4. Nöromüsküler Hastalıklarda Mitokondri Hasarı	11
2.5. Mitokondri Hasarı ile İlişkili Nöromüsküler Hastalıklar ve Mitokondriyal Protein İmport Mekanizması Hasarı İlişkisi	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>22</b>
3.1. Gereçler	22
3.1.1. Hücre Kültürü	23
3.1.2. Rekombinant Gen İfade Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması	24
3.1.3. Transfeksiyon	24
3.1.4. İmmünfloresan Boyama	25
3.1.5. Mitokondriyal fraksiyonun ayrıştırılması ve protein izolasyonu	26
3.1.6. Total protein izolasyonu	27
3.1.7. Protein miktar tayini	27

3.1.8. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	27
3.1.9. Western Blot	28
3.1.10. Proteomik Analizler	29
3.1.11. Total RNA izolasyonu	30
3.1.12. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	30
3.2. Yöntemler	31
3.2.1. Biyobankadan Temin Edilen Dondurulmuş Primer Miyoblastların Kültür Ortamında Açılması ve Pasajlanarak Çoğaltılması	31
3.2.2. Rekombinant gen ifade vektörünün transfeksiyon için hazırlanması	32
3.2.3. Nükleofeksiyon ile pcDNA3/Mito-GFP Gen İfade Vektörünün Primer Miyoblastlara Transfeksiyonu	36
3.2.4. Lipofektamin 3000 ile pcDNA3/Mito-GFP Gen İfade Vektörü ve miRNA mimiklerin C2C12 Hücrelerine Birlikte Transfeksiyonu	38
3.2.5. İmmünfloresan Boyama ve Eş Yerleşim Analizi	39
3.2.6. Primer miyoblastlardan mitokondriyal fraksiyonun ayrıştırılması ve protein izolasyonu	40
3.2.7. Primer miyoblastlardan total protein izolasyonu	41
3.2.8. Western Blot Analizi	42
3.2.9. Zenginleştirilmiş mitokondriyal fraksiyonda proteomik analizler	46
3.2.10. Proteomik çalışması verilerinin biyoinformatik analizleri	50
3.2.11. Primer miyoblastlardan total RNA izolasyonu	51
3.2.12. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)	52
<b>4. BULGULAR</b>	<b>54</b>
4.1. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Dondurulmuş Primer Miyoblastların Kültür Ortamında Açılması ve Pasajlanması	54
4.2. Hasta ve Kontrol Primer Miyoblastlarında Mitokondriyal Protein İmport Analizi (Pre-sequence/ TIM23 import yolağı analizi)	55

4.3. Mitokondri Hasarı ile İlişkilendirilen miR-382-5p ve miR-409-3p'nin Mitokondriyal Protein İmport (Pre-sequence/ TIM23 import yolağı) Mekanizmasına Etkisi	59
4.4. Hasta ve Kontrol Primer Miyoblastlarından Mitokondriyal Fraksiyonun İzolasyonu ve Kalite Kontrolü	61
4.5. Hasta ve Kontrol Primer Miyoblastlarından İzole Edilen Mitokondriyal Fraksiyonda Proteomik Analizler	63
4.6. Aday Olarak Seçilen Mitokondriyal Proteinler (SLC25A4, SLC25A6, PMPCB, SPG7, MRPL3) için LC-MS/MS Analiz Sonuçlarının Doğrulanması	71
4.7. Hasta ve Kontrol Primer Miyoblastlarında Öncelikli Aday SLC25A4'ün İfadesinin ve Mitokondriyal Yerleşiminin Analizi	73
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>77</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>88</b>
6.1. Sonuçlar	88
6.2. Öneriler	90
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>93</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>108</b>
<b>EK-1:</b> Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
<b>EK-2:</b> Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
<b>EK-3:</b> Tez Çalışması Dijital Makbuz	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>111</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>%</b>	Yüzde
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>ACO2</b>	<i>Aconitase 2</i>
<b>ADP</b>	Adenozin difosfat
<b>AF488/ 568</b>	<i>Alexa Fluor 488/ 568</i>
<b>AGK</b>	Açilgliserol kinaz
<b>ALS</b>	Amiyotrofik lateral skleroz
<b>ANT1/3</b>	<i>ADP/ATP translocase 1/3</i>
<b>APP</b>	Amiloid prekürsör proteini
<b>APS</b>	Amonyum per sülfat
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i>
<b>Bkz</b>	Bakınız
<b>BMD</b>	<i>Becker</i> müsküler distrofi
<b>BSA</b>	Dana Serum Albümini
<b>CHCHD3</b>	<i>MICOS complex subunit MIC19</i>
<b>CHKB</b>	Kolin Kinaz Beta
<b>CL</b>	Kardiyolipin
<b>COL6A</b>	Kollajen tip VI alfa
<b>CPEO</b>	<i>Chronic progressive external ophthalmoplegia</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>Dk</b>	Dakika
<b>DMD</b>	<i>Duchenne</i> Müsküler Distrofi

<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DNAJC19</b>	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family Member C19</i>
<b>Drp1</b>	<i>Dynamin-related protein 1</i>
<b>ECM</b>	Ekstraselüler matris
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetraasetik asit
<b>EGTA</b>	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
<b>ER</b>	Endoplazmik retikulum
<b>ETZ</b>	Elektron Transport Zinciri
<b>FBS</b>	Fetal dana serumu
<b>Fis1</b>	<i>Mitochondrial fission protein 1</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>g</b>	Gram
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GFP</b>	Yeşil floresan protein
<b>GO</b>	<i>Gene Ontology</i>
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>HRP</b>	<i>Horseradish</i> Peroksidaz
<b>Hsp70</b>	<i>Heat shock proteins 70</i>
<b>Htt</b>	<i>Huntingtin</i>
<b>IF</b>	İmmü floresan
<b>IgG</b>	İmmünglobulin G
<b>IMS</b>	Membranlar arası boşluk
<b>Kb</b>	Kilobaz
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KMD</b>	Konjenital Müsküler Distrofi
<b>L</b>	Litre
<b>LB</b>	<i>Lysogeny Broth</i>

<b>LC-MS/MS</b>	<i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
<b>mdx</b>	<i>Muscular dystrophy X-linked</i>
<b>MELAS</b>	<i>Mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis stroke-like episodes</i>
<b>MERRF</b>	<i>Myoclonus epilepsy ragged-red fibers</i>
<b>Mff</b>	<i>Mitochondrial fission factor</i>
<b>miRNA</b>	Mikro RNA
<b>mg</b>	Miligram
<b>MIA</b>	<i>Mitochondrial import and assembly</i>
<b>MIM</b>	<i>Mitochondrial import</i>
<b>MOPS</b>	<i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i>
<b>MPP</b>	<i>Mitochondrial processing peptidase</i>
<b>MRPL3</b>	<i>39S ribosomal protein L3, mitochondrial</i>
<b>mtDNA</b>	Mitokondriyal DNA
<b>MTS</b>	Matriks hedefleme dizisi
<b>MTT</b>	<i>3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide</i>
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ml</b>	Mililitre
<b>MYO7A</b>	<i>Myosin VIIA</i>
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NADH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotit
<b>gDNA</b>	Genomik DNA
<b>OMIM</b>	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<b>OXA</b>	<i>Oxidase assembly</i>
<b>OXPHOS</b>	Oksidatif fosforilasyon
<b>PAGE</b>	Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>PAM</b>	<i>Presequence translocase-associated motor</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>

<b>PC</b>	Fosfatidilkolin
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i>
<b>PDHA1</b>	Pirüvat dehidrogenaz E1 alfa
<b>PFA</b>	Paraformaldehit
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferative activated receptor-<math>\delta</math> coactivator 1<math>\alpha</math></i>
<b>PMPCB</b>	<i>Mitochondrial-processing peptidase subunit beta</i>
<b>PVDF</b>	Polivinilidin Florür
<b>qPCR</b>	Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>rmd</b>	<i>Rostrocaudal muscular dystrophy</i>
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>rRNA</b>	Ribosomal ribonükleik asit
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>SAM</b>	<i>Sorting and assembly machinery</i>
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SLC25A6/4</b>	<i>Solute carrier family 25A6/4</i>
<b>SMA</b>	Spinal müsküler atrofi
<b>Sn</b>	Saniye
<b>SPG7</b>	<i>Spastic paraplegia type 7</i>
<b>SV</b>	Spin/vakum
<b>TAZ</b>	<i>Tafazzin</i>
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i>
<b>TBS-T</b>	<i>Tris buffered saline-Tween20</i>
<b>TIM22</b>	<i>Translocase of the inner membrane 22</i>
<b>TIM23</b>	<i>Translocase of the inner membrane 23</i>
<b>Tom20</b>	<i>Translocase of Outer Membrane 20</i>
<b>tRNA</b>	Taşıyıcı ribonükleik asit



## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mitokondride işlevsel olan ve gDNA tarafından kodlanan proteinlerin farklı yollar aracılığı ile organelere taşınması (mitokondriyal import yolları) Wiedemann ve ark.(1)'ndan uyarlanmıştır.	9
2.2. Nöromusküler hastalık grupları ve kontroller arasında ifade farklılığı gösteren miRNA'ların mitokondriyal hedef genlerinin <i>Gene Ontology</i> - 'Biyolojik Süreç' kategorisinde terim zenginleştirme analizi sonuçları	17
2.3. C2C12 hücrelerine miRNA mimik (hsa-miR134-5p, hsa-miR382-5p, hsa-miR409-3p ve hsa-miR708-5p) transfeksiyonları sonrası yapılan mitokondri morfoloji analizi görüntüleri	18
2.4. C2C12 hücrelerine miRNA mimik (hsa-miR134-5p, hsa-miR382-5p, hsa-miR409-3p ve hsa-miR708-5p) transfeksiyonları sonrası yapılan ATP miktar tayini sonuçlarının grafiksel olarak gösterimi	19
3.1. pcDNA3/mito-GFP plazmidinin haritası	32
4.1. Hasta ve kontrol bireylere ait primer miyoblastların ışık mikroskobu altındaki görüntüleri	55
4.2. pcDNA3/Mito-GFP plazmidinde bulunan ACO2 proteinine ait 105 bç'lik mitokondriyal sinyal dizisinin (üst) DNA dizi analizi ile doğrulanması (alt)	56
4.3. <i>Nucleofector</i> ile pcDNA3/Mito-GFP transfeksiyonu yapılmış primer miyoblastları	57
4.4. pcDNA3/Mito-GFP transfekte edilmiş hasta ve kontrol primer miyoblastlarının TOM20 antikoru ile immünfloresan boyaması sonrasında konfokal mikroskopi görüntüleri	58
4.5. pcDNA3/Mito-GFP transfekte edilmiş hasta ve kontrol primer miyoblastlarında MitoGFP-TOM20 eş yerleşim analizi	58

- 4.6. pcDNA3/Mito-GFP ile birlikte miR-382-5p veya miR-409-3p transfekte edilmiş C2C12 hücrelerinin TOM20 antikoru ile immünfloresan boyaması sonrasında konfokal mikroskopi görüntüleri. 60
- 4.7. pcDNA3/Mito-GFP ile birlikte miR-382-5p veya miR-409-3p transfekte edilmiş C2C12 hücrelerinde MitoGFP-TOM20 eş yerleşim analizi 61
- 4.8. “*Hypotonic swelling*” yöntemi ile primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonun *Western Blot* analizi ile kalite kontrolü 62
- 4.9. Hasta ve kontrol primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyon proteinlerine ait LC-MS/MS analizinin PCA grafiği 63
- 4.10. Hasta ve kontrol primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyon örnekleriyle yapılan LC-MS/MS analizinde tespit edilen proteinlerin *abundance* grafiği 64
- 4.11. LC-MS/MS sonucunda nöromusküler hastalık gruplarında miktar farklılığı saptanan mitokondriyal protein sayılarının (Kırmızı: miktarı artan, Mavi: miktarı azalan proteinler) *Venn* şeması ile gösterimi 65
- 4.12. Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen ortak proteinlerin *Gene Ontology* (GO)’deki gen zenginleştirme analizi sonuçları 68
- 4.13. Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen ortak proteinlerin *Reactome* veri tabanındaki yolak analizine ait sonuçlar 69
- 4.14. Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen ortak proteinlerin *STRING* (2) veri tabanından elde edilen protein-protein etkileşim analizleri 70
- 4.15. Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen mitokondriyal protein importu ile ilişkili 6 proteinin (SLC25A6, SLC25A4, PMPCB, SPG7, TOM22, CHCHD3) (Üst) *STRING* (2) veri tabanındaki etkileşim ağı analizine ait sonuçları ve (Alt) protein-protein etkileşim ağı 70

- 4.16.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda *Western Blot* ile aday mitokondriyal proteinlerin ifade analizi 72
- 4.17.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda aday proteinler için yapılan *Western Blot* analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi 73
- 4.18** Hasta ve kontrol primer miyoblastlarında total SLC25A4 ifadesinin *Western Blot* ve qRT-PCR ile protein ve RNA seviyesinde analizi 74
- 4.19.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlarında SLC25A4-TOM20 eş immünfloresan boyamasının konfokal mikroskopi görüntüleri 75
- 4.20.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlarında SLC25A4 proteininin TOM20 ile eş yerleşiminin analizi 76

**TABLolar**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	Tez kapsamında çalışılan primer miyoblastlara ait bilgiler	22
<b>3.2.</b>	BCA protein <i>assay</i> için standart örneklerin sulandırım oranları	42
<b>3.3.</b>	Mitokondriyal proteomik analizler sonucunda seçilen aday proteinleri tanıyan antikorların <i>Western Blot</i> analizi için optimize edilen çalışma koşulları	45
<b>3.4.</b>	nHPLC'de analitik kolona uygulanan mobil fazların gradyanları	49
<b>4.1.</b>	LC-MS/MS sonucunda hastalara ait primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen ortak proteinlerin listesi	67
<b>4.2.</b>	4.2. Mitokondriyal proteomik analizleri sonucunda validasyon için seçilen aday proteinler ve bu proteinlerin LC-MS/MS sonucuna göre hastalık-kontrol grupları arasındaki miktarsal farkları (hasta/kontrol oranı)	72

## 1. GİRİŞ

Mitokondride işlev gören proteinlerin büyük çoğunluğu (%99) genomik DNA (gDNA) tarafından kodlanmaktadır. Sitozolde serbest ribozomlarda sentezi gerçekleşen bu proteinlerin çeşitli şaperon ve translokaz proteinleri yardımıyla mitokondriye taşınması işlemi mitokondriyal protein importu olarak tanımlanmaktadır. Hücre metabolizması ve homeostazı için temel organeller olan mitokondrilerin işlevlerini doğru olarak yerine getirebilmeleri için, mitokondriyal proteinlerin organelle taşınımının hatasız bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir. Mitokondriyal protein import hatalarının birçok farklı hastalığın patogeneğinde primer veya sekonder etkisinin olduğu bilinmektedir. Primer mitokondriyal protein transport hataları, mitokondriyal proteinlerin sinyal dizilerindeki veya mitokondriyal protein importunda görevli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (3-7). Ancak son yıllarda, farklı genetik temelleri olmasına rağmen ortak olarak nöronlarda mitokondriyal hasarın saptandığı birçok nörodejeneratif hastalıkta da sekonder olarak mitokondriyal protein importunun etkilendiği sonucuna ulaşılmıştır (8-10).

Mitokondriyal miyopatiler dışında kalan, genetik ve patolojik olarak farklı birçok nöromusküler hastalıkta ortak ve sekonder bir bulgu olarak iskelet kasında mitokondri hasarı (anormal mitokondri morfolojisi, düşük membran potansiyeli, azalmış Adenozin trifosfat (ATP) üretimi ve reaktif oksijen türleri-ROS artışı) gözlenmekte olup, mitokondriyal protein import mekanizmasının bu yolaktaki potansiyel işlevi günümüze kadar araştırılmamıştır. Mitokondriyal protein importu ile organel morfolojisinin sıkı bir etkileşim içerisinde olduğu bilinmektedir. Mitokondri membranında yer alan birçok protein dual rol oynayarak hem organel morfolojisinin hem de protein importunun düzenlenmesine katkı sağlamaktadır (11-14). Aynı zamanda, farklı gruplar tarafından yapılan birçok çalışmada azalmış ATP üretiminin mitokondriyal protein importunu etkilediği saptanmıştır. ATP üretimi ve protein importu karşılıklı olarak birbirini etkileyen iki biyolojik süreçtir (15-17). Mitokondriyal protein importunun düzenlenmesinde rol

oynayan faktörlerden biri de mitokondri membran potansiyelidir. Mitokondri matriksinin negatif yüklü olması, N-terminalinde kesilebilir pozitif sinyal dizisi içeren mitokondriyal proteinlerin transport sürecini hızlandırmaktadır (18). Bunun yanı sıra, translokaz kompleksleri voltaj bağımlı olarak aktifleştiklerinden, membran potansiyelindeki bozulmanın mitokondriyal protein importunu etkileyebileceği öngörülmektedir (19, 20). Dolayısıyla, nöromusküler hastalıklarda iskelet kas dokusunda saptanmış olan mitokondri işlevlerindeki hatalar, mitokondriyal import mekanizması hasarının nedeni ya da sonucu olarak karşımıza çıkma potansiyeline sahiptir.

Bunun yanı sıra, grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada farklı genetik temelleri olan nadir nöromusküler hastalıklarda (Duchenne Musküler Distrofi (DMD), Megakoniyal Konjenital Musküler Distrofi (KMD), Ullrich KMD ve alfa-distroglikanopati) gözlenen ortak mitokondri hasarının (21-28) düzenlenmesinde rol alan ortak mikroRNA (miRNA) profili belirlenmiştir. miRNA mikrodizin analizi sonucunda, 17 miRNA'nın analiz edilen tüm hasta gruplarında, kontrol örneklerle kıyasla, ifade değişikliği gösterdiği saptanmıştır. *Gene Ontology* (GO)- 'Biyolojik Süreç' kategorisinde gen zenginleştirme analizi sonuçlarına göre, 17 miRNA içerisinde 8 tanesinin olası hedef genlerinin mitokondriyal protein importu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (29). Bu çalışmaya yönelik verilerimiz, mitokondri hasarının gözlemlendiği farklı nöromusküler hastalık gruplarında ortak olarak mitokondriyal protein importunun etkilenmiş olabileceğini düşündürmüştür. Ek olarak, membran fosfolipitlerinin mitokondri import mekanizması ile ilişkisine yönelik literatür çalışmaları, fosfatidilkolin (PC) biyosentez hatası ile karakterize olan ve araştırmalarımızda mitokondri hasarı (anormal mitokondri morfolojisi, mitokondriyal fisyon azalışı, ATP seviyesi azalışı) (30) saptanmış olduğumuz Megakoniyal KMD hastalığında protein importunun etkilenmiş olabileceğini düşündüren bulgular içermektedir. Mitokondri membran lipitlerinin miktarı ve yerleşiminin, translokaz komplekslerinin doğru yerleşimini ve stabilizasyonunu etkileyerek, mitokondriyal protein importunu düzenlediği düşünülmektedir (31). Ayrıca, membran lipitlerinin biyogenezinden ve modifikasyonlarından sorumlu enzimleri kodlayan genlerde

saptanmış olan mutasyonlar protein import hatalarına yol açmaktadır. Ayrıca, mitokondri membranlarında en çok bulunan lipid olan PC eksikliğinin translokaz komplekslerinin stabilizasyonunu bozduğu da saptanan bulgular arasındadır (32, 33).

Ön çalışmalarımız ve literatür verileri doğrultusunda tez çalışmasında; farklı nükleer genlerin sorumlu olduğu nadir nöromusküler hastalıklardan; DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD etiyopatogenezinde gözlenen mitokondri hasarının mitokondriyal protein import mekanizması ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla ilk aşamada, Londra-Nöromusküler Hastalıklar Merkezi Biyobankası (*MRC CNMD Biobank London, Dubowitz Neuromuscular Unit, Institute of Child Health*)'ndan getirtilen hasta ve kontrol primer miyoblastlarında mitokondriyal protein import mekanizmasındaki (*pre-sequence/ TIM23* import yolağı) olası hasarın araştırılmasına yönelik işlevsel analizler gerçekleştirildi. *Aconitase 2 (ACO2)* proteinine ait mitokondriyal sinyal dizisi içeren pcDNA3/Mito-GFP plazmidi primer miyoblastlara transfekte edildi ve hasta ve kontrol bireylere ait transfekte hücrelerde mitokondrilerde yerleşim gösteren GFP miktarları karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Bunun yanı sıra, sekonder mitokondri hasarının gözleendiği nöromusküler hastalıklarda iskelet kas dokusunda artışını tespit etmiş olduğumuz ve mitokondri hasarı ile direkt olarak ilişkilendirdiğimiz miR-382-5p'nin mitokondriyal protein import mekanizması hasarı ile ilişkisi araştırıldı. Tez çalışmasının ikinci aşamasında ise; hasta ve kontrol primer miyoblastlarından mitokondriyal fraksiyon izole edildi ve kalite kontrol aşamaları sonrasında LC/MS-MS ile proteomik analizler gerçekleştirildi. Elde edilen yüksek ölçekli veri setlerinin değerlendirmesi ile hasta ve kontrol hücreleri arasında mitokondriyal fraksiyondaki miktarları istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişen ve mitokondriyal protein importu ile ilişkili aday proteinler tespit edildi. Mitokondriyal fraksiyon proteinleriyle yapılan *Western Blot* analizi ile LC/MS-MS sonuçlarının doğrulandığı öncelikli aday proteinin total hücredeki ifadesi RNA ve protein seviyesinde sırasıyla *Western Blot* ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ile, mitokondrilerdeki yerleşimi immünfloresan boyama ile analiz edildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mitokondri ve İşlevleri

Mitokondriler, hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarının devamlılığı için gerekli olan temel biyoenerjetik ve biyosentetik yollarda kritik rolleri olan bakteri kökenli organellerdir. Hücre içerisinde ağırs bir morfolojiye sahip olan organel; iç ve dış membran, membranlar arası boşluk (*intermembrane space*-IMS) ve matriks kısmı olmak üzere dört temel kısımdan oluşmaktadır. Dış membranda, voltaj bağımlı anyon kanalı veya porin adı verilen beta ( $\beta$ ) tabaka yapıllı içi sulu kanallar mevcut olup, küçük molekül ve iyonların serbest difüzyonuna olanak sağlar (34). Bu nedenle IMS, sitoplazma ile aynı pH ve iyonik kompozisyona sahiptir ve dış membran boyunca elektrokimyasal gradyanı yoktur (35). Bunun yanı sıra dış membranda mitokondri dinamiğinde görevli proteinler bulunmaktadır (36). Mitokondri iç membranının %80'i proteinlerden oluşmaktadır (37). ATP üretiminin temel bölgesi olan iç membran, iyon ve küçük moleküllere geçirgen değildir; bazı iyonlar, protonlar, fosfat, temel metabolitler, ATP ve ADP için özel taşıyıcı proteinler mevcuttur (38). Bu şekilde oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) için gereken proton gradyanı korunmuş olur (39, 40). Elektron transport zinciri (ETZ) kompleksleri ve ATP sentazın yanı sıra, iç membranda ATP/ADP ve küçük metabolit taşıyıcı proteinler yer almaktadır. İç membran, solunum zincirinin proteinlerinin yoğun olarak bulunduğu ve biyomembranlardaki en fazla protein miktarına sahip (%70 oranında) krista adı verilen büyük girintiler oluşturur (39). Kristanın dış membran ile bağlantı yaptığı noktalarda bulunan özel membran proteinleri, difüzyon bariyeri oluştururken, organelin iç ve dış membranını birbirine bağlar (41). Oksidatif metabolizmanın merkezi yolağı olan sitrik asit döngüsünün gerçekleştiğı organelin matriksinde yaklaşık 16.6 kilobaz (kb) uzunluğunda organel genomu bulunmaktadır. Hücre içerisinde farklı sayılarda bulunabilen halkasal yapıdaki mitokondriyal DNA (mtDNA) 37 gen içermekte olup, solunum zinciri komplekslerinin belirli alt ünitelerini kodlayan 13 polipeptitin yanı sıra, 22 mitokondriyal tRNA ve 2 mitokondriyal rRNA sentezinden sorumludur (42).



Mitokondriler hücre içerisinde endoplazmik retikulum (ER), lizozom, peroksizom, çekirdek, golgi aygıtı gibi organellerle etkileşim içerisinde çalışarak, oksijenli solunum ve yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu gibi biyoenerjetik yollarda ve aminoasit, nükleotit sentezi gibi biyosentetik yollarda merkezi rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, apoptoz, hücrel ROS ve  $Ca^{+2}$  sinyalizasyonu, demir-sülfür (Fe-S) biyogenez ve çekirdek genomunun epigenetik regülasyonu yollarında da işlevsel oldukları bilinmektedir (43-51).

Mitokondrilerin yaşam döngüsü, mitokondriyal biyogenez ile başlayıp, hasarlı mitokondrilerin lizozomlarda sindirilmesi işlemi olan mitofaji ile son bulur. Özellikle enerji ihtiyacının fazla olduğu iskelet kası, kalp kası, nöronlar ve kas-sinir kavşaklarında fazla sayıda olacak şekilde, enerji ihtiyacına göre hücre ve dokularda farklı sayılarda mitokondri bulunmaktadır (52). Hücrenin metabolik ve enerji ihtiyaçlarının yanı sıra, stres durumunda da hücre kaderini belirlemek amacıyla mitokondriyal biyogenez ve mitofaji arasındaki dinamik denge ile mitokondri içeriği belirlenebilir (53, 54). Bu yaşam döngüsünde oldukça dinamik yapıda olan mitokondriler, sürekli olarak füzyon ve fisyon geçirerek farklı morfolojilerde gözlemlenebilirler. Mitokondriyal biyogenez sırasında, mitokondriyal proteom ve mtDNA'nın eşit dağılmasıyla bir mitokondriden iki özdeş sağlıklı mitokondri oluşturulurken; mitokondriyal fisyon mekanizmasında tek bir organelin iki heterojen mitokondriye ayrılması gerçekleşmektedir (55). Mitokondriyal fisyon, artan oksidatif stres, mitokondriyal depolarizasyon ve azalan ATP üretimi ile ilişkilidir (56). Başlangıçta ayrı olan iki mitokondrinin hem iç hem de dış membranlarının koordineli olarak birleşmesi işlemi olan mitokondriyal füzyon ise, mtDNA mutasyonları ve okside olmuş proteinlerin seyreltilmesiyle, biyoenerjetik verimliliği artırarak sınırlı besinlerle bile ATP üretimini korur ve dolayısıyla hücrenin canlılığını korumasını sağlar (57, 58). Başka bir deyişle, mitokondriyal fisyon normal ve hasarlı bileşenleri yavru organellere bölüştürerek hasarlı organelin mitofaji ile seçici olarak ortadan kaldırılmasını sağlayan kritik bir triyaj işlevi gerçekleştirirken; mitokondriyal biyogenez ve füzyon sürekli olarak sağlıklı yavru mitokondriyi onarmak, yenilemek ve mitokondri havuzuna yeniden dahil etmek için çalışır. Fisyon-füzyon döngüsü sağlıklı bir şekilde devam ettiği sürece,

hasarlı organeller uygun şekilde yok edilirken sağlıklı organeller de sürekli yenilenmektedir (59).

## 2.2. Mitokondriyal Protein İmport Mekanizmaları

Mitokondrilerin hücresel işlevlerini yerine getirebilmeleri için organel protein, metabolit, lipit ve nükleotit taşınımının doğru bir şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir. Mitokondriyal transport terimi (*Gene Ontology*- GO:0006839), protein, metabolit, lipit ve nükleotit (DNA, RNA, NAD, FAD vb.) taşınım yollarını kapsamaktadır. Ancak, günümüze kadar en iyi aydınlatılmış ve üzerine en çok çalışılmış olan mekanizma mitokondriyal protein import mekanizması yolağıdır.

Memeli mitokondriyal proteomu, %99'u gDNA tarafından kodlanan yaklaşık 1500 kadar proteinden oluşmaktadır (60). gDNA'dan kodlanan proteinlerin mitokondriye hedeflenmesi dört temel aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada sitozolde serbest ribozomlar tarafından sentezlenen mitokondriyal öncül (prekürsör) proteinler, genel veya spesifik hedefleme faktörleri tarafından tanınır, membrana hedeflenir ve son olarak translokazlar yardımıyla işlev göreceği hedef organel kompartmanına yerleştirilir (61-63). Mitokondriye katlanmamış bir konformasyonda import edilen öncül proteinlerin mitokondri dış membranında bulunan reseptörlere bağlanmasında çeşitli şaperon proteinleri ve katlama faktörleri rol oynamaktadır (64-66). Translokaz kompleksleri ise, farklı görevleri olan ve birçok alt ünitenin bir araya gelerek oluşturduğu devasa yapılardır. Bu alt ünitelerden bazıları öncül proteinleri tanıyan reseptör veya şaperon görevi görürken, bazıları da kompleksin stabilizasyonundan sorumludur (14, 67).

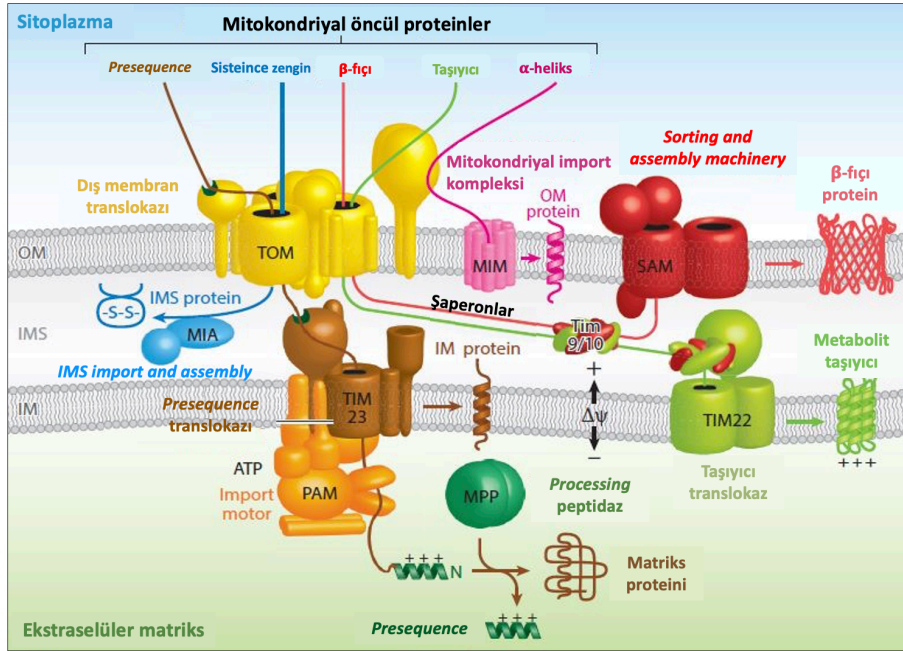
Mitokondriyal öncül proteinler, içerdikleri posta kodu benzeri sinyal dizileri sayesinde organelin farklı kompartmanlarına yönlendirilirler. Mitokondriyal proteinlerin yaklaşık %60'ı, N-terminalinde pozitif yüklü, kesilebilir matriks hedefleme dizisi (*matrix-targeting signal* - MTS) ile sentezlenir (68). *Presequence* olarak da isimlendirilen bu hedefleme dizileri, yaklaşık 8 ila 80 amino asit uzunluğunda olup, negatif amino asit

rezidüleri içermemekte ve serin, treonin gibi bol miktarda hidrosillenmiş rezidüler barındırmaktadır. Bunun yanı sıra, matriks hedefleme dizileri hem pozitif yüklü hem de hidrofobik bölgelere sahip amfipatik alfa ( $\alpha$ ) heliksler oluşturur ve proteinin matrikse importunu kolaylaştırmaktadır. Esas olarak matriks ve iç membran proteinlerinde bulunan bu hedefleme dizilerinin, bazı IMS proteinlerinde ve hatta dış membranda yerleşik olan proteinlerde de mevcut olabildiği saptanmıştır (68-72). İç membranı çok kez geçen proteinlerin büyük bir kısmı ise, özellikle *transporter*'lar ve iç membran translokazlarının temel bileşenleri, N-terminallerinde hedefleme sinyali taşımazlar. Bunun yerine transmembran *domain*lerine yakın olan internal sinyalleri kullanırlar (73). Dış membran proteinleri de matriks hedefleme dizilerinden yoksundur ve mitokondriyi hedeflenmelerini sağlayan heterojen sinyal dizilerine sahiplerdir. Ek olarak, IMS'de yerleşik olan proteinlerinin çoğu düşük moleküler ağırlığa (7-20 kDa) sahiptir ve genellikle sisteince zengin motifler, dolayısıyla disülfit bağları içerirler. Bu motiflerin, IMS proteinlerini membranlar arası boşluğa hedeflenmesi için gerekli ve yeterli olduğu gösterilmiştir (74, 75).

Öncül proteinlerin mitokondriye hedeflenmesine ilişkin literatürde çok sınırlı bilgi bulunmaktadır. Mitokondriyal protein importunun büyük kısmının post-translasyonel olarak *Heat shock proteins 70* (Hsp70) ailesi şaperonları ve bunların kofaktörleri aracılığında gerçekleştiği bilinmekle birlikte, bazı iç membran proteinlerinin de translasyon sırasında mitokondrinin dış membranında lokalize olan mRNA-bağlama faktörü yardımıyla import edildiği rapor edilmiştir (65, 76-78). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, hidrofobik yapıdaki öncül membran proteinlerinin bir kısmının ER yüzeyinde bulunan proteinler yardımıyla mitokondriye hedeflenebildiğine dair kanıtlar sunulmuştur (79).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda organelin farklı kompartmanlarına yerleşecek proteinlerin taşınımı için farklı hedef dizilerini tanıyan 5 ana protein import yolu tanımlanmıştır (Şekil 2.1). Dış membranda bulunan *translocase of the outer membrane* (TOM) kompleksi tüm mitokondriyal proteinler için ana giriş kapısı işlevi

görmektedir. *Presequence*-MTS içeren matriks proteinlerinin büyük çoğunluğu ve iç membran proteinlerinin bir kısmı **TIM23/presequence import yolağı** ile organelere taşınmaktadır. Bu proteinler önce dış membranda bulunan TOM kompleksi ve daha sonra iç membranda yerleşik olan *translocase of the inner membrane* (TIM23) translokaz kompleksi yardımıyla organelere taşınmaktadır (80, 81). Matriks öncül proteinleri ilk olarak, TIM23 kompleksinin Tim21'den bağımsız *presequence translocase-associated motor* (PAM) ile etkileşmesiyle ve ATP-bağımlı Hsp70 yardımıyla matrikse taşınırlar (16, 82). Daha sonra, *mitochondrial processing peptidase* (MPP) tarafından sinyal dizileri kırılır ve olgun protein haline getirilirler (83). *Presequence* içeren iç membran proteinleri de benzer bir yolla TIM23 kompleksinin PAM'den bağımsız olarak Tim21 proteini ile etkileşmesi sonucu membrana yerleşirler. Ancak, kesilmeyen internal sinyal dizileri taşıyan ve iç membranı birçok kez geçen hidrofobik *transporter* proteinler (örn. metabolit *transporter*) ise, önce TOM kompleksi, ardından membranlar arası boşluktaki küçük TIM şaperonları (Tim9/Tim10) ve devamında *carrier*/TIM22 translokazı aracılığıyla membrana yerleştirilmektedir. Bu yolla **carrier/TIM22 yolağı** olarak adlandırılmıştır (84-86).



**Şekil 2.1.** Mitokondride işlevsel olan ve gDNA tarafından kodlanan proteinlerin farklı yollar aracılığı ile organelere taşınması (mitokondriyal import yolları) Wiedemann ve ark.(1)'ndan uyarlanmıştır. Farklı mitokondriyal import yolları, farklı renkteki oklarla belirtilmiştir; kahverengi: *presequence*/TIM23 import yolağı, mavi: MIA yolağı, kırmızı: SAM yolağı, yeşil: *carrier*/TIM22 yolağı, pembe: MIM yolağı.

Mitokondrinin dış membranında işlev gören proteinlerin organelere transportu için iki ana yolak tanımlanmıştır. Bunlardan ilki,  $\beta$ -fiçli yapıdaki öncül proteinlerin önce TOM kompleksi ve küçük TIM şaperonları, ardından *sorting and assembly machinery* (SAM) kompleksi aracılığıyla dış membrana yerleştirilmesini kapsar (**SAM yolağı**) (87). Diğer yolak ise  $\alpha$ -heliks yapıdaki öncül transmembran proteinlerinin *mitochondrial import* (MIM) kompleksi yardımıyla dış membrana yerleştirilmesinden sorumludur (**MIM yolağı**) (88-90).

Öte yandan, birçok membranlar arası boşluk proteini taşıdıkları karakteristik sisteince zengin motifleri sebebiyle TOM kompleksi ve *mitochondrial import and assembly* (MIA) proteinleri yardımıyla membranlar arası boşluğa yönlendirilirler. Bu yolak da **MIA yolağı** olarak bilinmektedir (91, 92).

Bunun yanı sıra, mitokondriyal genom tarafından kodlanıp organel matriksindeki ribozomlarda sentezlenen iç membran proteinleri ise, *oxidase assembly* (OXA) translokazı yardımıyla iç membrana yerleştirilirler (93).

### 2.3. Mitokondriyal Protein İmport Hataları ile İlişkili Hastalıklar

Mitokondrilerin işlevlerini yerine getirebilmeleri için gDNA tarafından kodlanan proteinlerin organelle transportunun hatasız gerçekleştirilmesi kilit rol oynamaktadır. Mitokondriyal protein transport hatalarının kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve multisistemik hastalıklar gibi birçok farklı hastalığın patogeneğinde primer veya sekonder olarak rol oynadığı bilinmektedir.

Primer mitokondriyal protein import hataları, proteinlerin organelle hedefleme dizilerindeki veya mitokondriyal importta görevli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (3-7). Mitokondriyal enerji metabolizmasında görevli olan pirüvat dehidrogenaz E1 alfa (*PDHA1*) geninin mitokondriyal hedefleme dizisindeki tek nükleotit değişiminin ilgili proteinin mitokondriye transportunu azalttığı ve pirüvat dehidrogenaz eksikliği fenotipine yol açtığı gösterilmiştir (7). Bunun yanı sıra, mitokondriyal membranlar arası boşlukta görevli küçük şaperon protein kodlayan *TIM8A* genindeki mutasyonlar TIM23 import yolağının aksamasına yol açmakta ve nadir, ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olan sağırılık-distoni-optik nöronopati sendromuna sebep olmaktadır (6). Ek olarak, *DnaJ Heat Shock Protein Family Member C19 (DNAJC19-TIMM14)* genindeki mutasyonlar ise yine TIM23 yolağını negatif yönde etkileyerek ataksi ve dilate kardiyomyopati fenotipini oluşturmaktadır (3, 5). TIM22 kompleksinin alt ünitelerinden biri olan Açılgliserol kinaz (AGK) enzimini kodlayan gendeki mutasyonlar ise mitokondriyal hastalıklardan biri olan Sengers sendromu ile ilişkilendirilmiştir (4).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, primer mitokondriyal protein import hataları dışında, farklı genetik temelleri olan birçok nörodejeneratif hastalıkta sekonder olarak mitokondriyal protein importunun etkilendiği görülmektedir. Alzheimer hastalarına ait

post-mortem beyin dokularında *truncated* amiloid prekürsör proteinin (APP) TOM40 ve TIM23 proteinleri ile kompleks oluşturarak mitokondriyal import kanallarında biriktiği ve organel protein importunu bozduğu tespit edilmiştir (8). Bu çalışmada Alzheimer hastalığının patogenezindeki sekonder mitokondriyal hasarın aydınlatılması yolunda önemli bir adım atılmıştır. Ek olarak, Parkinson hastalığında ise post-translasyonel modifikasyona uğramış  $\alpha$ -sinüklein proteininin TOM20 translokazına bağlanarak onun TOM22 ile etkileşimini bozduğu ve mitokondriyal protein importunu engellediği saptanmıştır (9). Diğer taraftan Huntington fare modelinde pre-semptomatik dönemde, mutant huntingtin (HTT) proteininin TIM23 kompleksi ile etkileşime girerek mitokondriyal importu negatif etkilediği görülmüş ve bu mitokondri patolojisinin hastalığın erken evrelerinde ortaya çıktığı için tedavi hedefi olabileceği öne sürülmüştür (94).

#### 2.4. Nöromusküler Hastalıklarda Mitokondri Hasarı

Mitokondriyal hastalıklar, mtDNA veya gDNA'daki mutasyonlara bağlı olarak organel yapı ve işlevinin bozulmasından kaynaklanan, genetik olarak aktarılan ve çoklu sistem bozukluklarının görüldüğü heterojen bir hastalık grubudur (95). Solunum zincirinde, transportta, sinyal iletiminde, protein yerleşiminde veya dinamik mitokondriyal ağının füzyon/fisyon mekanizmalarında görevli proteinleri kodlayan genlerde mutasyon görülebilir (96). Ek olarak, taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) kodlayan genlerdeki ve organel genomunun kodlamayan bölgelerindeki (örn. mtDNA D-loop) mutasyonlar da mitokondriyal hastalıklara neden olabilir (95). Ancak, sıklıkla OXPHOS mekanizmasında görevli mitokondriyal proteinleri kodlayan genlerde mutasyonlar görülmektedir (96). Mitokondriyal hastalıklar çoğunlukla enerji ihtiyacı yüksek olan kas ve sinir dokularını etkilemekle birlikte herhangi bir organ veya dokuyu da etkileyebileceği bilinmektedir (97).

Mitokondriyal patofizyolojiyi tanımlamak için “**Primer ve sekonder mitokondriyal hastalıklar**” terimleri kullanılır. Primer mitokondriyal hastalıklar, bir başka deyişle primer

mitokondriyal solunum zinciri hataları (mitokondriyal miyopatiler), oksidatif fosforilasyonda ve bu sürecin düzenlenmesinde görevli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (96, 98). Sözkonusu genlerden 13 tanesi mtDNA'da bulunduğu için maternal kalıtım göstermekte, geriye kalan ve günümüze kadar mitokondri ile ilişkisi tanımlanmış 300 kadar gen ise gDNA'da bulunduğu için ilişkili olduğu hastalık grupları otozomal kalıtım paternine uyum göstermektedir (99). Öncelikli olarak iskelet kası ve sinir sistemi bulguları ile karakterize olan, pleiotropik ve multisistemik semptomlar görülen bu hastalık grupları, direkt organel işlevi ile ilişkili olduklarından, mitokondri işlev ve morfoloji kaybı bu hastalıklarda beklenen bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Primer mitokondri hastalıklarının büyük çoğunluğunda (*Chronic progressive external ophthalmoplegia* (CPEO), *mitochondrial encephalomyopathy lactic acidosis stroke-like episodes* (MELAS), *myoclonus epilepsy ragged-red fibers* (MERRF), Koenzim Q10 eksikliği, timidin kinaz 2 eksikliği, *Kearns-Sayre* sendromu) miyopati bulguları gözlenmektedir.

Sekonder mitokondriyal hastalıklar ise, mitokondri işlevi ile direkt ilişkilendirilemeyen, farklı genetik ve/veya çevresel etmenlere bağlı olarak ortaya çıkan hastalıklar gurubudur. Kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi birçok farklı hastalığın mitokondriyal işlev ve morfoloji kaybı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu grupta yer alan hastalıklar, mitokondriyal işlevleri düzenleyen yollardaki değişimlerden veya oksidatif stresi artırıp hastalıkların klinik seyrini kötüleştirerek sekonder mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açabilen faktörlerden kaynaklanabilmektedir (95, 98). Primer mitokondriyal hastalıklar dışındaki genetik ve patolojik olarak farklı birçok nöromusküler hastalıkta da (örn. *Duchenne* Müsküler Distrofi (DMD), Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi (KMD), Spinal müsküler atrofi (SMA) ve Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS)) ortak bir bulgu olarak iskelet kasında mitokondri hasarı (anormal mitokondri morfolojisi, düşük membran potansiyeli, azalmış ATP üretimi ve reaktif oksijen türleri (ROS) artışı) gözlenmektedir (21-28).



X'e bağı resesif kalıtım gösteren DMD hastalığı (OMIM #310200), Distrofin (*DMD*) genindeki mutasyonlardan kaynaklanan ve kas kaybı ile karakterize, ciddi ilerleyici bir nöromüsküler hastalıktır (100). Hastaların genellikle 2-3 yaş civarında merdiven çıkmada zorluk, paytak yürüyüş ve sık düşme semptomları ile kliniğe başvurdıkları, çoğunlukla 10-12 yaş civarında tekerlekli sandalyeye bağımlı hale geldikleri ve 20 yaş civarında solunum desteğine ihtiyaç duydukları bilinmektedir. İdeal bakımla, DMD'li hastaların çoğu 20 ila 40 yaşları arasında kalp ve/veya solunum yetmezliğinden hayatlarını kaybetmektedirler (101, 102). Distrofin proteinini kodlayan *DMD* genindeki çerçeve kaymasına sebep olan delesyon/duplikasyon tipi mutasyonlar (*out-of-frame*) ve anlamsız mutasyonlar DMD hastalığına sebep olurken; çerçeve kaymasına sebep olmayan (*in-frame*) mutasyonlar ise daha geç başlangıçlı ve daha hafif semptomlarla seyreden Becker müsküler distrofi (BMD) (OMIM #300376) hastalığına sebep olmaktadır (103). Distrofin proteini hücre iskeleti F-aktinini, N-terminal ve C-terminal *domain*leri aracılığıyla ekstraselüler matrikse (ECM) bağlar. Distrofinin üretilmemesi/az üretilmesi, kas lifi membranının aşırı kırılğan ve geçirgen olmasına, kalsiyum homeostazında düzensizliğe ve oksidatif hasara yol açmaktadır. Bu sebeple, yaş ile birlikte kas nekrozu başlar ve kasların rejenerasyon kapasitesinin düşmesiyle de kas dokusunun yerini bağ ve yağ dokusu alır. DMD fare modelinde (*muscular dystrophy X-linked - mdx*) yapılan çalışmalarda subsarkolemmal mitokondri sayısında ve ATP üretiminde azalma saptanmıştır (25, 104-106). *mdx* fare modelinde yapılan diğer çalışmalarda ise, mitokondri dinamiğinde görevli proteinlerin ifadelerinde değişiklik, mitokondri membran potansiyelinde ve mtDNA kopya sayısında azalış, ROS üretiminde artış ve oksidatif stres artışı gözlenmiştir (28, 107). DMD tedavi seçenekleri iki grupta incelenebilir. İlkinde distrofin işlevini düzeltilmesi amacıyla gen (ekzon ve dur kodonu atlanması, genom düzenleme, işlevsel gen ilavesi) ve hücre temelli (protein replasmanı) tedavi seçenekleri bulunurken; ikinci grupta ise, hastalığın patolojik etkilerini (inflamasyon, fibrozis vb.) hedefleyerek kas hasarını geriye döndürmeye yönelik farklı tedavi seçenekleri sunan klinik öncesi ve klinik çalışmalar bulunmaktadır (108). Kas dokusundaki oksidatif stresi azaltmak ve mitokondrinin solunum kapasitesini artırmak

amacıyla da Coenzyme Q10, *Idebenone* ve *N-acetylcysteine* (NAC) gibi ilaçlar sıklıkla kullanılmaktadır (109-111).

Megakoniyal KMD (OMIM #602541) hastalığı, fosfatidilkolin (PC) sentezinde görevli olan Kolin Kinaz Beta (CHKB) enzimini kodlayan gendeki mutasyonlardan kaynaklanan ve otozomal resesif kalıtılan nadir bir nöromüsküler hastalıktır (112-114). Günümüze kadar çoğunluğu Türk olmak üzere yaklaşık 40 hasta rapor edilmiş olup hastaların çoğunda görülen semptomlar; çocukluk/bebeklikte başlayan ilerleyici kas güçsüzlüğü, mental retardasyon, otistik davranışlar, iktiyozis ve kardiyomiyopatidir (112, 115, 116). Hastalıkta fosfatidilkolin eksikliğine bağlı olarak kas liflerinde sarkolemmaya yakın yerleşen aşırı büyük (megakoniyal) mitokondriler görülmektedir (112, 113). Hastalığın fare modelinde (*rostromuscular dystrophy- rmd*) mitokondriyal ATP üretiminin ve mtDNA kopya sayısının azaldığı, ROS üretiminin ve mitofaji seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (117). Bunun yanı sıra, megakoniyal KMD hastalarına ait iskelet kas dokusunda solunum kompleks aktivitelerinde azalış ve krista yapısında bozulmalar olduğu gösterilmiştir (21, 24, 118, 119). Grubumuz tarafından Megakoniyal KMD hastalığına yönelik olarak primer miyoblastlarında yapılan çalışmalarda, mitokondri morfolojisinin ve yerleşiminin bozulduğu, solunum kapasitesinin ve ATP üretiminin azaldığı, nükleotit havuzunun azaldığı ve mitokondriyal fisyonunda görevli temel proteinlerin ifadesinin kontrol hücrelere kıyasla düştüğü tespit edilmiştir (120). Fare modelinde yapılmış olan bir çalışmada adeno-assosiyatif viral 6 (AAV6) vektör ile *Chkb* gen ilavesi ve *Chka* (*Chkb*'nin paralogu) ifadesinin artırılması ile tedaviye katkı sağlanmıştır (121). Başka bir çalışmada ise, fare modelinde mitokondriyal yağ asitlerinin beta oksidasyonunun azaldığı, yağların triaçilgliserolden zengin yağ damlacıkları şeklinde depolandığı ve *peroxisome proliferator-activated receptors* (*Ppars*) ifadelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ppar agonisti ile birlikte kolin verilmesinin mitokondriyal yağ asidi beta oksidasyonunu artırarak yağ damlacığı birikimini önlediği ve *Chka* izoformunun ifadesini artırarak kas hücresi hasarını önlediği öne sürülmüştür (122).

Kollajen VI kas distrofileri, Bethlem miyopati (OMIM# 158810) ve Ullrich konjenital müsküler distrofi (Ullrich KMD: OMIM# 254090), Kollajen tip VI alfa 1, 2 ve 3 genlerindeki (*COL6A1*, *COL6A2* ve *COL6A3*) genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan ilerleyici bir nöromüsküler hastalık grubudur. Ullrich KMD konjenital başlangıçlı şiddetli kas zayıflığı, sıklıkla omuz, dirsek, kalça, diz ve ayak bileği kontraktürleriyle birlikte ambulasyonu sınırlandıran belirgin distal eklem gevşekliği ile karakterize şiddetli, ilerleyici bir hastalıktır. Bethlem miyopati ise genellikle erken çocukluk döneminde, bazen de yetişkinlikte başlayan, proksimal kas zayıflığı ve parmakları, bilekleri, dirsekleri ve ayak bileklerini etkileyen fleksiyon kontraktürleri ile karakterize, hafif ilerleyici bir hastalıktır. Bu hastaların normal bir yaşam beklentisi vardır ancak ileriki yaşamlarında ambulasyon için yardıma ihtiyaç duyabilirler. Bazı mutasyon tiplerinde kollajen VI ifadesi tamamen kaybolurken, diğer mutasyon tiplerinde mutant kollajen VI kas ECM'de bol miktarda bulunur, ancak normal ECM organizasyonu ve kas işlevi için önemli olan protein-protein etkileşimlerini oluşturamaz (123-126). Ullrich KMD fare modelinde (*Col6a1*<sup>-/-</sup>) ve hastalara ait primer miyoblastlarda mitokondri morfolojisinin, krista yapısının ve işlevinin bozulduğu saptanmıştır (27). Hastalığın tedavisine yönelik olarak mitokondri işlev kaybını düzeltmek ve apoptozu baskılamak amacıyla siklosporin A bileşiği ve anti-apoptotik ilaç denemeleri ile düşük protein diyeti uygulaması gibi klinik öncesi ve klinik çalışmalar mevcuttur (127-129).

Özellikle iskelet kası ve nöron gibi yüksek enerji kullanımına gereksinim duyan hücre ve dokularda ATP üretimini maksimum seviyeye çıkarmak için fazla sayıda mitokondri bulunduğu düşünülecek olduğunda, hüresel mikroevredeki bilinmeyen etmenlere bağlı olarak organel seviyesinde gözlenen işlev ve morfoloji kaybının, farklı nöromüsküler hastalıkların patogeneze etki eden ortak bir faktör olduğu düşünülebilir.

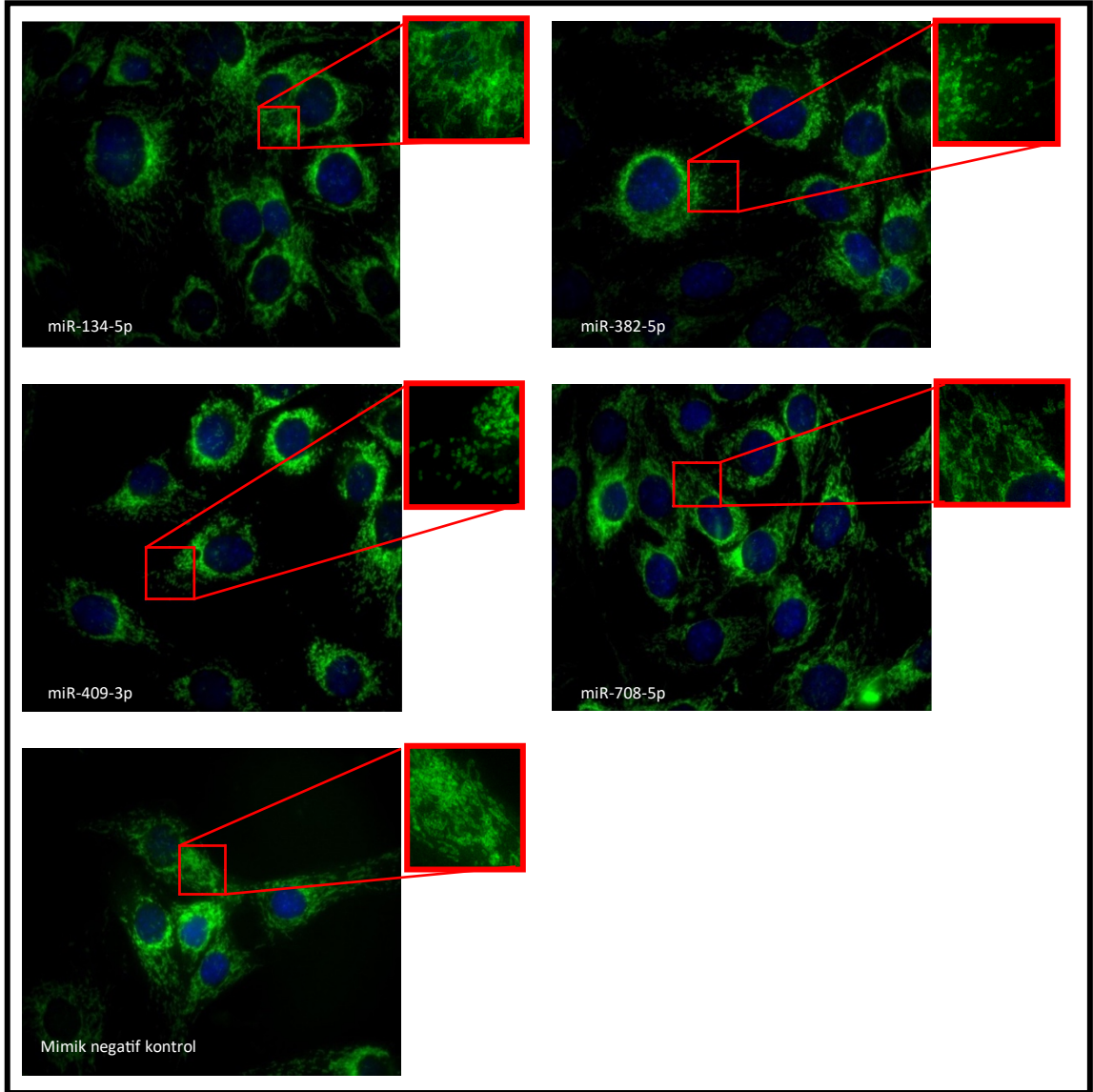
## 2.5. Mitokondri Hasarı ile İlişkili Nöromusküler Hastalıklar ve Mitokondriyal Protein İmport Mekanizması Hasarı İlişkisi

Primer mitokondriyal solunum zinciri hataları (mitokondriyal miyopatiler) dışında genetik ve patolojik olarak farklı birçok nöromusküler hastalıkta ortak bir bulgu olarak mitokondriyal hasar gözlenmekte olup, bu hasarın sebebi net olarak aydınlatılmamıştır. Son yıllarda, mikro RNA (miRNA)'ların, hücredeki fizyolojik ve patolojik süreçlerde mitokondri işlevinin regülasyonunda önemli rolleri olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir (130). Grubumuz tarafından Hacettepe Üniversitesi Kapsamlı BAB Projesi (Proje no: TSA-2017-14413) dahilinde yapılan bir çalışmada, farklı nöromusküler hastalıklarda gözlenen mitokondriyal hasarın (21-28) düzenlenmesinde görevli ortak miRNA'ların tanımlanması ve potansiyel rollerinin araştırılması amacıyla miRNA mikrodizin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmamızda, birbirinden farklı işlevleri olan proteinleri kodlayan farklı nükleer genlerin sorumlu olduğu nöromusküler hastalıklardan; DMD, Megakoniyal KMD, Ullrich KMD ve alfa-distroglikanopati etiyopatogenezinde gözlenen mitokondriyal hasar ile ilişkili ortak miRNA biyobelirteçleri tanımlanmış olup, 17 miRNA'nın analiz edilen tüm hasta gruplarında, kontrol örneklerle kıyasla, ifade değişikliği gösterdiği saptanmıştır. *Gene Ontology*- 'Biyolojik Süreç' kategorisinde terim zenginleştirme analizi sonuçlarına göre, 17 miRNA içerisinde 8 tanesinin potansiyel hedef genlerinin mitokondriyal protein importu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (29) (Şekil 2.2). Proje devamında C2C12 fare miyoblast hücre hattı kullanarak yapmış olduğumuz işlevsel analizlerle; farede korunduğu bilinen dört öncelikli aday miRNA'nın arttırılmış ifadelerinin doğrudan mitokondri işlevi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hasta gruplarındaki miRNA artışını taklit etmek amacıyla, aday miRNA'lar (miR-134-5p, miR-708-5p, miR-382-5p ve miR-409-3p) C2C12 fare miyoblastlarına transfekte edilmiş ve mitokondriyal morfoloji/ işlev analizleri (mitokondri dinamiği/morfolojisi analizi, MTT-metabolik aktivite analizi ve ATP üretimi analizi) gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda, kas hücrelerinde artmış miR-382-5p ve miR-409-3p ifadesinin ATP üretiminde azalışa ve mitokondri ağ yapısında bozulmaya

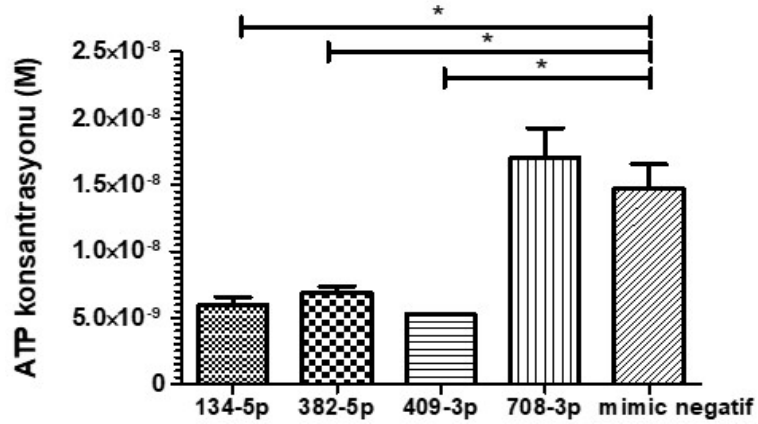
sebebi olduğu gösterilerek, bu miRNA'lardaki ifade artışının direkt olarak mitokondri hasarına neden olduğu doğrulanmıştır (Şekil 2.3 ve 2.4) (yayınlanmamış veri).



**Şekil 2.2.** Nöromusküler hastalık grupları ve kontroller arasında ifade farklılığı gösteren miRNA'ların mitokondriyal hedef genlerinin *Gene Ontology* - 'Biyolojik Süreç' kategorisinde terim zenginleştirme analizi sonuçları. Çubuk grafikler p değerine göre sıralanmıştır ( $p < 0.05$ ). Daha uzun ve daha açık renkli çubuklar, gen kümesi/teriminin daha anlamlı olduğunu ifade etmektedir.



**Şekil 2.3.** C2C12 hücrelerine miRNA mimik (hsa-miR134-5p, hsa-miR382-5p, hsa-miR409-3p ve hsa-miR708-5p) transfeksiyonları sonrası yapılan mitokondri morfoloji analizi görüntüleri (FITC: Tom20 /mitokondri, Mavi: DAPI/çekirdek). 63X büyütme. (yayınlanmamış veri)



**Şekil 2.4.** C2C12 hücrelerine miRNA mimik (hsa-miR134-5p, hsa-miR382-5p, hsa-miR409-3p ve hsa-miR708-5p) transfeksiyonları sonrası yapılan ATP miktar tayini sonuçlarının grafiksel olarak gösterimi. Deneyler her bir miRNA için üçer kez tekrar edildi ve tüm sonuçlar birlikte analiz edildi. Veriler istatistiksel olarak Mann-Whitney U Testi ile analiz edildi (\* $p < 0.05$ ). (yayınlanmamış veri)

Grubumuz tarafından Megakoniyal KMD hastalığına yönelik olarak primer miyoblastlarda gerçekleştirmiş olduğumuz bir başka çalışmada ise, immünfloresan (IF) boyamalar ile mitokondri morfolojisinin, yerleşiminin ve dinamik ağ yapısının bozulduğu, *Western Blot* ve IF boyamalar ile mitokondriyal fisyonunda görevli temel proteinlerin (Drp1, Mff, Fis1) ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı [sırasıyla 3.6 (\*\* $p < 0,0001$ ), 2.1 (\*\* $p < 0,0001$ ) ve 3 kat (\*\* $p < 0,0025$ )] ve metabolomik analizlerle hastalara ait hücrelerde sitrik asit döngüsü bileşenlerinin ve ATP üretiminin azaldığı (\*\* $p < 0.01$ ) sonucuna ulaşılmıştır (120).

Mitokondriyal hasarın hastalıklardan bağımsız olarak incelendiği temel makalelerde, mitokondriyal protein importu ile organel morfolojisinin sıkı etkileşim içerisinde olduğu bildirilmiştir. Mitokondri membranında yer alan birçok protein dual rol oynayarak hem organel morfolojisinin hem de protein importunun düzenlenmesine katkı sağlamaktadır (11-14). Dış membranda yerleşik olan mitokondriyal morfoloji proteini 10 (Mdm10), SAM kompleksinin oluşmasında görevli olmasının yanı sıra, mutant formu

anormal şekilde iri mitokondri morfolojisine sebep olmaktadır (14). Ek olarak, TIM23 kompleksine katılan Tim17 ve Tim44 protein ifadelerindeki azalışın da hem mitokondriyal protein importunu hem de morfolojisini etkilediği gösterilmiştir (13). Dolayısıyla, mitokondriyal hasarın saptandığı hastalık gruplarında protein importunun da etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir.

Mitokondriyal protein importunun düzenlenmesinde rol oynayan faktörlerden biri de mitokondriyal membran potansiyelidir. Mitokondriyal matriks kısmının negatif yüklü olması elektroforetik etki yaratarak, N-terminalinde *presequence*-MTS içeren proteinlerin TIM23 aracılı transport sürecini hızlandırıcı etki göstermektedir (18). Aynı zamanda hem TIM22 hem de TIM23 kanal proteinleri voltaj bağımlı olarak aktifleştikleri için, mitokondriyal membran potansiyelindeki bozulmanın protein importunu negatif yönde etkileyebileceği öngörülmektedir (19, 20).

ATP üretimi ve mitokondriyal protein importu da karşılıklı olarak birbirini etkileyen iki biyolojik yolaktır. Mitokondriyal protein importu için ATP'ye ihtiyaç duyulmasının yanı sıra, ATP üretimi için gerekli solunum zinciri proteinlerinin membrana yerleşimi için de protein importunun doğru bir şekilde gerçekleşmesi gerektiği bilinmektedir (15-17). Schneider ve ark. (131) tarafından 1994 yılında yapılan bir çalışmada *presequence*-MTS içeren matriks proteinlerinin sekonder olarak ATP bağımlı taşındıkları rapor edilmiştir. Öte yandan, TIM23 kompleksine katılan Tim21 proteininin solunum zinciri komplekslerinden kompleks III ve IV ile fiziksel etkileşimde olduğu ve protein importu için ATP gerekliliği gösterilmiştir (132). Liu ve ark. (15)'nin 2018 yılında yaptığı bir çalışmada ise, Tom40 ifadesi baskılanmış hücrelerde ATP miktarının azaldığı ve ROS miktarının arttığı gösterilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkılarak hücrel ATP azalışının mitokondriyal protein importunu negatif yönde etkilediği düşünülmektedir.

Mitokondriyal membran lipitlerinin miktarı ve yerleşiminin de, translokaz komplekslerinin doğru yerleşimini ve stabilizasyonunu etkilediği bilinmektedir (31). Membran lipitlerinin biyogenezinden ve modifikasyonlarından sorumlu enzimlerdeki mutasyonlar protein import hatalarına yol açmaktadır. Mitokondri membranına özgül



kardiyolipinin yeniden modellenmesinde görevli enzimi kodlayan Tafazzin (*TAZ*) genindeki mutasyonlarının protein import sürecinde aksamalara sebep olduğu ve kardiyomiyopati, iskelet kası güçsüzlüğü ve nötropeni tablosu ile seyreden Barth sendromuna yol açtığı saptanmıştır (133, 134). Ek olarak, mitokondriyal membranlarda en bol bulunan lipit olan PC eksikliğinin TIM23 ve SAM komplekslerinin stabilizasyonunu bozduğu gözlenmiştir (32, 33). Bu nedenle Megakoniyal KMD hastalığında mitokondriyal protein importunun etkilenebileceği öngörülmektedir (32).

Tüm ön verilerimiz ve literatür bulguları beraber değerlendirildiğinde, nöromüsküler hastalıkların patogeneğinde sekonder bir bulgu olarak gözlenen mitokondri hasarının bozulmuş mitokondriyal protein importu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda tez çalışması kapsamında; omik teknolojileri, hücre kültüründe işlevsel analizler ve biyoinformatik analizler yardımıyla, farklı genetik kökenleri olan ancak ortak bulgu olarak sekonder mitokondri hasarı gözlenen farklı nöromüsküler hastalıkların (DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD) patogeneğine mitokondriyal protein import mekanizmasının olası etkisi araştırılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

Tez kapsamında yapılacak çalışmalar için, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (Tarih: 31.03.2020, Proje No: GO 20/286, Karar No: 2020/07-12) alınmıştır (Bkz. EK-1). Tez çalışmasında, Avrupa Nadir Hastalıklar Biyobankası (*EuroBioBank*) ağı üyelerinden olan ‘Londra-Nöromusküler Hastalıklar Merkezi Biyobankası (*MRC CNMD Biobank London, Dubowitz Neuromuscular Unit, Institute of Child Health*)’ndan ‘Biyolojik Materyal Transfer Antlaşması’ ile temin edilen DMD, Ullrich KMD, Megakoniyal KMD hastalarına ve kontrol bireylere ait primer miyoblastları kullanılmıştır. Çalışma kriterlerimize uygun olarak desmin ifadesi ve farklılaşma kapasitesi yüksek olan hücreler arasından seçilen hücelere ait biyobanka numaraları, bireylerin biyopsi yaşı, cinsiyetleri ve sorumlu gen mutasyonları Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Tez kapsamında çalışılan primer miyoblastlara ait bilgiler

Primer miyoblastlar	No	Hücre ID	Mutant Gen	Mutasyon	Yaş	Cinsiyet	Pasaj no
Ullrich KMD	1	7034	<i>COL6A2</i>	c.955-2A>G ( <i>splice site</i> mut)	2	E	P4
	2	7217	<i>COL6A3</i>	Het c.6130G>A	4	E	P3
DMD	1*	6311	<i>DMD</i>	Ekzon 45-52 delesyonu	2	E	P5
	2	NH11-1463A	<i>DMD</i>	Ekzon 48-54 delesyonu (çerçeve dışı)	4	E	P3
	3	NH14-1259A	<i>DMD</i>	Ekzon 45-52 delesyonu (tahmini çerçeve dışı)	1	E	P3
Megakoniyal KMD	1	NH10-1412A	<i>CHKB</i>	c.722A>G	2	E	P3
Kontrol	1	8063	<i>MYO7A</i>	Het c.2904G>T (Usher sendromu tip 1)	2	E	P3
	2	NH11-1462A			4	K	P4

\*Bu hücre tez çalışması başladıktan sonra çalışma grubundan çıkarılmıştır.

### 3.1.1. Hücre Kültürü

- *Skeletal Muscle Cell Growth Medium* (PromoCell)
- *Skeletal Muscle Cell Growth Medium Supplement Mix* (PromoCell)
- C2C12 fare miyoblast hücre hattı (ATCC)
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), yüksek glikoz ve stabil glutaminli (Biowest)
- *Medium 199*, Earle tuzları ve l-glutaminli (BioWest)
- Fetal Dana Serumu (FBS) (Biowest)
- L-glutamin, 200 mM (Biowest)
- At Serumu (Biowest)
- Tripsin/ Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) Solüsyonu (Biowest)
- 1x Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS), pH 7,4 (Sigma)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Applichem)
- İnsülin (Sigma)
- Hücre proliferasyonunu sağlayan hücre kültür ortamı (100 ml):
 

<i>Skeletal Muscle Cell Growth Medium</i>	: 94 ml
<i>Skeletal Muscle Cell Growth Medium Supplement Mix</i>	: 5 ml
2 mM L-glutamin	: 1 ml
- Hücre farklılaşmasını sağlayan hücre kültür ortamı (100ml):
 

<i>Medium199</i>	: 19,6 ml
DMEM	: 78,4 ml
At serumu (%2)	: 2 ml
İnsülin (10µg/ml)	: 100 µl
- Hücre dondurma ortamı:
 

%90 FBS	
%10 DMSO	
- Trinoküler Floresan Ataçmanlı *Inverted* Mikroskop (Leica DMIL)

### 3.1.2. Rekombinant Gen İfade Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması

- Plazmid vektör: pcDNA3/mito-GFP
- Sıvı Bakteri Besiyeri (*Lysogeny Broth (LB) Medium*), pH 7,0 (1L):
 

Trypton (Applichem)	: 10 g
Maya özütü (Applichem)	: 5 g
Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)	: 5 g
- Katı Bakteri Besiyeri (1 L):
 

Trypton (Applichem)	: 10 g
Maya özütü (Applichem)	: 5 g
NaCl (Sigma)	: 5 g
Agar (Sigma)	: 15 g
Ampisilin (100 mg/ml) (Gibco)	: 1 ml
- Midi-prep plazmid saflaştırma kiti (Qiagen)
- Mini-prep plazmid saflaştırma kiti (GeneAll)
- *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* DNA Dizileme Kiti (Applied Biosystems)
- Hi-Di Formamid (Applied Biosystems)
- Sodyum Asetat (NaOAc) (Sigma)
- DNA Dizi Analizi Cihazı (*Applied Biosystems ABI 3110 Genetic analyzer*)
- *NanoDrop™ 1000* spektrofotometre (Thermo Scientific)
- ACO2 geni mitokondriyal sinyal dizisi için kullanılan DNA dizileme primeri:
 

5'- GAACCCACTGCTTACTGGCT-3'

### 3.1.3. Transfeksiyon

- P2 *Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit L* (Lonza)
- 16 kuyucuklu *Nucleocuvette* stripleri (Lonza)
- Lipofektamin 3000 (Thermo Scientific)
- *OptiMEM Reduced Serum Medium, no Phenol Red* (500 mL) (Gibco)

- Hsa-miR-382-5p, mirVana® miRNA mimic (Ambion)
- Hsa-miR-409-3p, mirVana® miRNA mimic (Ambion)
- miRNA Mimic, *Negative Control #1* (Ambion)
- Antimisin A (Sigma)
- *4D-Nucleofector* Sistemi (Lonza)

### 3.1.4. İmmüfloresan Boyama

- 1x Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS), pH 7,4 (Sigma)
- %4 Paraformaldehit / 1x PBS, pH 7,2-7,4 (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- Tween 20 (Sigma)
- Dana Serum Albümini (BSA), 0,1 g/ml (Sigma)
- Keçi Serumu
- DAPI'li *Prolong Gold Antifade* Kaplama Solüsyonu (Molecular Probes)
- Permeabilizasyon solüsyonu : %0,2 TritonX-100 / 1x PBS
- Bloklama solüsyonu : %0,1 Tween20 / 1x PBS içerisinde %1 BSA
- Antikor sulandırım solüsyonu : %0,1 Tween20 / 1x PBS içerisinde %1 BSA
- Primer Antikorlar:
  - Tavşan monoklonal Anti-Tom20 (Cell Signaling Technologies, 42406) (1:100)
  - Tavşan poliklonal Anti-Tom20 (Santa Cruz Biotechnology, sc-11415) (1:100)
  - Tavşan poliklonal Anti- SLC25A4 (Cell Signaling, 69569) (1:100)
- Sekonder antikorlar:
  - Keçi Anti Tavşan AF568 (Molecular Probes) (1/500)
  - Keçi Anti Fare AF488 (Molecular Probes) (1/500)
  - Keçi Anti Tavşan AF488 (Molecular Probes) (1/500)
  - Keçi Anti Fare AF568 (Molecular Probes) (1/500)
- Carl-Zeiss Axioplan 2 floresan mikroskobu

- Trinoküler Floresan Ataçmanlı *Inverted* Mikroskop (Leica DMIL)
- Zeiss Multifoton mikroskop sistemi (LSM 980 Dual Line NLO system)
- Fiji 2.9.0 / 1.54f (135)

### 3.1.5. Mitokondriyal fraksiyonun ayrıştırılması ve protein izolasyonu

- Modifiye Sukroz-Tris-MgCl<sub>2</sub> (STM) tamponu:
 

Sukroz (Sigma)	: 225 mM
Mannitol (Roquette)	: 75 mM
3-(N-Morfolino)propan sülfonk asit (MOPS) (Sigma)	:10 mM, pH 7,2
Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (Sigma)	: 1 mM
Proteaz inhibitör kokteyli (Roche)	: 1 tablet/10 ml
Fosfataz inhibitörü (Sodyum ortovanadat) (Sigma)	: 1mM
- Hipertonik tampon:
 

Sükroz (Sigma)	: 1.25 M
MOPS (Sigma)	: 10 mM, pH 7,2
Proteaz inhibitör kokteyli (Roche)	: 1 tablet/10 ml
Fosfataz inhibitörü (Sodyum ortovanadat) (Sigma)	: 1mM
- Hipotonik tampon:
 

Sükroz (Sigma)	: 100 mM
MOPS (Sigma)	: 10 mM, pH 7,2
EGTA (Sigma)	: 1 mM
Proteaz inhibitör kokteyli (Roche)	: 1 tablet/10 ml
Fosfataz inhibitörü (Sodyum ortovanadat) (Sigma)	: 1mM
- SOL tamponu:
 

Tris-Hidroklorür (HCl) (Appllichem)	: 50mM, pH 6,8
EDTA (Sigma)	: 1mM
Triton X-100 (Sigma)	: % 0,5

Proteaz inhibitör kokteyli (Roche)	: 1 tablet/10 ml
Fosfataz inhibitörü (Sodyum ortovanadat) (Sigma)	: 1mM

- *Dounce* homojenizatör (2,5 ml)
- Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 16 R)

### 3.1.6. Total protein izolasyonu

- Protein izolasyon tamponu (pH 7,4):

Trizma-baz (Applichem)	: 10 mM
NaCl (Sigma)	: 300 mM
EDTA (Sigma)	: 2 mM
Triton-X-100 (Sigma)	: % 0,5
Proteaz inhibitör kokteyli (Roche)	: 1 tablet/10 ml

- Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 16 R)

### 3.1.7. Protein miktar tayini

- *Bicinchoninic Acid* (BCA) Protein Assay Kit (Pierce™)
- *SpectraMax* M2 Mikroplaka Okuyucu (Molecular Devices)

### 3.1.8. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

- %14'lük ayırıcı jel (8 ml):

%40 Akrilamid / bisakrilamid (Applichem)	: 2,8 ml
1,5 M Tris (pH 8,8) (Applichem)	: 2 ml
%10 SDS (Carlo Erba)	: 0,08 ml
%10 amonyum persülfat (APS) (Sigma)	: 0,08 ml
TEMED (Sigma)	: 0,008 ml
Distile su	: 3 ml

- %4'lik toplayıcı jel (5ml):
 

%40 Akrilamid / bisakrilamid (Applichem)	: 0,5 ml
0.5 M Tris (pH 6,8) (Applichem)	: 1,25 ml
%10 SDS (Carlo Erba)	: 0,05 ml
%10 amonyum persülfat (APS) (Sigma)	: 0,05 ml
TEMED (Sigma)	: 0,005 ml
Distile su	: 3,1 ml

### 3.1.9. Western Blot

- Mini Protean II elektroforez seti (Bio-Rad)
- 4X Laemmli yükleme tamponu (Bio-Rad)
- *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (10,000-260,000 Da)* (Sigma)
- Yürütme tamponu (pH 8,3) (1L):
 

Trizma baz (Sigma)	: 3,02 g
Glisin (Sigma)	: 14,4 g
SDS (Carlo Erba)	: 1 g
- Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad)
- Polivinilidin Florür (PVDF) membran (0,45 µm) (Thermo Scientific)
- *Whatmann* filtre kâğıdı
- Bovine Serum Albumin tozu (Sigma)
- Tween-20 (Amresco)
- Yağsız süt tozu (Pınar)
- İzopropil alkol (%99,7) (Sigma)
- Yarı kuru transfer tamponu (pH 8,3) (1L):
 

Trizma baz (Sigma)	: 3,03 g
Glisin (Sigma)	: 14,4 g
Metanol (Applichem)	: 200 ml
- Yıkama tamponu (1xTBS-T) (pH 7,4) (1L):



20mM Trizma baz (Sigma)	: 2,42 g
NaCl (Sigma)	: 8 g
%0,2 Tween-20 (Sigma)	: 0.5 ml

- Bloklama tamponu:

Yağsız süt tozu/BSA	: 0,5 g
%0,2 1xTBS-T	: 10 ml

- Primer antikorlar:

Tavşan poliklonal Anti-SLC25A6 (ProteinTech, 51031-1-AP) (1:600)
Tavşan poliklonal Anti-PMPCB (ProteinTech, 16064-1-AP) (1:600)
Tavşan poliklonal Anti-MRPL3 (ProteinTech, 16584-1-AP) (1:600)
Tavşan poliklonal Anti- SLC25A4 (Cell Signaling, 69569) (1:600)
Fare monoklonal Anti-SPG7 (Invitrogen, MA5-25909) (1:600)
Tavşan monoklonal Anti- TOM20 (Cell Signaling, 42406) (1:1000)
Fare monoklonal Anti-GAPDH (Sigma, G8795) (1:5000)
Tavşan poliklonal Anti-Histon H3 (Cell Signaling, 9715)
Fare monoklonal Anti- $\beta$ tubulin (Sigma, T5201)

- Sekonder antikorlar:

Keçi Anti-Tavşan IgG (H+L) *Cross-Adsorbed* HRP konjuge (Invitrogen)  
(1:5000)

Keçi Anti-Fare IgG (H+L) *Cross-Adsorbed* HRP konjuge (Invitrogen) (1:5000)

- *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific)
- GeneGnome5 kemilüminesans görüntüleme cihazı (Syngene)

### 3.1.10. Proteomik Analizler

- *FASP Protein Digestion Kit* (Abcam)
- *Qubit 4 Fluorometer* (Invitrogen)
- Formik asit (HPLC kalitesinde) 98% - 100% (Sigma)
- 0.1% Formik asit (HPLC kalitesinde) (Sigma)

- Trifloroasetik asit (Sigma)
- Asetonitril (HPLC kalitesinde) (Sigma)
- Su (HPLC kalitesinde) (Sigma)
- Metanol (HPLC kalitesinde) (Sigma)
- Acclaim™ PepMap™ C18 HPLC Kolonu (Thermo Scientific)
- *Nano Bore Emitter Stainl. Steel* 40mm OD 1/32 (Thermo Scientific)
- *Dionex Ultimate 3000 Series RSLC* nano-pompa (Thermo Fisher Scientific)
- *Xcalibur 4.0* yazılımı (Thermo Fisher Scientific)
- *Thermo Q-exactive* (Thermo Scientific)
- *LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution* (Pierce)
- *Proteom Discoverer 2.2* (Thermo Scientific)

#### **3.1.11. Total RNA izolasyonu**

- Trizol (Sigma)
- PBS (Sigma)
- Kloroform (Sigma)
- İzopropanol (AppliChem)
- Etanol (Isolab)
- *NanoDrop™ 1000* spektrofotometre (Thermo Scientific)

#### **3.1.12. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)**

- cDNA sentezi: *iScript Reverse Transcription Kit* (Bio-Rad)
- qPCR: *Luna Universal qPCR Master Mix* (NEB)
- *SLC25A4* primerleri:  
*Forward*: 5'- TCGAGAGGGTCAAAGCTGCTG -3'  
*Reverse*: 5'- CACCCCTAAGAAGAGCTGC -3'
- RT-PCR cihazı (BioRad iQ5)

## 3.2. Yöntemler

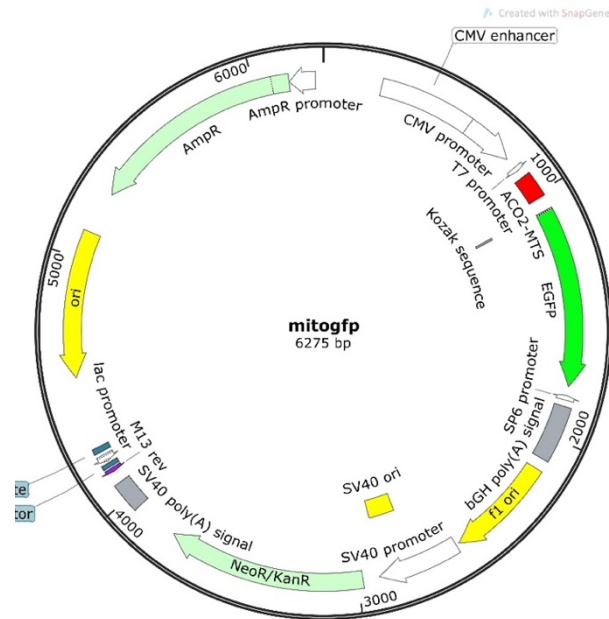
### 3.2.1. Biyobankadan Temin Edilen Dondurulmuş Primer Miyoblastların Kültür Ortamında Açılması ve Pasajlanarak Çoğaltılması

Tez çalışması kapsamında yapılan primer hücre kültürü çalışmalarında, 'Londra-Nöromusküler Hastalıklar Merkezi Biyobankası (*MRC CNMD Biobank London, Dubowitz Neuromuscular Unit, Institute of Child Health*)'ndan getirilmiş olan DMD (n=2), Ullrich KMD (n=2) ve Megakonyal KMD (n=1) hastalarına ait primer miyoblastlar (EuroBioBank) ve kas dokusunda herhangi bir patolojik bulgu saptanmamış kontrol bireylere ait miyoblastlar (n=2) kullanıldı.

- Sıvı azot tankından çıkarılıp, 37°C'de hızla çözülen dondurulmuş hücreler; %5 oranında *supplement* ve 2 mM L-glutamin içeren *Skeletal Muscle Cell Growth Medium* (Promocell) hücre kültür ortamı içinde %80 yoğunluğa ulaşana kadar, %5 oranında CO<sub>2</sub> içeren 37°C'deki etüvde inkübe edilerek çoğaltıldı.
- Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında hücre kültür ortamı çekilerek 1x PBS ile yıkandı.
- Tripsin/EDTA solüsyonu ile 37°C'de 5 dk inkübe edilerek hücreler kaldırıldı.
- Tripsin/EDTA solüsyonununun 3 katı hacimde serum içeren hücre kültür ortamı eklendi ve pipetaj yapılarak tripsin inaktive edildi.
- Hücreler falkon tüpe aktarıldı ve oda sıcaklığında 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Pellet üzerine hücre proliferasyonunu sağlayan hücre kültür ortamı eklendi ve pipetaj yapılarak hücreler pasajlandı.
- Hücreler 1x10<sup>6</sup> hücre/ml dondurma ortamı (%90 fetal dana serumu, %10 DMSO) olacak şekilde dondurularak ileri çalışmalar için sıvı azot tanklarında saklandı.

### 3.2.2. Rekombinant gen ifade vektörünün transfeksiyon için hazırlanması

pcDNA3/mito-GFP plazmidini, Dr. Benjamin Dehay (*University of Bordeaux, France*) tarafından laboratuvarımıza hediye olarak gönderildi. Plazmid Midi-Prep ile izole edilmiş olarak elimize ulaştı. EGFP dizisinin 3' ucuna Aconitase 2 (ACO2) proteinine ait mitokondriyal sinyal dizisi (105 baz çifti) klonlanmış olan vektör kasetinin şeması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. pcDNA3/mito-GFP plazmidinin haritası

#### pcDNA3/Mito-GFP plazmidinin transformasyonu ve tek koloni ekimi

pcDNA3/Mito-GFP plazmidinin çoğaltılması amacıyla *E.coli* (*DH5α*) kompetan hücrelerine transformasyon yapıldı.

- 50 µl kompetan hücre buz üzerinde çözüldü.
- Üzerine 10 ng pcDNA3/Mito-GFP eklenerek 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda bakteriler 42°C'lik su banyosunda 1 dk inkübe edildi.
- Su banyosundan çıkarılan bakteriler bekletilmeden buz üzerine alındı ve 15 dk buzda inkübe edildi.

- 5 ml polisitren tüpe 1 ml antibiyotiksiz LB besiyeri eklenerek 37°C'de ısıtıldı.
- Isıtılan LB-besiyeri üzerine bakteriler eklendi ve 1 saat 37°C'deki çalkalamalı etüvde 250 rpm'de inkübe edildi.
- Polisitren tüp içerisindekiler ependorf tüpe aktararak 8000xg'de 30 sn süreyle santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde kalan az miktarda LB içerisinde pellet çözüldü.
- Önceden 37°C'de ısıtılmış olan ampisilinli LB-agar katı besiyerine steril cam boncuklar yardımıyla ekim yapıldı.
- 16-18 saat 37°C'deki etüvde inkübe edildi.

#### **Sıvı besiyerine ekim ve transforme hücrelerin çoğaltılması**

- İnkübasyon sonrası ampisilin direnç özelliğine göre tek koloniler seçildi.
- 37°C'de ısıtılmış olan antibiyotikli LB besiyerine steril beyaz pipet ucu yardımıyla alınan koloniler (herbiri ayrı tüplere olacak şekilde) eklendi.
- Plazmid saflaştırması için sıvı besiyerine ekilen koloniler 16-18 saat 37°C'de C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi.

#### **Mini-Prep plazmid saflaştırması**

Mini-prep plazmid saflaştırma kiti (*GeneAll Exfection Plasmid LE Mini Kit*) yardımıyla üreticinin talimatları doğrultusunda plazmid izolasyonu yapıldı.

- Çoğalan bakteriler ependorf tüplere aktarıldı ve 10.000xg'de 5 dk santrifüj yapıldı.
- Hücre pelletleri üzerine 250 µl P1 solüsyonu eklendi ve pipet yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra, farklı bir tüpe aktararak o tüpteki hücre pelletinin de çözülmesi sağlandı. Bu şekilde ependorf tüplere bölünen hücre pelletleri birleştirilmiş oldu.
- Hücre süspansiyonu üzerine 250 µl P2 solüsyonu eklendi ve tüpler 4 kez alt üst edilerek, en fazla 5 dk olacak şekilde oda sıcaklığında inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrası tüplerine 350 µl G3 solüsyonu ilave edilen tüpler alt üst edildi ve oda sıcaklığında 18.000xg'de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatant rezin bağlı SV kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında 18.000xg'de 1 dk santrifüj yapıldı.
- Kolona bağlanan plazmid DNA'sını izole etmek amacıyla, kolon yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 600 ve 700 µl olacak şekilde iki kez etanol içeren EW1 ve EW2 yıkama solüsyonları eklendi ve 18.000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 30 µl EF elüsyon solüsyonu ilave edildi. 18.000xg'de 1 dk santrifüj sonrası, kolondan tüpe geçmiş olan plazmid DNA'sının konsantrasyonu 260 nm dalga boyunda *NanoDrop 1000* spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

**pcDNA3/Mito-GFP plazmidine klonlanmış olan ACO2 proteinine ait mitokondriyal sinyal dizisinin DNA dizi analizi ile doğrulanması**

300ng plazmid DNA'sı kullanılarak, ACO2 mitokondriyal sinyal dizisi için kullanılan DNA dizileme primeri ve *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)* yardımıyla aşağıdaki protokol izlenerek DNA dizi analizi gerçekleştirildi.

3.1 <i>BigDye Terminator</i> (ABI)	: 2 µl
5x reaksiyon tamponu	: 4 µl
Primer (3.3 pmol/µl)	: 1 µl
Plazmid (100 ng/ µl)	: 3 µl
dH <sub>2</sub> O	: 9 µl

### Reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
94°C	5 dk	1
94°C	15 sn	} 25
50°C	15 sn	
60°C	4 dk	
60°C	1 dk	1

### DNA dizi analizi reaksiyonunun pürifikasyonu

- Reaksiyon ürününün üzerine 2 µl 3M sodyum asetat (NaOAc) ve 60 µl soğuk saf etanol eklendikten sonra karışım 1.5ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.
- Karışım -20°C'de en az 30 dk inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra karışım, oda sıcaklığında 14.000rpm'de 30 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelletin üzerine 200 µl soğuk %70'lik etanol ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı.
- Karışım oda sıcaklığında 14.000rpm'de 30 dk santrifüj edildi ve devamında süpernatant uzaklaştırılarak pellet kurutuldu.
- Pelletin üzerine 20 µl formamid ilave edilerek pelletin çözünmesi sağlandı.
- Örnekler 96 kuyucuklu plakaya aktarılarak, 95°C'de 10 dk denatüre edildi.
- Denatürasyon sonrası plaka buz üzerinde 5 dk bekletildi ve DNA dizi analizi cihazına yüklendi (*Applied Biosystems ABI 3110 Genetic analyzer*).
- DNA dizi analizi sonuçları *Chromas* (versiyon 2.6.5) programı ile analiz edildi.

### Midi-Prep plazmid saflaştırması

Midi-prep plazmid saflaştırma kiti (*Qiagen Plasmid Midi Kit*) yardımıyla üreticinin talimatları doğrultusunda plazmid izolasyonu yapıldı.

- LB besiyeri içinde çoğaltılan bakteriler 50 ml'lik falkon tüpe aktarıldı ve +4°C'de 6000xg'de 15 dk santrifüj yapıldı.
- Supernatan atıldı ve hücre pelleti 4 ml P1 solüsyonunda çözüldü.
- Hücre süspansiyonu üzerine 4 ml P2 solüsyonu eklendi ve tüpler 4 kez alt üst edilerek, en fazla 5 dk olacak şekilde oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası üzerine 4 ml S3 solüsyonu ilave edilen tüpler 4 kez alt üst edildi.
- Filtre kartuşu 50 ml'lik falkon içine yerleştirildi ve örnek filtreye aktarıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- Şırınga pistonu filtreye geçirildi ve yavaşça basınç uygulandı.
- 2 ml BB solüsyonu eklendi ve 4 kez alt üst edildi.
- Spin kolonu vakuma oturtuldu ve kolonun üzerine *tube extender* yerleştirildi.
- Filtrelenmiş hücre lizatı spin kolona yüklendi ve vakum cihazı çalıştırıldı.
- Sıvı akışı biter bitmez vakum cihazı durduruldu.
- Kolona 0.7 ml ETR solüsyonu eklendi ve vakum cihazı çalıştırıldı.
- Ardından kolona 0.7 ml PE solüsyonu eklendi ve vakum cihazı çalıştırıldı.
- Sıvı akışı bitince kolon spin tüpüne aktarıldı.
- 10.000xg'de 1 dk santrifüj yapıldı ve kolon temiz bir tüpe aktarıldı.
- Kolona 0.2 ml elüsyon tamponu eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 10.000xg'de 1 dk santrifüj sonrası kolondan tüpe geçmiş olan plazmid DNA'sının konsantrasyonu 260 nm dalga boyunda *NanoDrop 1000* spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

### **3.2.3. Nükleofeksiyon ile pcDNA3/Mito-GFP Gen İfade Vektörünün Primer Miyoblastlara Transfeksiyonu**

- Antibiyotiksiz hücre kültür ortamında çoğaltılan hücrelerin hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 1x PBS ile yıkandı.



- Hücreler Tripsin/EDTA solüsyonu ile 37°C'de 5 dk inkübe edilerek kültür kabından kaldırıldı.
- Hücreler üzerine, Tripsin/EDTA solüsyonunun 3 katı hacimde serum içeren hücre kültür ortamı eklendi ve pipetaj yapılarak tripsin inaktive edildi.
- 100.000 hücre 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı ve oda sıcaklığında 90xg'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sırasında, tek kuyucuğa 20 µl eklenecek şekilde, 4.5/1 (v/v) oranında *nucleofector* solüsyonu ve *supplement* karıştırılarak nükleofeksiyon karışımı hazırlandı.
- 24 kuyucuklu hücre kültür kabına kuyucuk başına 300 µl boş hücre kültür ortamı eklenerek etüvde bekletildi.
- Santrifüj sonrasında, süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücre pelletinin üzerine her kuyucuk için 20 µl olacak şekilde nükleofeksiyon karışımı eklenerek nazikçe pipetleme yapıldı.
- Hücre karışımının üzerine 1 µg pcDNA3/Mito-GFP eklendi ve karışım 16 kuyucuklu *Nucleocuvette* striplerindeki (Lonza) kuyucuklara dağıtıldı.
- *4D-Nucleofector* Sistemi'nde (Lonza) "*Normal Human Dermal Fibroblast-Neonatal (NHDF-Neo)*" programı seçilerek transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi.
- Transfeksiyondan sonra, hücrelerin üzerine her kuyucuk için 80 µl olacak şekilde hücre kültür ortamı eklendi ve ardından hücrelerin tamamı etüvde bekletilen 24 kuyucuklu hücre kültür kabına aktarıldı. Hücreler 24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.
- 24 saat inkübasyonun sonunda hücreler transfeksiyon etkinliklerinin ve morfolojilerinin değerlendirilebilmesi için Trinoküler Floresan Ataçmanlı *Inverted* Mikroskop (Leica DMIL) kullanılarak incelendi.

### 3.2.4. Lipofektamin 3000 ile pcDNA3/Mito-GFP Gen İfade Vektörü ve miRNA mimiklerin C2C12 Hücrelerine Birlikte Transfeksiyonu

C2C12 hücrelerine Lipofektamin 3000 ajanı kullanılarak miRNA mimik ile pcDNA3/Mito-GFP vektörünün birlikte transfeksiyonu gerçekleştirildi. Deneyin negatif kontrolü olarak herhangi bir miRNA dizisi ile eşleşmeyen mimik negatif kontrol transfekte edilmiş hücreler kullanıldı. Pozitif kontrol olarak da başka bir proje kapsamında (Proje no: 114S876) mitokondriyal membran potansiyelini bozarak katlanmamış protein cevabı oluşturduğumuz 100 µM Antimisin A (AMA) uygulanmış hücreler kullanıldı.

- Antibiyotiksiz hücre kültür ortamında (%10 FBS içeren yüksek glukoz ve stabil glutaminli DMEM) çoğaltılan hücreler 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kabına ekildi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.
- 24 saat sonra her bir miRNA mimik (miR-382-5p, miR-409-3p, mimik negatif kontrol) için iki ayrı tüpe hazırlanan transfeksiyon karışımları oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

pcDNA3/Mito-GFP plazmidi + miRNA mimik + OPTI-MEM + P3000 = Toplam 50 µl (2500 ng) (20 nM)
Lipofektamin 3000 + OPTI-MEM= Toplam 50 µl (6 µl)

- İnkübasyon sonrasında plazmid ve miRNA mimik içeren transfeksiyon karışımı, lipofektamin içeren karışımın üzerine eklenerek dikkatlice pipetaj yapıldı. Tek bir tüpte birleştirilen transfeksiyon karışımları oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildikten sonra 1100 µl serumlu hücre kültür ortamı ile karıştırıldı.

- Hücreler 2 kez 1x PBS ile yıkandıktan sonra transfeksiyon karışımı içeren hücre kültür ortamı hücrelerin üzerine pipet yardımıyla dikkatlice eklendi ve hücreler 24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyonun sonunda hücreler transfeksiyon etkinliklerinin ve morfolojilerinin değerlendirilebilmesi için Trinoküler Floresan Ataçmanlı *Inverted* Mikroskop (Leica DMIL) kullanılarak incelendi.

### 3.2.5. İmmünofloresan Boyama ve Eş Yerleşim Analizi

- 24 kuyucuklu hücre kültürü kapları içerisindeki steril yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılan primer miyoblastlar/C2C12 hücreleri 2 kez 1x PBS ile yıkandıktan sonra 15 dk oda sıcaklığında %4 PFA solüsyonu içinde bekletilerek fikse edildi.
- Fiksasyon sonrası PFA uzaklaştırıldı ve hücreler 3 kez 5'er dk 1x PBS ile yıkandı.
- %0.2 Triton X-100 içeren 1x PBS içerisinde permeabilizasyon çözeltisi ile hücreler 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Permeabilizasyon çözeltisi uzaklaştırıldı ve hücreler 1 saat oda sıcaklığında %1 BSA içeren %0.1 PBS-T (bloklama solüsyonu) içerisinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve primer antikor(lar) %1 BSA içeren %0.1 PBS-T ile uygun oranda oranında sulandırılarak 1 saat süre ile oda sıcaklığındaki hücrelere uygulandı.
- Primer antikor(lar) uzaklaştırıldı ve lameller pens yardımıyla 20 kez 1x PBS çözeltisine batırılıp çıkarılarak yıkama yapıldı.
- Sekonder antikor(lar), %1 BSA içeren %0,1 PBS-T içerisinde 1:500 oranında sulandırıldı ve 1 saat süre ile oda sıcaklığındaki hücrelere uygulandı.
- Sekonder antikor(lar) uzaklaştırıldı ve lameller pens yardımıyla 20 kez 1x PBS çözeltisine batırılıp çıkarılmak suretiyle yıkama yapıldı.
- Preparatlar floresan mikroskopta (Carl-Zeiss Axioplan 2) uygun filtreler kullanılarak incelendi.

- Boyama sonrası konfokal mikroskopta (Zeiss LSM 980 Dual Line NLO system) incelenen preparatlardan 0,5 µm kesitler alınarak fotoğraflar çekildi.
- Hasta ve kontrol hücrelerine ait fotoğrafların alınan tüm kesitlerinde, ilgili iki proteinin eş yerleşim oranı Fiji 2.9.0 / 1.54f (135) programındaki “*Colocalization Threshold*” eklentisi kullanılarak karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Tüm preparatlarda en az 30 hücre analiz edildi.
- Sonuçların istatistiksel analizi *GraphPad Prism* 5.0 yazılımı kullanılarak *Mann-Whitney U* testi yardımıyla yapıldı. Veriler değerlendirilirken,  $p < 0,05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### **3.2.6. Primer miyoblastlardan mitokondriyal fraksiyonun ayrıştırılması ve protein izolasyonu**

Hasta ve kontrol bireylere ait primer miyoblastlardan mitokondriyal fraksiyonun izole edilmesi için “*hypotonic swelling* metodu” modifiye edilerek kullanıldı (136).

- T75 flasklar içerisinde çoğaltılan hücrelerin kültür ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 1x PBS ile yıkandı.
- Hücreler üzerine 2 ml soğuk PBS eklendi ve hücre kazıyıcısıyla kültür kaplarından kaldırılarak 50 ml’lik falkon tüplere aktarıldı.
- Flaska 3 ml soğuk PBS eklenerek kalan hücrelerin toplanması sağlandı ve 50 ml’lik falkon tüplere diğer hücreler üzerine aktarıldı. Hücreler  $+4^{\circ}\text{C}$ ’de 2000 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek çöktürüldü.
- Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti hipotonik tampon içinde çözüldü.
- Hücreler *Dounce* homojenizatörde 10 vuruş yapılarak parçalanmaları sağlandı.
- Homojenizasyon sonrası hücre karışımının üzerine hipertonic tampon ve 1 ml modifiye STM tamponu eklendi.

- Ependorf tüpe alınan karışıma +4°C'de 800xg'de 10 dk santrifüj yapıldı ve hücre debrisinin, çekirdeklerin ve parçalanmamış hücrelerin çöktürülmesi sağlandı.
- Pellet SOL tamponunda çözülerek 3 kez 10s *pulse* ve 30s *pause* olacak şekilde, 20 kHz ve % 20 amplitütte sonikasyon yapıldı ve nükleer fraksiyon hızlı bir şekilde sıvı azotta dondurularak -80°C'de saklandı.
- Süpernatant ise, ayrı bir tüpe alındı ve mitokondriyal fraksiyonun çöktürülebilmesi için +4°C'de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrasında süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve daha sonra sitoplazmik protein izolasyonu yapılmak üzere sıvı azotta dondurularak -80°C'de saklandı.
- Pellet ise, modifiye STM tamponunda çözüldü ve +4°C'de 20 dk santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrasında süpernatant tamamen uzaklaştırıldı ve mitokondrileri içeren pellet SOL tamponunda çözüldü.
- Mitokondriyal fraksiyona 3 kez 10s *pulse* ve 30s *pause* olacak şekilde, 20kHz ve %20 amplitütte sonikasyon uygulandı ve mitokondriyal proteinler hızlı bir şekilde sıvı azotta dondurularak -80 °C'de saklandı.
- Mitokondriyal fraksiyon proteinleri SDS-PAGE jelinde yürütüldü. Mitokondriyal (TOM20), sitoplazmik ( $\beta$ -tubulin), ve çekirdek (Histon H3) belirteci olan proteinleri tanıyan antikorlar yardımıyla yardımcıyla *Western Blot* analizi gerçekleştirilerek, izole edilen fraksiyonun kalite kontrolü gerçekleştirildi.

### 3.2.7. Primer miyoblastlardan total protein izolasyonu

- T25 flasklar içerisinde çoğaltılan hasta ve kontrol bireylere ait primer miyoblastları 1x PBS ile yıkandıktan sonra hücre kazıyıcı ile kaldırıldı.
- 150  $\mu$ l proteaz inhibitörü içeren protein izolasyon tamponu ile toplanarak 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı.

- Örnekler buz üzerine alınıp sonikatör cihazı ile 20kHz ve %20 amplitütte, 20 sn'lik sinyaller 6 defa verilerek parçalandı.
- Örneklerle +4 °C'de 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatant toplanarak -80°C'de saklandı.

### 3.2.8. Western Blot Analizi

Kontrol ve hasta primer miyoblastlarından ayrıştırılan mitokondriyal fraksiyondan izole edilen proteinlerden *Western Blot* analizi yapıldı.

#### Protein Miktar Tayini

İzole edilen total hücresel ve mitokondriyal fraksiyonlardaki protein konsantrasyonları *BCA Protein Assay Kit* (Pierce) yardımıyla ölçüldü.

- %1 SDS kullanılarak kör çözelti hazırlandı.
- 2 mg/ml konsantrasyonundaki albümin standartları %1 SDS ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda standart örnekler hazırlandı (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2.** BCA protein *assay* için standart örneklerin sulandırım oranları

	Kör çözelti	0,05 mg/ml	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1,2 mg/ml
<b>BSA (2 mg/ml)</b>	-	1,25 µl	2,5 µl	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl
<b>%1 SDS</b>	50 µl	48,75 µl	47,5 µl	45 µl	40 µl	30 µl	20 µl

- İzole edilen protein örnekleri %1 SDS ile 15 kat seyreltildi.
- 1:50 oranında B ve A çözeltileri kullanılarak çalışma çözeltisi hazırlandı.
- Standart örnekler ve seyreltilen protein örnekleri üzerine 1'er ml çalışma çözeltisi eklendi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
- Standart örneklerin *SpectraMax M2* Mikroplaka Okuyucu'da (*Molecular Devices*) 562nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri ile standart eğri çizildi.

- Protein örneklerinin absorbanları üçer kez ölçülerek standart eğri yardımı ile miktarları tayin edildi.
- Elde edilen değerler sulandırma faktörü olan 15 ile çarpılarak proteinlerin konsantrasyon değerleri hesaplandı.

### **SDS-PAGE**

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrışmalarını sağlamak için Mini Protean II elektroforez seti (Bio-Rad) yardımıyla SDS-PAGE yapıldı. Bu amaçla ayırıcı (*resolving*) ve toplayıcı (*stacking*) olacak şekilde iki katmanlı jel sistemi hazırlandı ve örneklerin elektriksel ortamda molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlandı.

- Poliakrilamid jelin aralarına döküleceği camlar %70'lik etanol ile iyice temizlendi ve aralarına 1 mm kalınlığında *spacerlar* yerleştirilerek jel dökme aparatına yerleştirildi.
- Camlar arasına ilk olarak pipet yardımıyla %14 oranında akrilamid içeren ayırıcı jel döküldü. Toplayıcı jelin dökülmesi için bırakılan 3 cm'lik mesafeye dökülen jelin düz olması için izopropanol eklendi.
- Ayırıcı jel polimerleşince izopropanol uzaklaştırıldı ve jel pipet yardımıyla distile su ile yıkandı.
- %5'lik toplayıcı jel hazırlanarak ayırıcı jelin üzerine, camların sonuna kadar döküldü ve bekletilmeden 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi.
- Jel polimerize olduktan sonra camlar ile birlikte jel dökme aparatından çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi. Tanka, camların üzerini örtecek kadar yürütme tamponu koyuldu ve tarak jelden çıkarıldı. Kuyucuklardaki olası jel artıkları şırınga yardımı ile temizlendi.
- 1.5 ml'lik ependorf tüplerinde 20 µg protein ve 4x *Laemmli* tamponu karıştırıldı ve örnekler yükleme için hazırlandı. Protein örnekleri 95°C'de 5dk denatüre edildikten sonra kuyucuklara yüklendi.

- Örnekler toplayıcı jelden ayırıcı jele geçinceye kadar 80V'ta 1 saat boyunca yürütüldü. Ardından voltaj 100V'a çıkarıldı ve analiz edilecek proteinin moleküler ağırlığına göre protein ağırlık belirleyicisi takip edilerek elektroforez gerçekleştirildi.
- Jel tanktan çıkarıldı ve toplayıcı jel kesilerek atıldı.

### **Western Blot**

SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılan proteinlerin PVDF membrana transferi gerçekleştirildi ve devamında uygun primer ve sekonder antikorlar ile muamele edilen membranda görüntüleme yapıldı.

- Jel boyutlarında kesilmiş PVDF membrana önce 1 dk boyunca %100 metanol uygulandıktan sonra distile su ile yıkanan membran, 15 dk yarı kuru transfer tamponunda bekletildi.
- Aynı şekilde jel ve jel boyutlarında kesilmiş 9 adet *whatmann* kâğıdı da 15 dk boyunca yarı kuru transfer tamponunda bekletildi.
- Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad)'na sırasıyla 5 adet *whatmann* kâğıdı, PVDF membran, jel ve üzerine tekrar 4 adet *whatmann* kâğıdı tek tek yerleştirildi ve her birinin üzerinden cam oklava ile geçilerek hava kabarcığı kalmaması sağlandı.
- Yarı kuru transfer cihazı kapatılarak 25V'ta 30 dk transfer yapıldı.
- Transfer sonrasında jel, *Coomassie brilliant blue* R-250 solüsyonu ile boyanarak protein örneklerinin tamamının jel üzerinden PVDF membrana transferi kontrol edildi.
- Protein örneklerinin eşit miktarda yüklendiğinin kontrol edilebilmesi için PVDF membran *Ponceau S* solüsyonu ile boyandı.
- Primer antikorun özgül olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla, distile su ile temizlenen membran oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklama



tamponu (%0,2 1xTBS-T içinde %5'lik süt tozu veya 1xTBS-T içinde %5'lik BSA) ile inkübe edildi.

- Bloklamanın ardından membran gece boyunca +4°C'de 1xTBS-T içinde %5'lik süt tozu/BSA çözeltisi ile uygun oranda hazırlanmış primer antikor solüsyonu ile inkübe edildi.
- *Western Blot* analizlerinde kullanılan primer antikorların optimize edilen çalışma koşulları Tablo 3.3'te verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Mitokondriyal proteomik analizler sonucunda seçilen aday proteinleri tanıyan antikorların *Western Blot* analizi için optimize edilen çalışma koşulları

Antikor	Antikor seyreltme oranı	Antikor seyreltme solüsyonu	İnkübasyon koşulları
SLC25A4	1:1000	1xTBS-T içinde %5 BSA	Gece boyu / +4°C
SLC25A6	1:800	1xTBS-T içinde %5 süt tozu	Gece boyu / +4°C
PMPCB	1:600	1xTBS-T içinde %5 süt tozu	Gece boyu/+4°C
SPG7	1:600	1xTBS-T içinde %5 süt tozu	1 saat / oda sıcaklığı
MRPL3	1:600	1xTBS-T içinde %5 süt tozu	Gece boyu / +4°C

- Primer antikor uygulaması sonrası, membran çalkalayıcı üzerinde 3 defa 10 dk boyunca 1xTBS-T ile yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.
- Bunu takiben membran, 1xTBS-T içinde %5'lik süt tozu/BSA çözeltisi ile uygun oranda hazırlanmış sekonder antikor solüsyonu ile oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerinde 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Sekonder antikor uygulaması sonrası, membran çalkalayıcı üzerinde 3 defa 10 dk boyunca 1xTBS-T ile yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.
- Görüntüleme kitinin (*SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, Thermo Scientific) içinde bulunan *Luminol/Enhancer* ve stabil peroksit

solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı ve membran karanlık bir ortamda bu karışım ile 5 dk boyunca muamele edildi.

- *GeneGnome 5* kemilüminesan görüntüleme cihazı (Syngene) kullanılarak uygun poz sürelerinde fotoğraflar çekildi.
- *Western Blot* analizinde hasta ve kontrol bireylere ait total hücrelerdeki protein ifadeleri analiz edilirken normalizatör olarak  $\beta$ -tubulin/GAPDH kullanıldı. Mitokondriyal fraksiyondaki ilgili proteinlerin ifadeleri analiz edilirken normalizatör olarak TOM20 kullanıldı. Analiz sonrasında, *Image J* programı ile yapılacak dansitometrik analizler ile hasta ve kontrol bireylere ait protein miktarları karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Sonuçlar *Mann-Whitney U* testi ile değerlendirildi. Testlerin yapılmasında ve grafiklerin çizilmesinde *GraphPad Prism 7* programı kullanıldı ve veriler değerlendirilirken  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3.2.9. Zenginleştirilmiş mitokondriyal fraksiyonda proteomik analizler

#### Proteinlerin kütle spektrometre analizine hazırlanması

Proteinlerin kütle spektrometresine hazırlanması için *FASP Protein Digestion Kit* (Abcam) protokolü kullanıldı.

- SOL tampon içinde bulunan proteinlerin üzerine %4 SDS, 100 mM Tris-HCl ve 0,1 M DTT'den oluşan SDT liziz tamponu (DTT final konstantrasyonu 20mM olacak şekilde) eklendi.
- Örnekler, 95°C'de 10 dk aralıklı olarak vortekslenerek ısıtıldı.
- Isıtma işlemi sonrasında sonikasyonlu su banyosunda 5 dk boyunca sonikasyona tabi tutulan örnekler, 16.000xg'de, +4°C'de 15 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı.

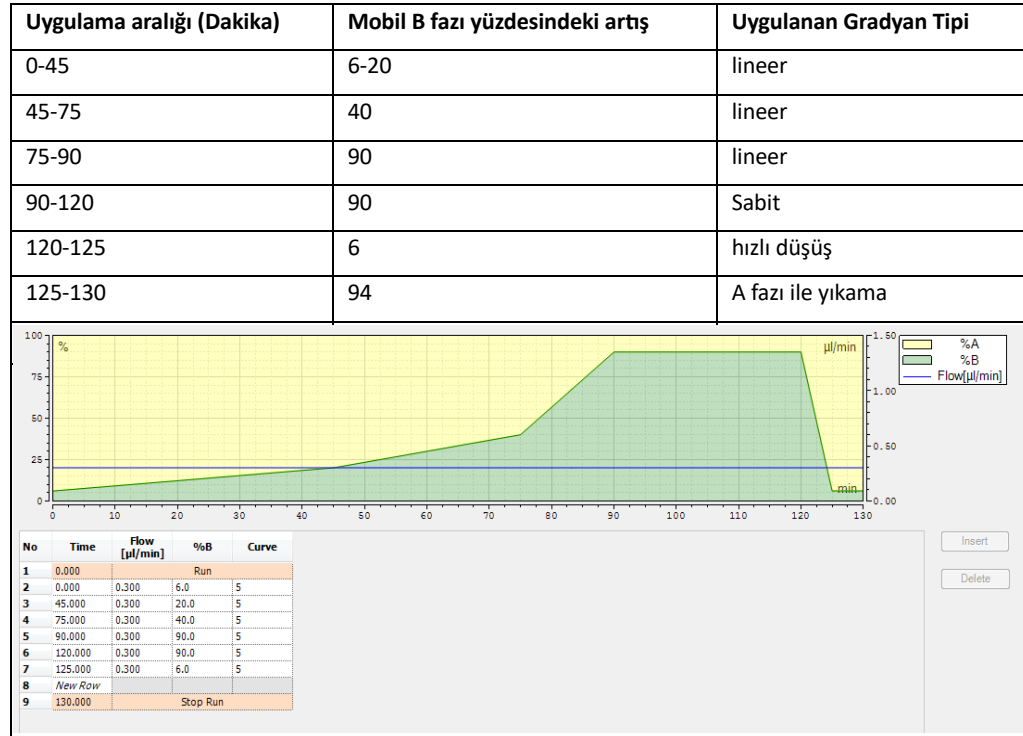
- Filtre ünitesinde 300 µl'ye kadar protein örneği (10-250 µg) ile 200 µl UA solüsyonu (0.1 M Tris/HCl pH 8.5 içinde 8M üre) karıştırıldı ve filtre ünitesi tamamen kuruyana kadar (en az 15 dk) 14.000xg'de santrifüjlendi.
- Filtre ünitesine 200 µl UA eklendi ve 14.000xg'de 15 dk santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpünde kalan sıvı atıldı.
- 100 µl IAA solüsyonu (UA içinde 0,05M iyodoasetamid) eklendi ve 600 rpm'de ısıtıcılı karıştırıcıda 1 dk karıştırıldı ve 20 dk karanlıkta (genellikle santrifüj içinde döndürmeden) inkübe edildi.
- Filtre ünitesi 14.000xg'de 15 dk santrifüjlendi.
- Filtre ünitesine 100 µl UA eklendi ve 14.000xg'de 15 dk santrifüjlendi. Bu adım iki kez tekrarlandı.
- Filtre ünitesine 100 µl ABC (0.05M amonyum bikarbonat) eklendi ve 14.000xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Bu adım iki kez tekrarlandı.
- Tripsin ile birlikte 40 µl ABC eklendi (enzim-protein oranı 1:100). Buharlaşmayı en aza indirmek için tüplerin kapağı parafilm ile sarıldı.
- Döndürme filtresi (*spin filter*) 37°C'de 4-18 saat inkübe edildi.
- Döndürme filtresi yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve 40 µl ABC solüsyonu eklendi.
- Filtre ünitesi 14.000xg'de 10 dakika santrifüjlendi.
- 50 µl 0,5M NaCl eklendi ve filtre ünitesi 14.000xg'de 10 dakika santrifüjlenerek hızlı vakumla kurulandı.
- Devamında 20 µl % 0,1 FA'da sulandırıldı.
- *Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen)* yardımıyla peptit konsantrasyonu ölçümü yapılarak değerlendirildi.

### **Sıvı Kromatografi (*Liquid Chromatography* - LC)**

Peptitlerin ayırımı *Dionex Ultimate 3000 Series RSLC* (Thermo Fisher Scientific) nano-pompa yardımıyla gerçekleştirildi. Bu nano pompa, *Ultimate 3000 Series*

*TCC-3000RS* (Thermo Fisher Scientific) kolon kompartmanları ile donatılmış olup, *Dionex UltiMate 3000 Series RS* (Thermo Fisher Scientific) oto- örnekleme ünitesine bağlıdır. Sistemin tamamı *Xcalibur 4.0* (Thermo Fisher Scientific) yazılımı ile kontrol edilmektedir.

- Her bir analiz öncesinde örnekler, 5 mm×300 µm i.d., 5 µm, 100 Å boyutlarındaki bir C18 materyali içeren yakalama kolununa, dakikada 5 µl hızla ve % 0,05 (hacim/hacim) trifloroasetik asit ve %1 asetonyril içeren çözelti yardımı ile yüklendi.
- Örnekler, yakalama kolunu sonrasında boyutları 15 cm×75 µm olan ve 2 µm, 100 Å çapında C18 materyali ile paketlenmiş analitik bir *Acclaim PepMap RSLC* kolonuna (Thermo Scientific) aktarıldı ve peptit elüsyonu iki farklı mobil faz (A ve B) kullanılarak yapıldı. Mobil faz A HPLC kalitesinde su ile hazırlanmış %0,1 formik asit, mobil faz B ise HPLC kalitesinde su ile hazırlanmış %0,1 asetonyril içerecek şekilde hazırlandı.
- Peptitler 130 dk süreyle ve dakikada 0,3 µl akış hızıyla ayrıştırılarak *Thermo Q-exactive* (Thermo Scientific) kütle spektrometresine gönderildi. Elüsyon için uygulanan gradyan adımları Tablo 3.3'te verilmiştir.
- Kolon sıcaklığı 40°C'de tutuldu ve her analizde 2 µl örnek enjeksiyonu yapıldı.
- Peptitlerin pozitif yük okuma modunda iyonizasyonunu sağlayabilmek için ısıtılmış bir elektrospray iyonizasyon kaynağı (HESI) kullanıldı.
- Kullanılan cihaz parametreleri, +2,3 kV voltaj, 300°C kapiler sıcaklığı olup, *sheet* gaz ve *auxiliary* gaz akışı 50 ve 30 ünite civarında tutuldu. S ve RF lens seviyeleri ise 50'ye ayarlandı.

**Tablo 3.4.** nHPLC’de analitik kolona uygulanan mobil fazların gradyanları

### Ardışık Kütle Spektrometresi (*Tandem mass spectrometry - MS/MS*)

- İlk aşama olarak, *Thermo Q-exactive* (Thermo Scientific) cihazı ile data bağımlı veri toplama işlemi yapıldı. Tarama işlemi başlangıçta *Full MS* spektrum modunda kullanıldı [parametreler; çözünürlük: 70.000, tarama aralığı: 400-200 m/z,  $3 \times 10^6$  hedef otomatik kazanım kontrolü (AGC), 60ms maksimum enjeksiyon zamanı ve sentroid data tipi].
- MS/MS analizi için MS sonucuna bağlı olarak en yüksek 10 öncül iyon seçildi (TOP10) ve bu iyonlar yüksek enerjili kollizyon ayırımı (HCD) sonrası okutuldu [HCD parametreleri; çözünürlük: 17.500,  $1 \times 10^5$  AGC, 100ms maksimum enjeksiyon zamanı, 2 m/z izolasyon penceresi, NCE 27 ve sentroid spektrum data tipi toplama].

- Cihazın kalibrasyonu pozitif moda her bir enjeksiyon öncesi standart pozitif kalibrant (*LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution 88323, Pierce*) kullanılarak yapıldı.
- Eşleştirilmemiş ve tek yüklü iyonlar MS/MS analizinden çıkartıldı ve dinamik dışlama otomatik olarak yapıldı.

### **Peptit ve protein tanımlama**

- LC-MS/MS analizi ile elde edilen proteinlerin karşılaştırmalı analizi etiketsiz miktar ölçümü (*label-free quantification*) yöntemiyle *Proteom Discoverer 2.2* (Thermo Scientific) yazılımında gerçekleştirildi (parametreler; peptit kütle toleransı 10ppm, MS/MS kütle toleransı 0,2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, tolere edilen yanlış kesim 1, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabitlenmiş değişimler sisteinin karbamidometilasyonu, sabit olmayan değişimler metiyonin oksidasyonu ve asparajinin deaminasyonu).
- Analizlerde yoğunluk hesaplamasında pik intensiteleri kullanıldı ve her bir protein için tanımlanan minimum peptit sayısı 2 olarak kabul edildi.
- Veriler *Uniprot/Swissprot* (137) veri bankasında bulunan organizmaya özel verilere göre araştırıldı.

### **3.2.10. Proteomik çalışması verilerinin biyoinformatik analizleri**

- Kütle spektrometre analizi sonucunda elde edilen tüm proteinler *Uniprot/Swissprot* (137) veri bankasına ait insan referans proteomu (Proteome ID: UP000005640) ile analiz edildi.
- Bu proteom içerisindeki mitokondriyal proteinleri ayırabilmek amacıyla, lokasyon sınırlandırıldı ve elde edilen veriler gruplandırılmış insan mitokondri proteomu (SL-0173) ile analiz edildi.

- Yapılan etiketsiz miktar tayini analizleri ile elde edilen proteinlere ait sonuçlar değerlendirilerek hasta ve kontrol hücreleri arasında zenginleştirilmiş mitokondriyal fraksiyondaki miktarı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişen proteinler, EnrichR (138-140) veri bankasındaki *Gene Ontology* (GO)-Biyolojik süreç kategorisine göre sınıflandırılarak yolak analizleri yapıldı.

### **3.2.11. Primer miyoblastlardan total RNA izolasyonu**

- T25 flaskta çoğaltılan ve yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler 2 kez 1x PBS ile yıkandı.
- Flaska 1 ml trizol eklendi ve pipetaj yardımıyla hücrelerin kalkması sağlandı.
- Trizol içerisindeki hücreler 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Hücrelerin üzerine 200 µl kloroform eklendi ve tüpler alt üst edildi.
- 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tüpler tekrar alt üst edildi.
- Tüpler +4°C'de 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Faz ayrımı görülünce en üstteki şeffaf faz yeni ependorf tüplerine aktarıldı.
- Üzerine 500 µl izopropanol eklendikten sonra tüpler alt üst edildi ve -20°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Tüpler +4°C'de 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek RNA'ların çöktürülmesi sağlandı.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 1 ml %70'lik etanol eklenerek tüpler alt üst edildi.
- Tüpler +4°C'de 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantın alınması ile etanol tamamen uzaklaştırıldı.
- Oda sıcaklığındaki tüplerin kapakları açık bırakılarak kalan etanolün uçması sağlandı.
- RNA pelletleri üzerine 15 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve örnekler 1 saat buzda bekletildi.

- İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları *Nanodrop* 1000 spektrofotometre yardımıyla ölçüldü ve örnekler -80°C'de saklandı.

### 3.2.12. Kantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

- İzole edilen RNA'lardan *iScript Reverse Transcription Kit* (Bio-Rad) yardımıyla cDNA sentez reaksiyonu koyuldu. Reaksiyon bileşenleri ve koşulları aşağıda belirtilmiştir.

<u>cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri</u>	<u>Hacim</u>
<i>5X iScript Reaction mix</i>	: 4 µl
<i>iScript reverse transkriptaz</i>	: 1 µl
RNaz içermeyen su	: x µl
<u>RNA (800ng)</u>	: x µl
Toplam	: 20 µl

#### **cDNA Sentezi Reaksiyon Koşulları**

<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>
25°C	5 dk
46°C	20 dk
95°C	1 dk
4°C	∞

- cDNA sentezini takiben *Luna Universal qPCR Master Mix (NEB)* kiti ile qPCR reaksiyonu hazırlandı ve BioRad iQ5 RT-PCR cihazında aşağıda belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi.



<b>qPCR Reaksiyon Bileşenleri (1 reaksiyon için)</b>	<b>Hacim</b>
<i>2X Luna Universal qPCR Master Mix</i>	5 µl
<i>Forward primer (10 µM)</i>	0,4 µl
<i>Reverse primer (10 µM)</i>	0,4 µl
Distile su	2,2 µl
<u>cDNA (800ng- ¼ dilüe)</u>	<u>2 µl</u>
Toplam	10 µl

<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü sayısı</b>
94°C	2 dk	1
94°C	5 sn	40
58°C	20 sn	
55-95°C	10 sn (+1°C)	1

- Hedef genlerin ifade değişimi, replikaların Ct değerlerinin ortalamaları alınarak *GAPDH* genine göre normalize edildi.
- İfade seviyelerinin göreceli kantitasyonu ise karşılaştırmalı  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi ile analiz edildi.
- Sonuçlar *Mann-Whitney U* testi ile değerlendirildi. Testlerin yapılmasında ve grafiklerin çizilmesinde *GraphPad Prism 7* programı kullanıldı ve veriler değerlendirilirken  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

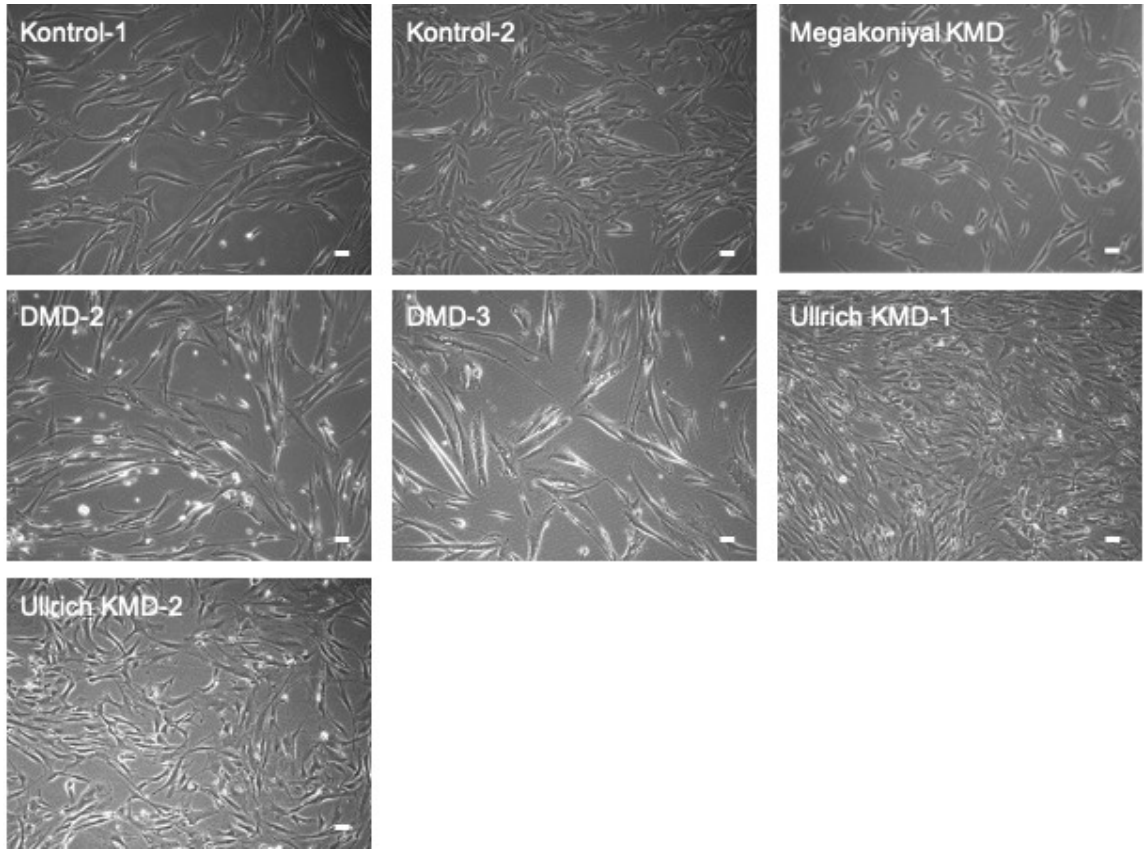
### 4.1. Hasta ve Kontrol Bireylere Ait Dondurulmuş Primer Miyoblastların Kültür Ortamında Açılması ve Pasajlanması

Tez kapsamında çalışılan, sekonder mitokondri hasarının görüldüğü DMD (n=2), Megakoniyal KMD (n=1) ve Ullrich KMD (n=2) hastalarına ve kontrol bireylere (n=2) ait primer miyoblastların Londra-Nöromusküler Hastalıklar Merkezi Biyobankası (*MRC CNMD Biobank London, Dubowitz Neuromuscular Unit, Institute of Child Health*)'ndan laboratuvarımıza transferi sağlandı.

Primer miyoblast kültürleri, içerisinde fibroblastların da yer aldığı heterojen kültürlerdir. Dondurulmuş olarak kuru buz içerisinde elimize ulaşan primer miyoblastlar, içerisinde bulunan fibroblastların proliferasyonunun en aza indirgenebilmesi ve miyoblastların hücre döngüsünün hızlandırılabilmesi amacıyla, iskelet kasına özel hücre kültür ortamı (Promocell) içerisinde çoğaltıldı (Şekil 4.1).

DMD-1 kodlu bireye ait primer miyoblastlar (hücre no: 6311, pasaj no:6) kültür ortamında açıldığında yüksek oranda (%95) ölü hücrenin olduğu, canlı hücrelerin proliferasyon hızının ise çok düşük olduğu tespit edildi. Biyobankaya bu durum bildirilerek, aynı numaralı hastaya ait 1 vial ve farklı bir DMD hastasına ait 1 vial (DMD-3 hücre no: NH14-1259A, pasaj no:3) yeni hücre istemi yapıldı. Yeni gelen DMD-1 kodlu hasta hücreleri çoğaltıldığında, önceki gelen aynı kodlu hücre ile benzer şekilde kültür ortamında yüksek oranda (%95) ölü hücrenin bulunduğu, canlı hücrelerin proliferasyon hızının ise çok düşük olduğu tespit edildi. DMD-3 kodlu hücrelerin ise sağlıklı bir şekilde çoğaltılması sağlandı. Tez çalışması devamında DMD-1 kodlu hücre yerine DMD-3 kodlu hücrenin kullanılmasına karar verildi.

Yeterli yoğunluğa ulaşan hasta ve kontrol primer miyoblastları pasaj 4-8 arasında minimum 10 vial (1 milyon hücre/ml) olacak şekilde dondurularak sıvı azot tanklarında depolandı.

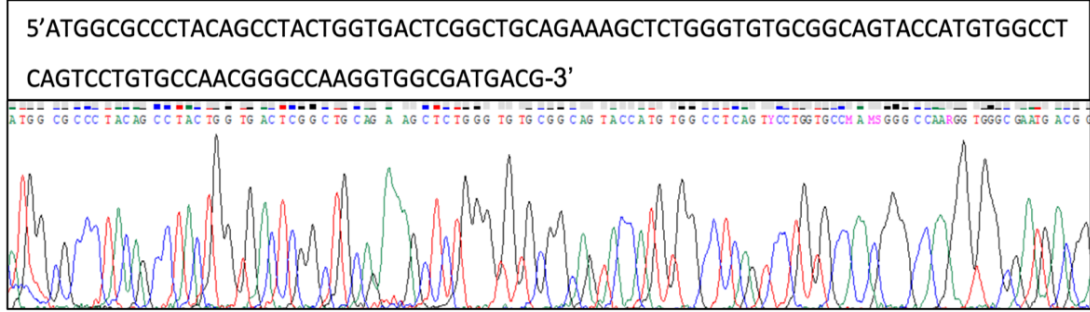


**Şekil 4.1.** Hasta ve kontrol bireylere ait primer miyoblastların ışık mikroskobu altındaki görüntüleri (Ölçek: 50 µm).

#### **4.2. Hasta ve Kontrol Primer Miyoblastlarında Mitokondriyal Protein İmport Analizi (Pre-sequence/ TIM23 import yolu analizi)**

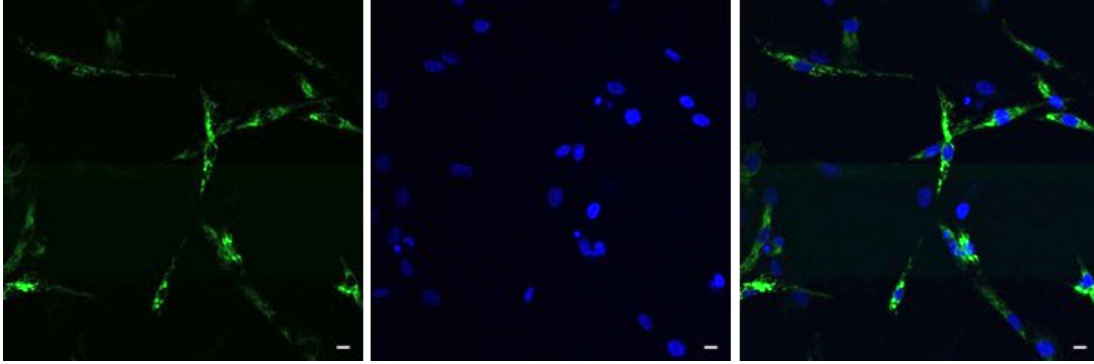
Mitokondriyal protein import analizi için, *Aconitase 2* (ACO2) proteinine ait mitokondriyal sinyal dizisinin belirteç olarak yeşil floresan protein geni (*GFP*) içeren pcDNA3 vektörüne klonlanması ile oluşturulan pcDNA3/Mito-GFP plazmidi kullanıldı. Plazmidin primer miyoblastlarına transfeksiyonu ve bunu takiben hasta ve kontrol bireylere ait transfekte hücrelerde mitokondrilerde yerleşim gösteren GFP miktarının karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi planlandı. Bu amaçla Dr. Benjamin Dehay'den (*University of Bordeaux, France*) temin edilen pcDNA3/Mito-GFP plazmidi çoğaltıldı ve

vektöre klonlanmış olan ACO2 proteinine ait mitokondriyal sinyal dizisi DNA dizi analizi ile doğrulandı (Şekil 4.2).



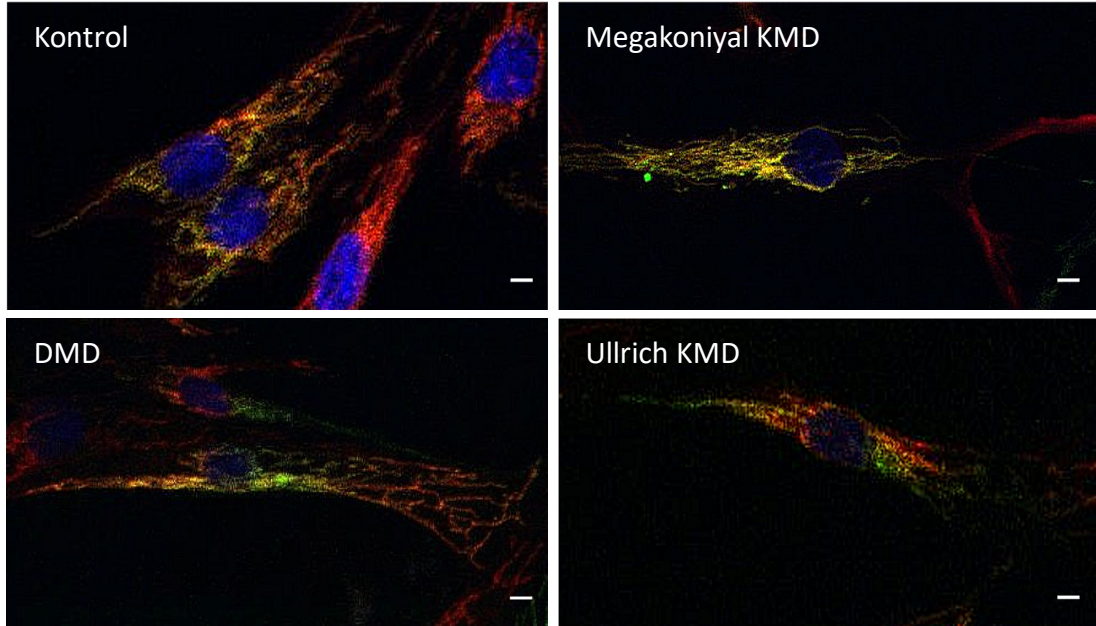
**Şekil 4.2.** pcDNA3/Mito-GFP plazmidinde bulunan ACO2 proteinine ait 105 bç'lik mitokondriyal sinyal dizisinin (üst) DNA dizi analizi ile doğrulanması (alt).

Primer miyoblastlarda transfeksiyonun optimizasyonu için ilk olarak Lipofektamin 2000, Lipofektamin 3000 ve FuGENE-HD transfeksiyon ajanları ile farklı parametreler (transfeksiyon ajanı miktarı, transfeksiyon için kullanılacak hücre kültür ortamı, DNA miktarı, transfeksiyon karışımının inkübasyon süresi) denenerek en uygun transfeksiyon koşulları saptanmaya çalışıldı. Lipofektamin 2000 ile denenen tüm koşullarda transfeksiyon etkinliğinin çok düşük olduğu ve transfeksiyonun hücreler üzerinde toksik etki yarattığı gözlemlendi. FuGENE-HD ile denenen transfeksiyon koşullarında ise transfekte hücre gözlenmedi. Lipofektamin 3000 ile denenen koşullar arasında ise, en yüksek transfeksiyon etkinliği ~%20 olarak bulundu. Transfeksiyon etkinliğinin artırılması amacıyla elektroporasyon temelli bir yöntem olan nükleofeksiyon gerçekleştirildi ve 100.000 hücrenin üzerine eklenen 1000 ng pcDNA3/Mito-GFP uygulanması ile transfeksiyon etkinliği %58'e yükseltildi (Şekil 4.3). Transfeksiyonu zor hücreler olan primer miyoblastlarda yapılan mitokondriyal protein import analizinde, optimize edilen nükleofeksiyon koşulları kullanıldı.

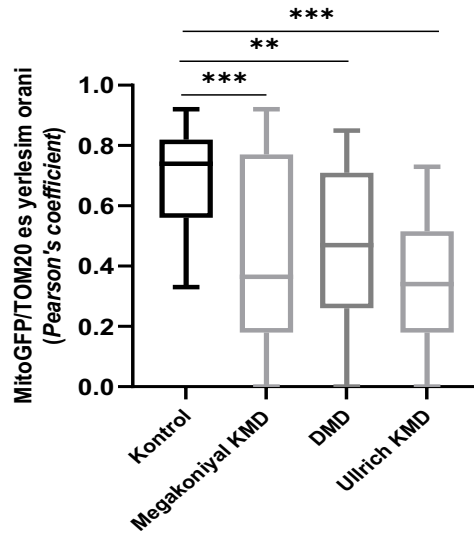


**Şekil 4.3.** *Nucleofector* ile pcDNA3/Mito-GFP transfeksiyonu yapılmış primer miyoblastları (100.000 hücre/kuyucuk; DNA: 1000 ng, 24 saat). **Sol:** yeşil/FITC: MitoGFP, **Orta:** mavi/DAPI: çekirdek, **Sağ:** Çakıştırılmış görüntü (Ölçek:10 um, Mikroskop: *Carl-Zeiss Axioplan 2*).

Tüm hasta ve kontrol bireylere ait primer miyoblastlara nükleofeksiyon ile pcDNA3/Mito-GFP transfeksiyonu yapıldı ve mitokondri belirteci olan TOM20 antikoruna ile immünfloresan boyamalar sonrasında mitokondrilerde yerleşim gösteren GFP miktarları (MitoGFP-TOM20 eş yerleşimi), konfokal mikroskopta Z düzleminde alınan 0.5 µm'lik optik kesitlerde, karşılaştırmalı olarak analiz edildi. pcDNA3/Mito-GFP transfekte edilmiş hasta ve kontrol primer miyoblastlarının TOM20 antikoruna ile immünfloresan boyamalarına ait temsili görüntüler Şekil 4.4'te verilmiştir. Fiji 2.9.0 / 1.54f (135) programındaki "*Colocalization Threshold*" eklentisi kullanılarak yapılan analizler sonucunda, tüm hastalara ait primer miyoblastlarda MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde kontrol hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde (~%50 oranında) azalma gözlemlendi (Şekil 4.5). Tezin hipotezine uygun şekilde; DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD hastalıklarında mitokondriyal protein import mekanizmasında (*pre-sequence*/TIM23 import yolağı) hasar olduğu saptandı.



**Şekil 4.4.** pcDNA3/Mito-GFP transfekte edilmiş hasta ve kontrol primer miyoblastlarının TOM20 antikoruna ile immünfloresan boyaması sonrasında konfokal mikroskobik görüntüleri. Yeşil/FITC: MitoGFP, Kırmızı/Texas Red: TOM20/mitokondri, mavi/DAPI: çekirdek (Ölçek: 10  $\mu$ m; Mikroskop: Zeiss LSM 980 Dual Line NLO system)



**Şekil 4.5.** pcDNA3/Mito-GFP transfekte edilmiş hasta ve kontrol primer miyoblastlarında MitoGFP-TOM20 eş yerleşim analizi. Tüm preparatlarda en az 30 hücre analiz edildi. Veriler istatistiksel olarak *Mann-Whitney U* testi ile analiz edildi (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

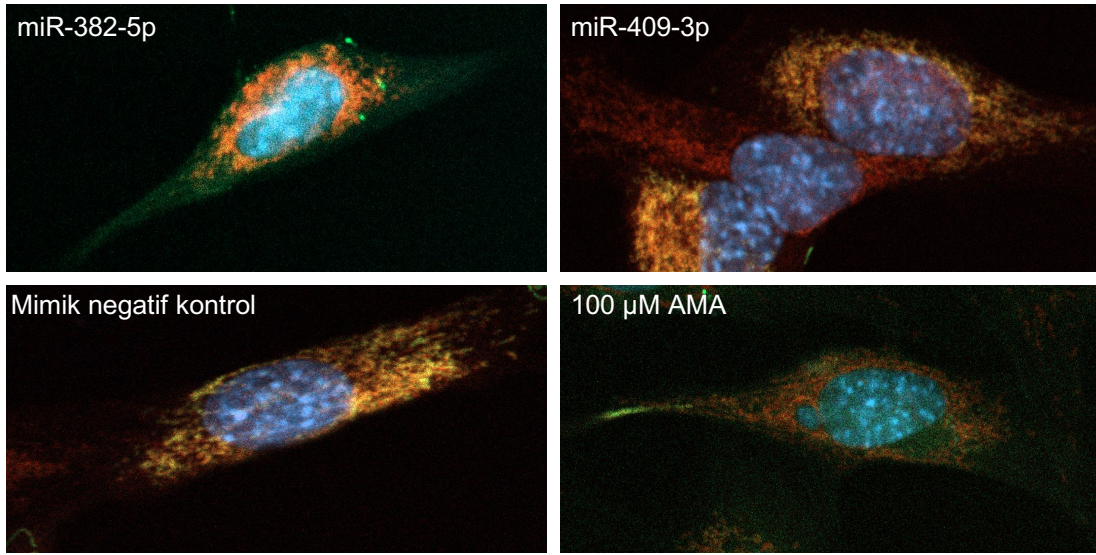
### 4.3. Mitokondri Hasarı ile İlişkilendirilen miR-382-5p ve miR-409-3p'nin Mitokondriyal Protein İmport (*Pre-sequence*/ TIM23 import yolağı) Mekanizmasına Etkisi

Önceki çalışmalarımızda sekonder mitokondri hasarının gözlemlendiği nöromusküler hastalıklarda (1) iskelet kas dokusunda artışını tespit etmiş olduğumuz, (2) işlevsel analizlerle mitokondri hasarı (azalmış ATP üretimi ve bozulmuş dinamik mitokondri ağ yapısı) ile direkt ilişkilendirdiğimiz (yayınlanmamış veri, Şekil 2.3 ve 2.4) ve (3) olası hedef genlerinin mitokondriyal protein importu ile ilişkili olduğu saptadığımız (29) (Şekil 2.2) miR-382-5p ve miR-409-3p'nin mitokondriyal protein import mekanizmasına potansiyel etkisi araştırıldı.

pcDNA3/mitoGFP plazmidi ve miRNA mimikler (miR-382-5p, miR-409-3p ve negatif kontrol) C2C12 fare miyoblastlarına birlikte transfekte edildi. Mitokondriyal membran potansiyelini bozarak organel hasarı yaratan AMA, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı. Lipofektamin 3000 ajanı ile yapılan transfeksiyon deneylerinde hücrelere uygulanan miRNA mimik miktarı sabit tutularak, farklı pcDNA3/MitoGFP-Lipofektamin 3000 oranları denendi. Çalışma sonucunda, en yüksek transfeksiyon etkinliği, 2500 ng pcDNA3/MitoGFP, 20 nM miRNA mimik ve 6 µl Lipofektamin 3000'in uygulandığı koşulda %34,2 olarak belirlendi. Optimize edilen koşullarda, pcDNA3/mitoGFP plazmidi ve miRNA mimikler ile birlikte transfekte edilen hücreler mitokondri belirteci olan TOM20 antikoruyla boyandı.

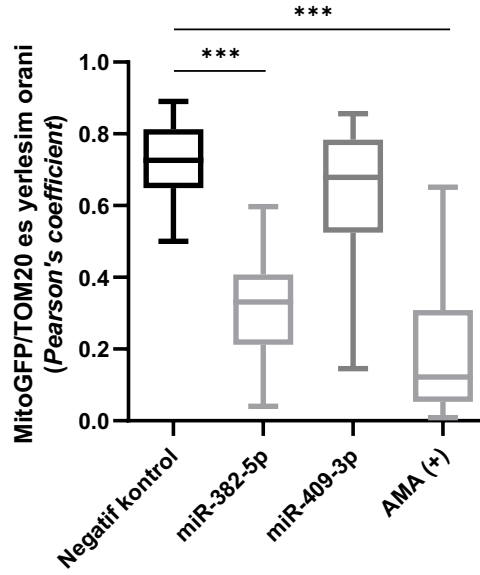
İmmünfloresan boyama sonrasında konfokal mikroskopta Z düzleminde alınan 0,5 µm'lik optik kesitlerde, MitoGFP-TOM20 eş yerleşimi kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Fiji 2.9.0 / 1.54f (135) programındaki "*Colocalization Threshold*" eklentisi kullanılarak yapılan analizler sonucunda, AMA uygulanmış hücrelerdeki MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde mimik negatif kontrol transfekte edilmiş hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ve AMA'nın mitokondriyal protein import mekanizmasının işleyişini bozduğu doğrulandı. Pozitif kontrole benzer şekilde,

miR-382-5p transfekte edilmiş hücrelerdeki MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde, ~%50 oranında azalma olduğu gösterildi (\*\* $p < 0.001$ ) ve hücrelerdeki artırılmış miR-382-5p ifadesinin mitokondriyal protein import mekanizması hasarına neden olduğu tespit edildi. Öte yandan, miR-409-3p transfekte edilmiş hücrelerdeki MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde, mimik negatif kontrol transfekte edilmiş hücrelere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.6 ve 4.7).



**Şekil 4.6.** pcDNA3/Mito-GFP ile birlikte miR-382-5p veya miR-409-3p transfekte edilmiş C2C12 hücrelerinin TOM20 antikoruna ile immünfloresan boyaması sonrasında konfokal mikroskopi görüntüleri. Mimik negatif transfekte edilen hücreler negatif kontrol, 100 µM AMA uygulanmış hücreler pozitif kontrol olarak kullanıldı. Yeşil/FITC: MitoGFP, Kırmızı/Texas Red: TOM20/mitokondri, mavi/DAPI: çekirdek (40X büyütme); Mikroskop: Zeiss LSM 980 Dual Line NLO system)





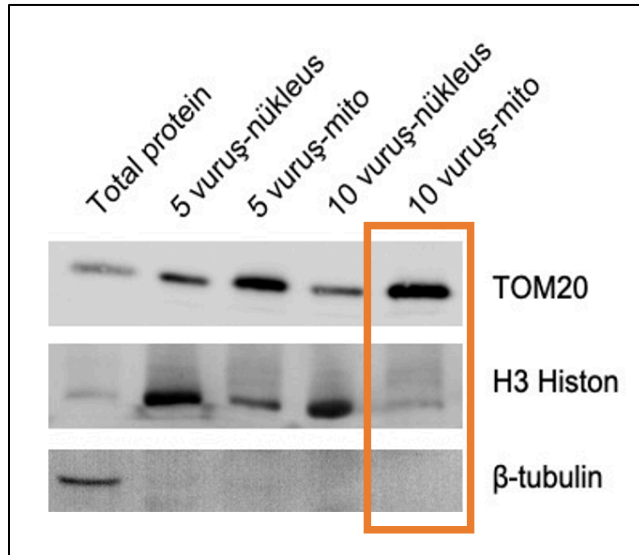
**Şekil 4.7.** pcDNA3/Mito-GFP ile birlikte miR-382-5p veya miR-409-3p transfekte edilmiş C2C12 hücrelerinde MitoGFP-TOM20 eş yerleşim analizi. Mimik negatif transfekte edilen hücreler negatif kontrol, 100  $\mu$ M AMA uygulanmış hücreler pozitif kontrol olarak kullanıldı. Tüm preparatlarda en az 30 hücre analiz edildi. Veriler istatistiksel olarak *Mann-Whitney U* testi ile analiz edildi (\*\*\*) $p < 0.001$ ).

#### 4.4. Hasta ve Kontrol Primer Miyoblastlarından Mitokondriyal Fraksiyonun İzolasyonu ve Kalite Kontrolü

Hasta ve kontrol primer miyoblast hücrelerinden izole edilen mitokondriyal fraksiyonda proteomik analizler gerçekleştirilmesi amacıyla, hücrelerden mitokondriyal fraksiyonun izole edilmesi planlandı. Primer hücrelerden mitokondriyal fraksiyon izolasyonunun optimize edilebilmesi amacıyla, iki farklı mitokondri izolasyon kiti (*Qproteome* mitokondri izolasyon kiti, QIAGEN) ve *Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells*, Thermo Fisher Scientific) ve iki farklı kitten bağımsız manuel yöntem kullanılarak 33 farklı izolasyon protokolü uygulandı. Bu farklı izolasyon protokolleri ile; mitokondri pelletinin elde edilebildiği, mitokondriyal fraksiyonun zenginleştirilebildiği, ancak çekirdek ve/veya sitoplazmaya ait fraksiyonların başarılı bir şekilde mitokondriyal fraksiyondan uzaklaştırılmadığı sonucuna varıldı.

Devamında yapılan çalışmalarda mitokondriyal fraksiyonun en saf şekilde izole edilebildiği yöntemin, hücrelerin hipotonik bir ortama koyulup patlatılmasıyla hücresel fraksiyonların başarı ile ayrıştırılabildiği “*hypotonic swelling*” yöntemi olduğu belirlendi. Optimize edilen parametrelerle gerçekleştirilen “*Hypotonic swelling*” yöntemiyle, hasta ve kontrol bireylere ait primer miyoblastlarından başarılı şekilde mitokondri pelletleri elde edildi.

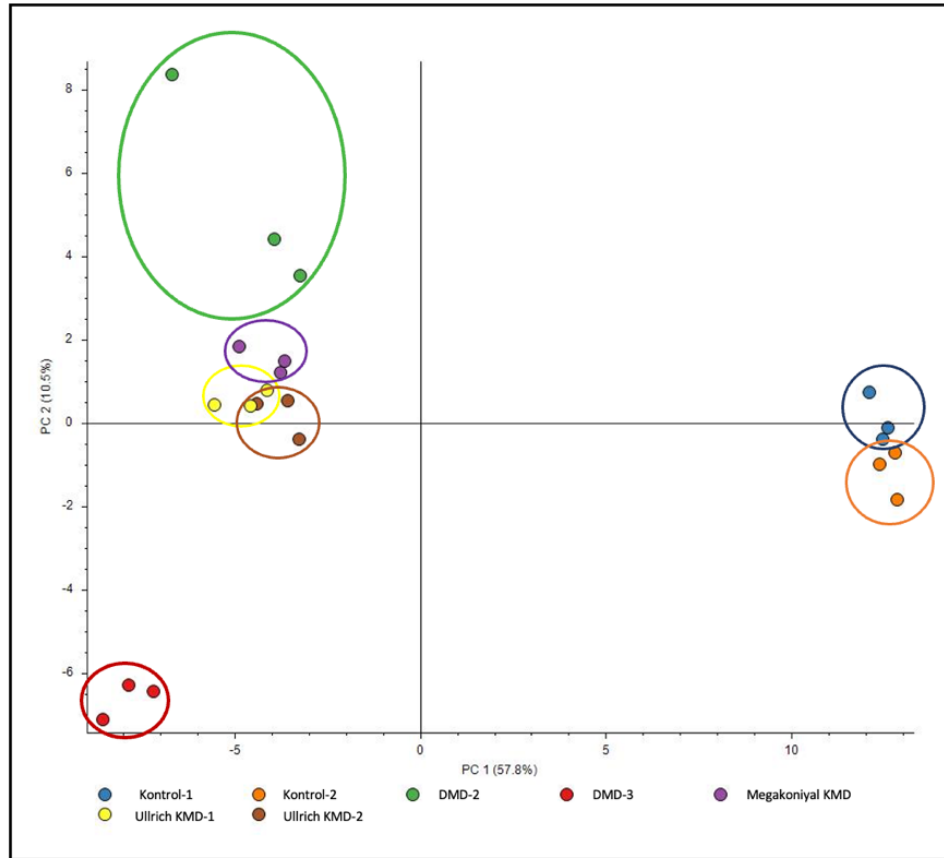
Mitokondriyal fraksiyondan izole edilen proteinlerle; mitokondriyal (TOM20), sitoplazmik ( $\beta$  tubulin) ve çekirdek (Histon H3) belirteçlerini tanıyan antikorlar yardımıyla *Western Blot* analizi gerçekleştirilerek, izole edilen fraksiyonun kalite kontrolü gerçekleştirildi. Analizler sonucunda; hipotonik tamponda bekleme süresi 10 dk, *Dounce* homojenizatörde vuruş sayısı 10 olduğu durumda çekirdek ve sitoplazma fraksiyonlarının mitokondriyal fraksiyondan tamamen uzaklaştırıldığı gözlemlendi (Şekil 4.8).



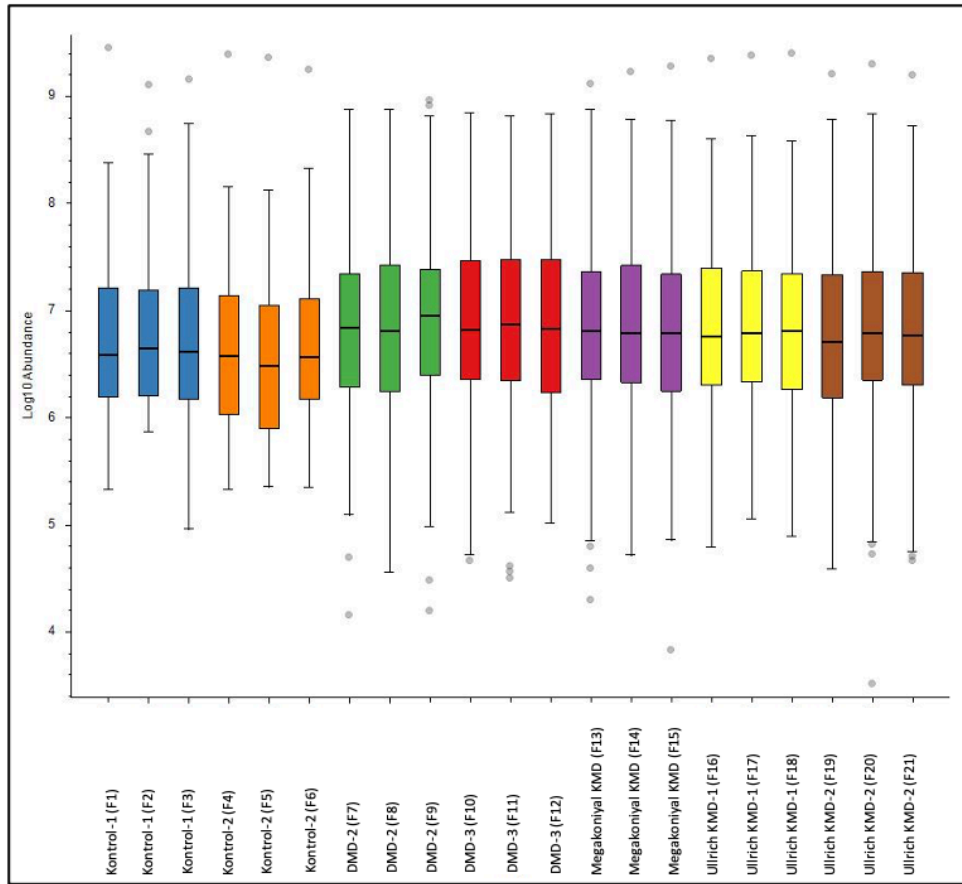
**Şekil 4.8.** “*Hypotonic swelling*” yöntemi ile primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonun *Western Blot* analizi ile kalite kontrolü

#### 4.5. Hasta ve Kontrol Primer Miyoblastlarından İzole Edilen Mitokondriyal Fraksiyonda Proteomik Analizler

Hasta ve kontrollere ait primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyondaki proteinler LC-MS/MS ile analiz edildi. Her örnek üç kez MS kolonundan geçirilerek okuma yapıldı. Analizlerde yoğunluk hesaplamasında pik intensiteleri kullanıldı. Verilerin işlenebilmesi ve anlamlı sonuçların tespit edilebilmesi için de Temel Bileşenler Analizi (*Principle Component Analysis-PCA*) kullanıldı. PCA grafiği ve mitokondriyal fraksiyona ait protein örneklerinde tespit edilen proteinlerin *abundance* grafiği Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarına ait proteinlerin karşılaştırmalı analizi, etiketsiz miktar ölçümü (*label-free quantification*) yöntemiyle *Discoverer 2.2* (Thermo Scientific) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.



**Şekil 4.9.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyon proteinlerine ait LC-MS/MS analizinin PCA grafiği.



**Şekil 4.10.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyon örnekleriyle yapılan LC-MS/MS analizinde tespit edilen proteinlerin abundance grafiği.

Tespit edilen proteinler hem *Uniprot* (137) veri bankasına ait insan referans proteomu (Proteome ID: UP000005640) ile, hem de bu proteom içerisinde lokasyon sınırlandırılarak gruplandırılmış insan mitokondri proteomu (SL-0173) ile ayrı ayrı analiz edildi. Analizler sırasında kontrol hücrelerinden elde edilen değerlerin ortalaması alınarak hasta hücreleriyle karşılaştırmalar yapıldı. Ek olarak, DMD3 hastası PCA'de diğer tüm hastalardan ayrı gruplandığı için çalışma kapsamında çıkarıldı.

Kontrol bireylere ve hastalara ait primer hücrelerden elde edilen mitokondriyal proteomun LC-MS/MS analizi sonucunda 120 adet yüksek güvenilirlikte protein tanımlaması yapıldı.

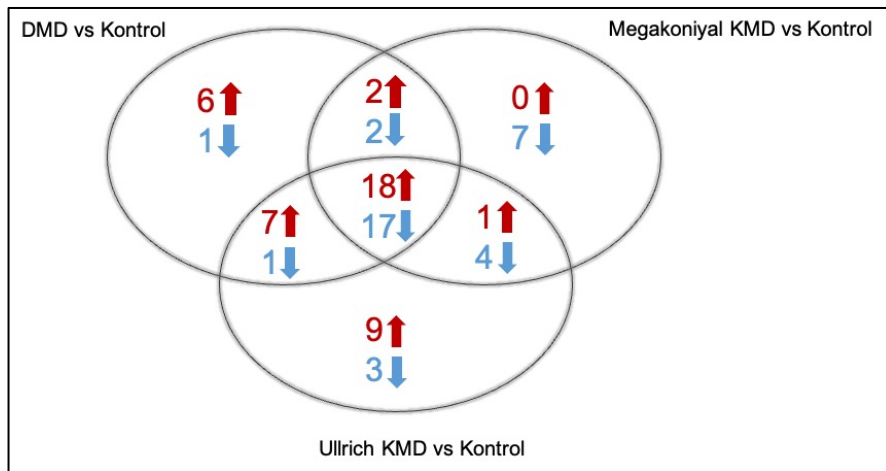
Etiketsiz miktar ölçümü ile saptanan proteinlere ait sonuçlar değerlendirildi ve hasta ve kontrol bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde miktar farklılığı gösteren proteinler listelendi. Sekonder mitokondriyal hasarın gözlemlendiği nöromusküler hastalık gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde miktarı değişen mitokondriyal protein sayıları Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

Hastalık grupları ayrı ayrı kontrol bireyler ile kıyaslandığında;

- DMD hastasının mitokondriyal proteomunda, 33 proteinin miktarında artış ve 21 proteinin miktarında azalış olduğu,
- Megakoniyal KMD hastasının mitokondriyal proteomunda, 21 proteinin miktarında artış ve 30 proteinin miktarında azalış olduğu,
- Ullrich KMD hastalarının mitokondriyal proteomunda, 35 proteinin miktarında artış ve 25 proteinin miktarında azalış olduğu tespit edildi (Şekil 4.11).

Tüm hastalar tek bir grup halinde kontrol bireyler ile kıyaslandığında ise;

- Tablo 4.1’de isimleri verilmiş olan 35 adet mitokondriyal proteinden 18’inin tüm hastalık gruplarında artmış, 17 tanesinin ise azalmış olduğu saptandı (Şekil 4.11).

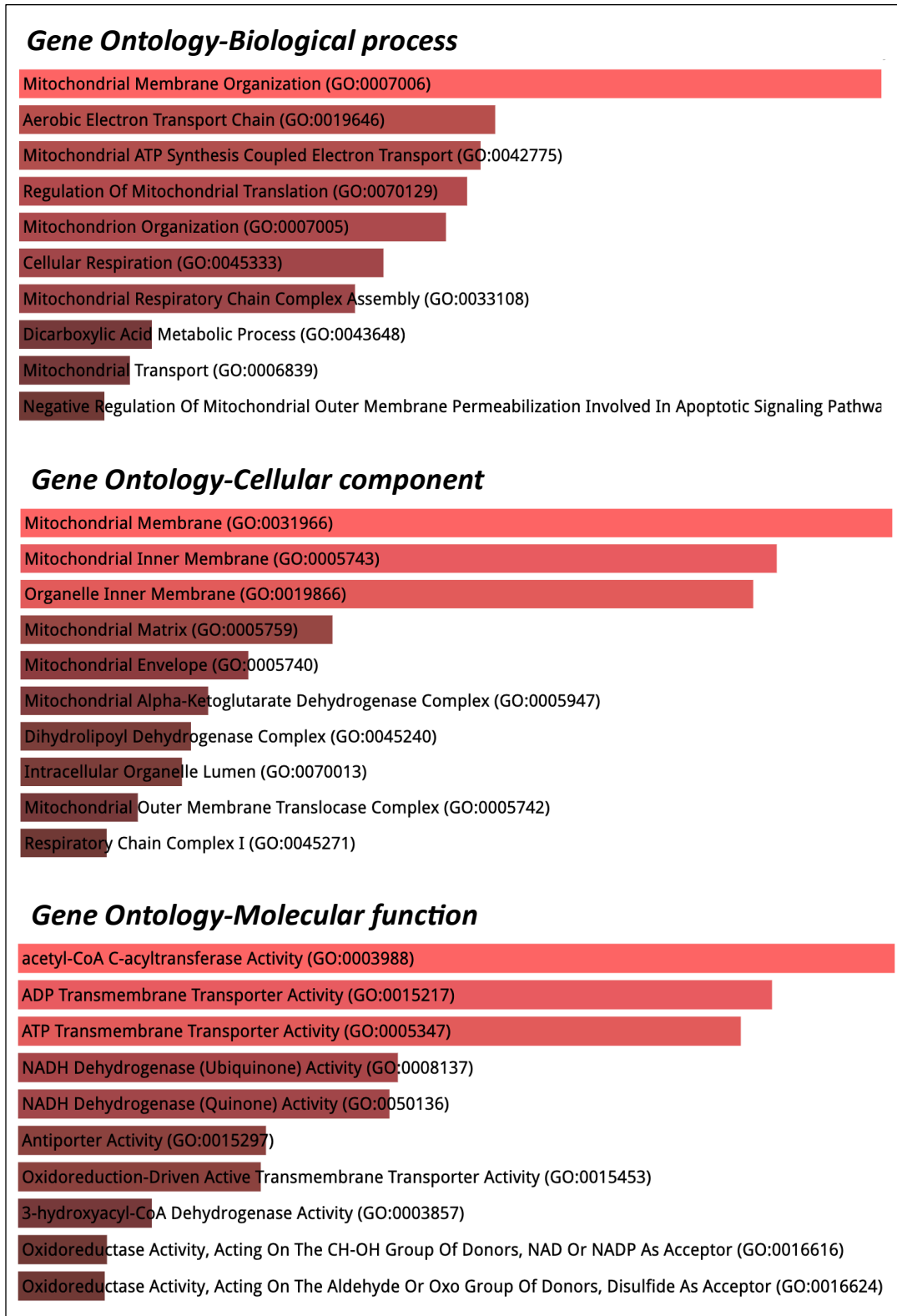


**Şekil 4.11.** LC-MS/MS sonucunda nöromusküler hastalık gruplarında miktar farklılığı saptanan mitokondriyal protein sayılarının (Kırmızı: miktarı artan, Mavi: miktarı azalan proteinler) Venn şeması ile gösterimi.

**Tablo 4.1.** LC-MS/MS sonucunda hastalara ait primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen ortak proteinlerin listesi

Miktarı azalan proteinler		Miktarı artan proteinler	
CAVIN1	<i>Caveolae-associated protein 1</i>	ACAA2	<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>
PMPCB	<i>Mitochondrial-processing peptidase subunit beta</i>	DIP2A	<i>Disco-interacting protein 2 homolog A</i>
SPG7	<i>Paraplegin</i>	UQCRCF1	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial</i>
CASP8AP2	<i>CASP8-associated protein 2</i>	RMND1	<i>Required for meiotic nuclear division protein 1 homolog</i>
MRPL3	<i>39S ribosomal protein L3, mitochondrial</i>	NDUFB6	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6</i>
HSD3B1	<i>3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta 5--&gt;4-isomerase type 1</i>	CIBAR1	<i>CBY1-interacting BAR domain-containing protein 1</i>
ABCD1	<i>ATP-binding cassette sub-family D member 1</i>	PNPLA8	<i>Calcium-independent phospholipase A2-gamma</i>
CKB	<i>Creatine kinase B-type</i>	UBB	<i>Polyubiquitin-B. Calcium-independent phospholipase A2-gamma</i>
DMGDH	<i>Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial</i>	MTERF	<i>Transcription termination factor 3, mitochondrial</i>
SLC25A4	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	HADHA	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</i>
CEP89	<i>Centrosomal protein of 89 kDa</i>	GCKR	<i>Glucokinase regulatory protein</i>
FASTKD3	<i>FAST kinase domain-containing protein 3, mitochondrial</i>	COX15	<i>Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog</i>
SARM1	<i>NAD(+) hydrolase SARM1</i>	SLIRP	<i>SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial</i>
RAB7A	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>	DLST	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex</i>
SLC25A6	<i>ADP/ATP translocase 3</i>	DLD	<i>Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial</i>
SHMT2	<i>Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial</i>	CHCHD3	<i>MICOS complex subunit MIC19</i>
NDUFS1	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial</i>	TOMM22	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog</i>
		MRPS36	<i>Alpha-ketoglutarate dehydrogenase component 4</i>

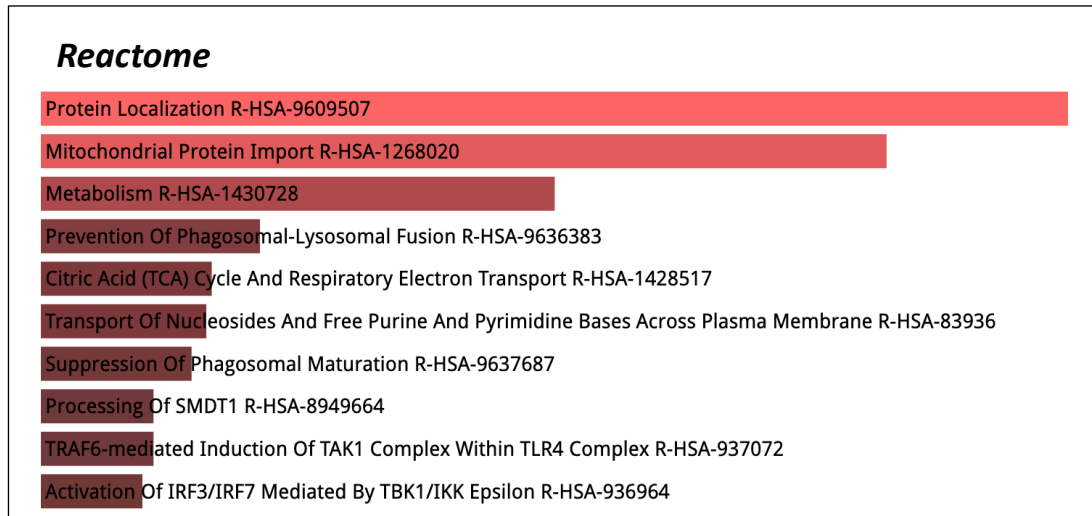
*Gene Ontology* (GO) bilgi tabanı yardımıyla, tez kapsamında çalışılan tüm hastalık gruplarında miktar farklılığı gösteren 35 ortak mitokondriyal proteinin biyolojik süreç (*biological process*), moleküler işlev (*molecular function*) ve hücresel bileşen (*cellular component*) kategorilerine göre gen zenginleştirme analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda, söz konusu proteinlerin mitokondriyal membran organizasyonu, elektron transport zinciri, mitokondriyal ATP sentezi, mitokondriyal translasyonun regülasyonu ve mitokondri organizasyonu gibi süreçlerde görev aldıkları tespit edildi. Ayrıca, bu proteinlerin çoğunluğunun mitokondriyal iç membranda yerleşik olduğu ve asetil ko-A açıl transferaz, ATP-ADP *transporter* ve NADH dehidrogenaz vb. moleküler işlevlere sahip olduğu saptandı (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen ortak proteinlerin *Gene Ontology* (GO)'deki gen zenginleştirme analizi sonuçları. Bar grafikler, p değerine göre sıralanmıştır ( $p < 0,05$ ). Uzun ve daha açık renkli çubuklar terimin/ gen setinin daha anlamlı olduğunu göstermektedir.

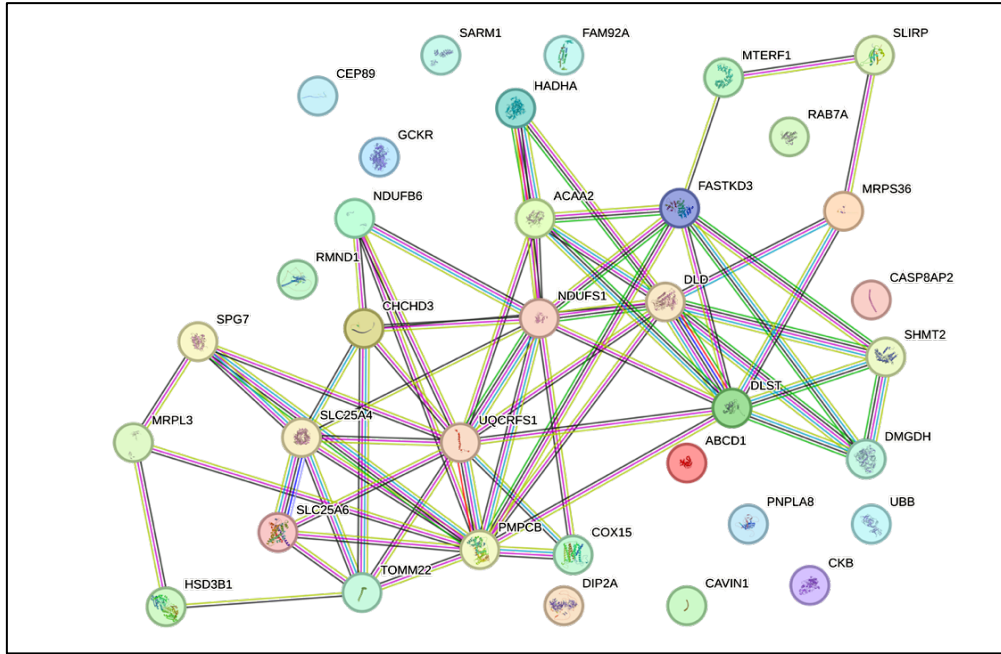


Tez kapsamında çalışılan tüm hastalık gruplarına ait primer miyoblastlarda miktar farklılığı gösteren 35 ortak mitokondriyal proteinin *Reactome* veri tabanında yapılan yolak analizlerinde ise, mitokondriyal protein import yolağının en üst sıralarda yer aldığı saptandı (Şekil 4.13).

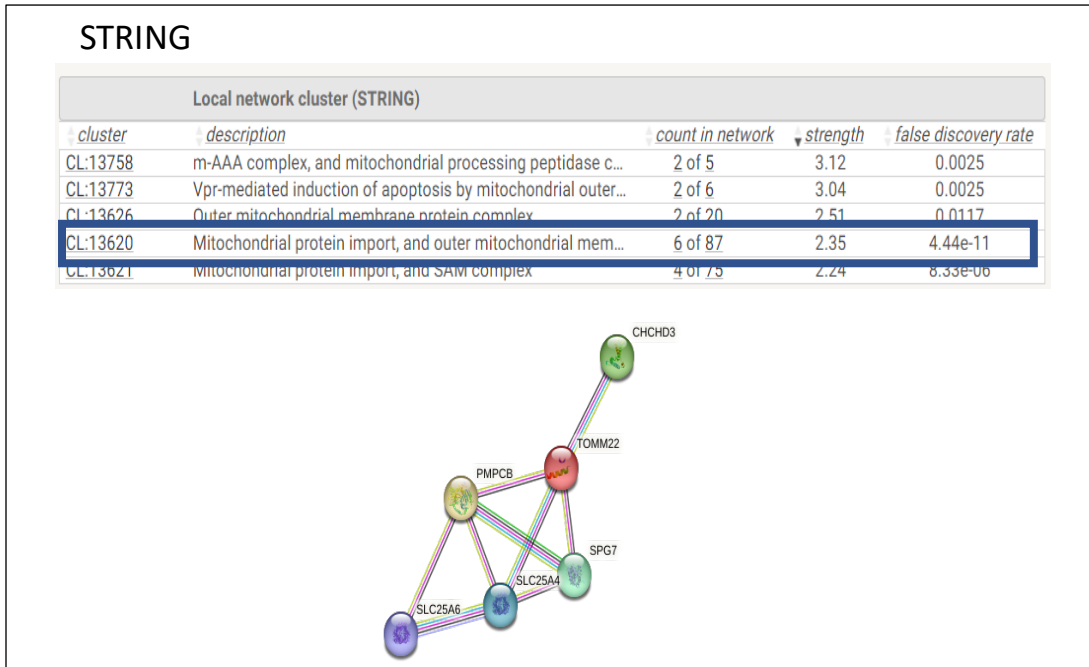


**Şekil 4.13.** Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen ortak proteinlerin *Reactome* veri tabanındaki yolak analizine ait sonuçlar. Bar grafikler, p değerine göre sıralanmıştır ( $p < 0,05$ ). Uzun ve daha açık renkli çubuklar terimin/gen setinin daha anlamlı olduğunu göstermektedir.

Miktar farklılığı saptanan ortak mitokondriyal proteinler ile STRING (2) veri tabanında yapılan işlevsel zenginleştirme ve protein-protein etkileşim analizleri sonucunda elde edilen etkileşim ağı Şekil 4.14'te verilmiş olup, bu proteinler arasında mitokondriyal protein importu ile ilişkili 6 protein (SLC25A6, SLC25A4, PMPCB, SPG7, TOM22, CHCHD3) olduğu tespit edildi (Şekil 4.15).



**Şekil 4.14.** Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen ortak proteinlerin STRING (2) veri tabanından elde edilen protein-protein etkileşim analizleri.



**Şekil 4.15.** Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen mitokondriyal protein importu ile ilişkili 6 proteinin (SLC25A6, SLC25A4, PMPCB, SPG7, TOMM22, CHCHD3) (Üst) STRING (2) veri tabanındaki etkileşim ağı analizine ait sonuçları ve (Alt) protein-protein etkileşim ağı.

Hastalara ait primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı saptanan ve mitokondriyal protein importu ile ilişkili olan 6 ortak protein (SLC25A4, SLC25A6, PMPCB, SPG7, TOM22, CHCHD3) *abundance*, peptit skoru ve kat değişimi gibi parametrelere göre incelendi. İncelemeler sonucunda, tez kapsamında yapılacak validasyon analizleri için söz konusu 6 protein arasından dört aday protein (SLC25A4, SLC25A6, PMPCB, SPG7) belirlendi. Dört proteine ek olarak, mitokondriyal protein sentezi ile ilişkili olduğu bilinen ve yapısındaki hataların kombine oksidatif fosforilasyon hataları ile ilişkilendirildiği MRPL3 proteini de beşinci aday olarak belirlendi. Seçilen aday proteinlerin LC-MS/MS sonucuna göre hasta ve kontrol grupları arasındaki miktarsal farklılıkları Tablo 4.2’de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Mitokondriyal proteomik analizleri sonucunda validasyon için seçilen aday proteinler ve bu proteinlerin LC-MS/MS sonucuna göre hastalık-kontrol grupları arasındaki miktarsal farkları (hasta/kontrol oranı).

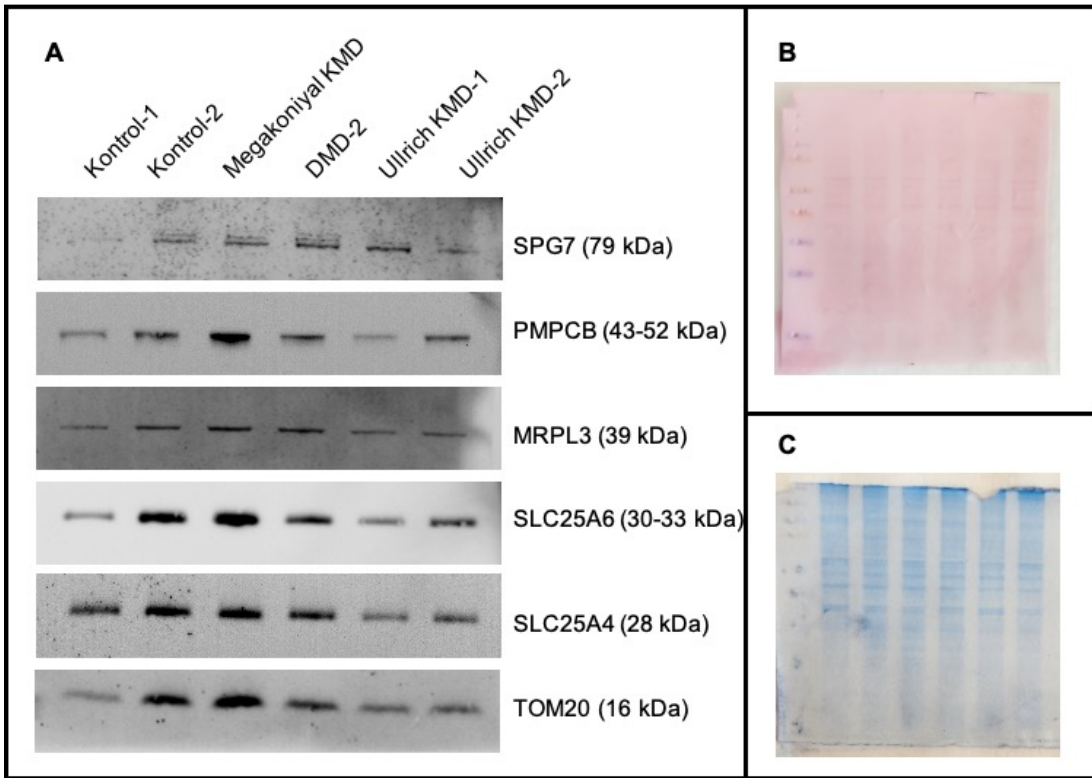
Gen sembolü	Protein adı	DMD vs Kontrol	Megakonyal KMD vs Kontrol	Ullrich KMD vs Kontrol
<b>SLC25A4/ANT1</b>	<i>Solute carrier family 25A4/ADP/ATP translocase 1</i>	0,001	0,001	0,001
<b>SLC25A6/ANT3</b>	<i>Solute carrier family 25A6/ADP/ATP translocase 3</i>	0,001	0,001	0,001
<b>PMPCB</b>	<i>Mitochondrial-processing peptidase subunit beta</i>	0,151	0,001	0,222
<b>SPG7</b>	<i>Paraplegin/mitochondrial metalloprotease protein</i>	0,062	0,12	0,11
<b>MRPL3</b>	<i>39S ribosomal protein L3</i>	0,015	0,001	0,042

#### 4.6. Aday Olarak Seçilen Mitokondriyal Proteinler (SLC25A4, SLC25A6, PMPCB, SPG7, MRPL3) için LC-MS/MS Analiz Sonuçlarının Doğrulanması

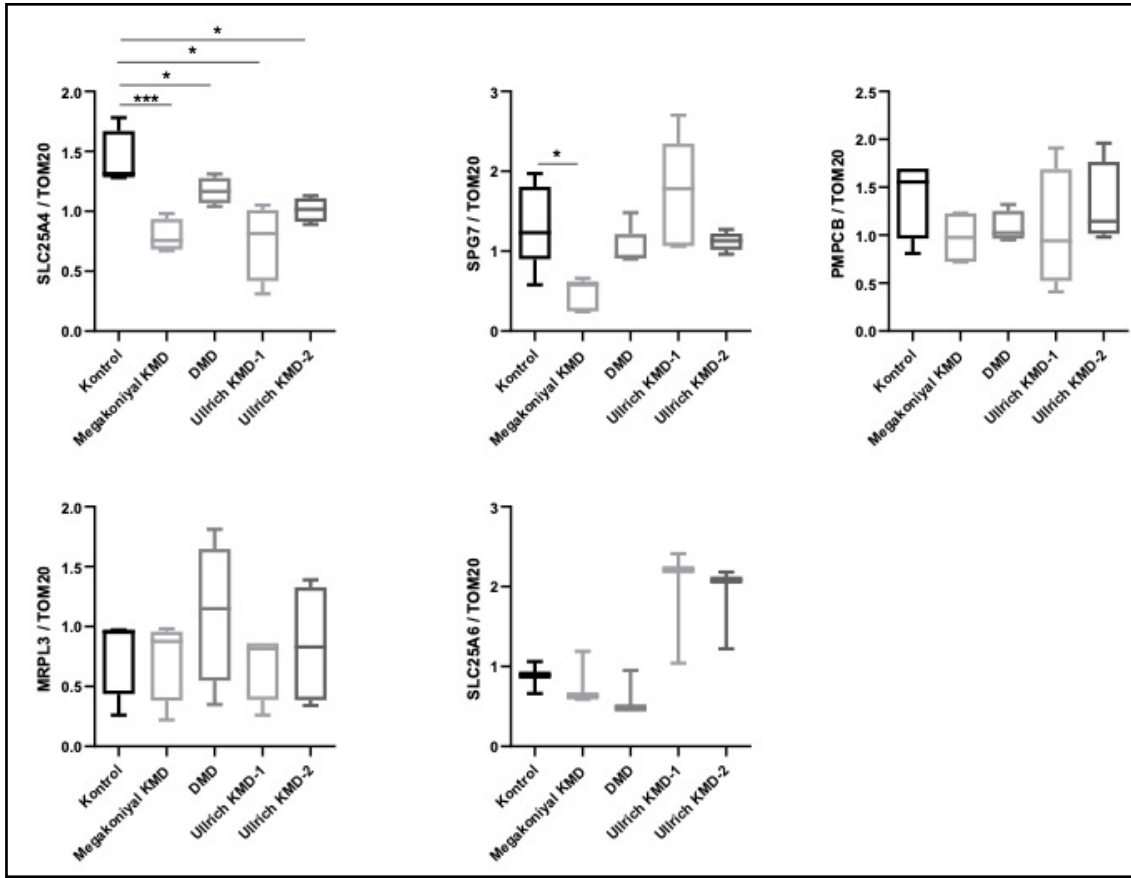
Mitokondriyal proteomik analizler sonucunda, mitokondriyal fraksiyondaki miktarları hasta ve kontrol primer miyoblastları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişen aday proteinlerin ifadesi ilgili antikorlar yardımıyla *Western Blot* yöntemiyle analiz edildi. Mitokondriyal fraksiyonlarda ilgili proteinlerin ifadesi analiz

edilirken normalizatör olarak mitokondri belirteci olan TOM20 kullanılırken, eşit protein yüklemesi kontrolü için *Ponceau's red* membran boyaması ve *Coomassie brilliant blue* jel boyaması yapıldı (Şekil 4.16).

*Western Blot* analizlerinde, LC-MS/MS analizi ile benzer şekilde iki kontrolün ortalaması alınarak hesaplamalar yapıldı. Analizler sonucunda, tüm hasta gruplarına ait primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlardaki SLC25A4 miktarının, proteomik analizler ile uyumlu şekilde, kontrol hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.17). Ek olarak, SPG7 protein miktarının yalnız Megakoniyal KMD hastasında ait mitokondriyal fraksiyonda istatistiksel olarak anlamlı şekilde ~%50 oranında azalmış olduğu saptandı (Şekil 4.17).



**Şekil 4.16.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda *Western Blot* ile aday mitokondriyal proteinlerin ifade analizi (LC-MS/MS analiz sonuçlarının validasyonu) **(A)** *Western Blot* fotoğrafı (TOM20: normalizatör), **(B)** *Ponceau's red* membran boyaması ve **(C)** *Coomassie brilliant blue* jel boyaması ile eşit protein yüklemesi kontrolü.

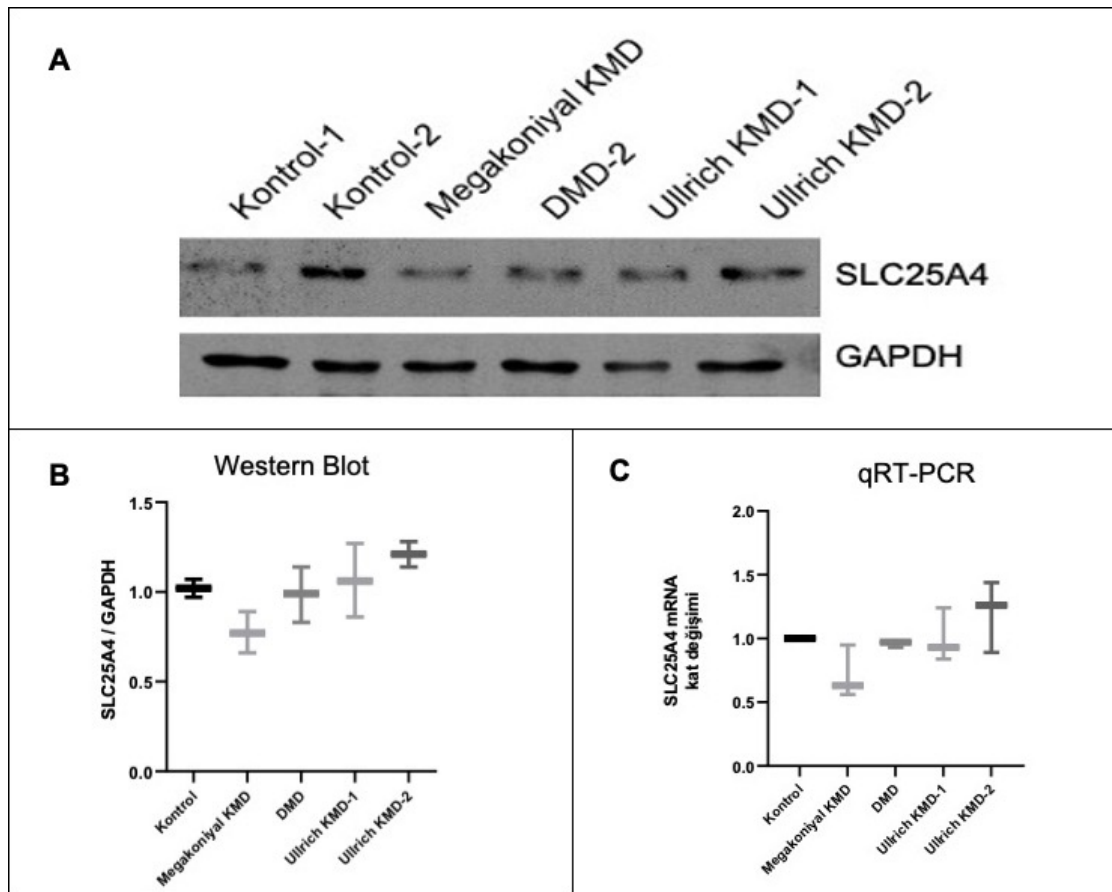


**Şekil 4.17.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlarda aday proteinler için yapılan *Western Blot* analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi. Deneyler üçer kez tekrar edildi ve veriler istatistiksel olarak *Mann-Whitney U* Test ile analiz edildi (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.7. Hasta ve Kontrol Primer Miyoblastlarında Öncelikli Aday SLC25A4'ün İfadesinin ve Mitokondriyal Yerleşiminin Analizi

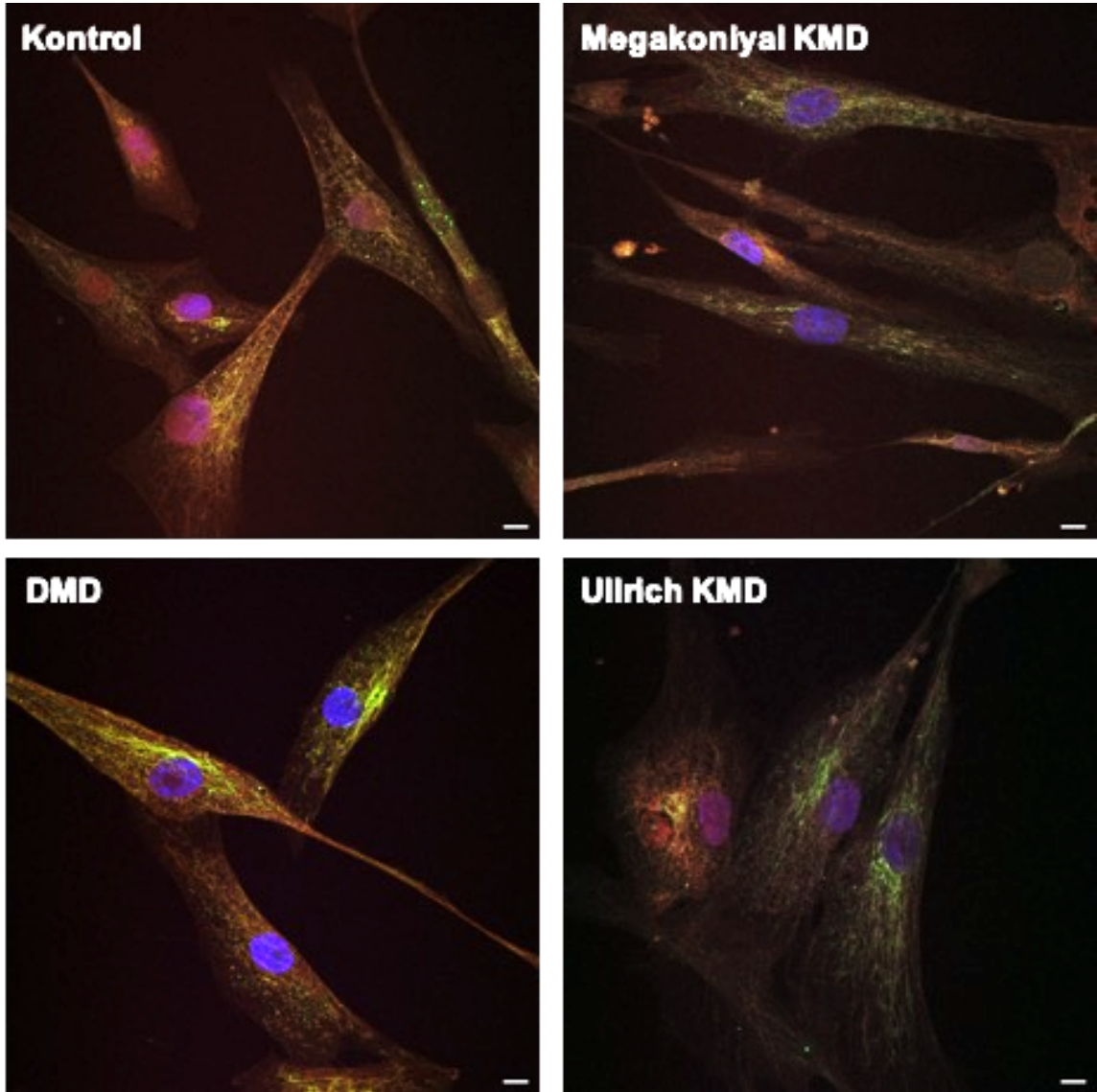
Tez kapsamında çalışılan tüm hastalık gruplarında mitokondriyal fraksiyonlardaki miktar azalışı *Western Blot* ile doğrulanan SLC25A4 proteini, öncelikli aday protein olarak seçildi. Hastalara ait primer miyoblastlarda saptanan SLC25A4 protein miktarı azalışının, mitokondriyal fraksiyona özgül olup olmadığını anlamak amacıyla; total hücredeki SLC25A4 ifadesi RNA ve protein seviyesinde kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi. *Western Blot* analizinde total proteinlerin ifadesi analiz edilirken normalizatör

olarak GAPDH kullanıldı. *Western Blot* ve qRT-PCR analizlerinde, LC-MS/MS analizi ile benzer şekilde iki kontrolün ortalaması alınarak hesaplamalar yapıldı. Hasta ve kontrol primer miyoblastlarından izole edilen total protein ve RNA'lar ile gerçekleştirilen sırasıyla *Western Blot* ve qRT-PCR analizleri sonucunda, hasta gruplarına ait örneklerde hem protein hem de RNA seviyesinde SLC25A4 ifadesinin kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmediği tespit edildi (Şekil 4.18). Hastalara ait primer miyoblast hücrelerinde, total hücrenin aksine, sadece mitokondriyal fraksiyonda SLC25A4 protein miktarının azaldığı sonucuna varıldı.



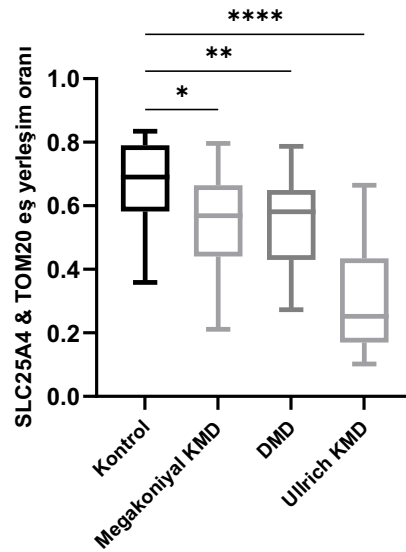
**Şekil 4.18.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlarında total SLC25A4 ifadesinin *Western Blot* ve qRT-PCR ile protein ve RNA seviyesinde analizi **(A)** *Western Blot* analizi, **(B)** *Western Blot* analizi sonucunun grafiksel gösterimi ve **(C)** qRT-PCR analiz sonuçlarının grafiksel gösterimi. Deneyler üçer kez tekrar edildi ve veriler istatistiksel olarak *Mann-Whitney U Test* ile analiz edildi.

Hasta hücrelerinde SLC25A4 proteininin mitokondriye yerleşiminin azaldığının doğrulanabilmesi amacıyla, SLC25A4 ve TOM20 antikorlarıyla eş immünfloresan boyama yapıldı. Eş immünfloresan boyamalarına ait temsili görüntüler Şekil 4.19'da verilmiştir.



**Şekil 4.19.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlarında SLC25A4-TOM20 eş immünfloresan boyamasının konfokal mikroskopi görüntüleri. Yeşil/FITC: SLC25A4, Kırmızı/Texas Red: TOM20/mitokondri, mavi/DAPI: çekirdek (Ölçek: 10  $\mu$ m; Mikroskop: Zeiss LSM 980 Dual Line NLO system)

Boyama sonrasında konfokal mikroskofta Z düzleminde alınan 0,5  $\mu\text{m}$ 'lik optik kesitlerde, SLC25A4-TOM20 eş yerleşimi kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Fiji 2.9.0 / 1.54f (135) programındaki "Colocalization Threshold" eklentisi kullanılarak yapılan analizler sonucunda, tüm hasta hücrelerinde SLC25A4 proteininin TOM20 ile eş yerleşiminin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.20) ve SLC25A4'ün mitokondriye yerleşiminin azaldığı sonucuna varıldı.



**Şekil 4.20.** Hasta ve kontrol primer miyoblastlarında SLC25A4 proteininin TOM20 ile eş yerleşiminin analizi. Tüm preparatlarda en az 30 hücre analiz edildi. Veriler istatistiksel olarak *Mann-Whitney U Test* ile analiz edildi (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).



## 5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında, farklı nükleer genlerin sorumlu olduğu nadir nöromusküler hastalıklardan; DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD etiopatogenezinde sekonder olarak gözlenen mitokondri hasarının mitokondriyal protein import mekanizması ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak hasta ve kontrol bireylere ait primer miyoblastlara, ACO2 proteinine ait mitokondriyal sinyal dizisi içeren pcDNA3/Mito-GFP plazmidi transfekte edilmiş ve transfekte hücrelerde mitokondrilerde yerleşim gösteren GFP miktarı karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, tüm hastalarda MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde kontrol hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma gözlenmiş (~%50, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) ve DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD hastalıklarında mitokondriyal protein import mekanizmasında (*Pre-sequence/* TIM23 import yolağı) hasar olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.4 ve 4.5).

Primer miyoblastların transfeksiyon kapasitelerinin düşük olduğu ve farklı çalışmalarda lipozomal ya da non-lipozomal transfeksiyon ajanlarıyla en yüksek %10-30 seviyelerinde transfeksiyon etkinliğine ulaşıldığı bilinmektedir (141-143). Tez çalışmasında, hasta ve kontrol primer miyoblastlarına mitokondriyal protein import analizi kapsamında yapılan pcDNA3/Mito-GFP transfeksiyonu için farklı transfeksiyon ajanları (Lipofektamin 2000, Lipofektamin 3000 ve FuGENE HD) ile denemeler yapılmış ve en yüksek transfeksiyon etkinliği Lipofektamin 3000 ile %20 olarak belirlenmiştir. Ancak, daha fazla transfekte hücrede MitoGFP-TOM20 eş yerleşimini analiz etmek deney sonuçlarımızın güvenilirliği açısından avantaj sağlayacağından, transfeksiyon etkinliği artırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, elektroporasyon temelli transfeksiyon gerçekleştiren *Nucleofector* (Lonza Biotechnology) cihazı kullanılmıştır. Yapılan farklı nükleofeksiyon denemeleri sonucunda transfeksiyon etkinliği %58'e yükseltilmiştir. Literatürde yapılmış olan farklı bir çalışmada da primer myoblastlarda nükleofeksiyon yöntemiyle benzer transfeksiyon etkinliğine ulaşılmıştır (144). Bu nedenle, primer miyoblastlara transfeksiyon amacıyla nükleofeksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Bunun yanı sıra; tez kapsamında yapılmış olan mitokondriyal protein import analizi, *pre-sequence*/ TIM23 import yolağını araştırmaya yönelik olup, literatürde diğer mitokondriyal protein import mekanizmalarını araştırmaya yönelik bir analiz metodu bulunmamaktadır. *Pre-sequence*/ TIM23 import yolağı, mitokondriyal proteinlerin %60'ının importundan sorumlu olduğu için literatürde mitokondriyal import mekanizmasına yönelik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (9, 145). Tez çalışmasında yapmış olduğumuz mitokondriyal protein import analizi sonucunda hipotezimize uygun şekilde, DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD hastalıklarında mitokondriyal protein import mekanizmasında (*pre-sequence*/ TIM23 import yolağı) hasar olduğu saptanmıştır. Bu hastalıklarda ortak ve sekonder mitokondri hasarı tablosunu (morfoloji bozukluğu, ATP azalışı, ROS artışı, düşük membran potansiyeli) gösteren çalışmalar (21-28) olmasına rağmen, mitokondriyal protein import mekanizmasını araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Tez çalışması, bu yönüyle sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili nöromusküler hastalıklarda mitokondriyal protein import mekanizmasının bozulduğunu gösteren ilk çalışma niteliğindedir.

Tez çalışmasının devamında, sekonder mitokondri hasarının gözlemlendiği nöromusküler hastalıklarda iskelet kas dokusunda artışını tespit etmiş olduğumuz ve işlevsel analizlerle mitokondri hasarı ile direkt olarak ilişkilendirdiğimiz miR-382-5p'nin mitokondriyal protein import mekanizması (*pre-sequence*/ TIM23 import yolağı) ile ilişkisi aydınlatılmıştır. Geçtiğimiz son on yılda yapılan araştırmalar, miRNA'ların fizyolojik ve patolojik hücresel süreçlerde mitokondri işlevinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceği ile ilgili sonuçlar ortaya çıkarmıştır (130, 146). Nükleer genomdan kodlanan bazı miRNA'ların ise; mitokondriyal metabolizma ve biyosentez, mitokondri dinamiği, hücre içi kalsiyum homeostazi, mitofaji ve apoptoz gibi mitokondri işlevi ile ilişkili yollarda görev alan genlerin ifadesini düzenlediği bulunmuştur (130, 147). Bunun yanı sıra, miRNA'ların hücresel regülasyonlarındaki değişimlere bağlı olarak ortaya çıkan mitokondriyal hasarın, nörodejeneratif hastalıklar ve kalp hastalıkları gibi birçok farklı hastalığın ortaya çıkmasında veya gelişiminde de rol oynadığı gösterilmiştir (147-149).

Yapmış olduğumuz bir çalışmada, farklı genetik kökenlere sahip nöromusküler hastalıklarda (DMD, Megakoniyal KMD, Ullrich KMD ve alfa-distroglikanopati) ortak olarak gözlenen mitokondri hasar tablosu ile ilişkili ortak miRNA profili belirlenmiştir (29). *Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array* yardımıyla iskelet kas biyopsileri ile gerçekleştirilen miRNA mikrodizin analizi sonucunda, 17 miRNA'nın analiz edilen tüm hasta gruplarında, kontrol örneklerle kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ifade artışı gösterdiği saptanmıştır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, bu 17 miRNA'dan 10 tanesinin hedef genlerinin mitokondriyal yollarla ilişkili olduğu saptanmış olup, miRNA'lar *Gene Ontology* (GO)- 'Biyolojik Süreç' kategorisinde terim zenginleştirme analizi sonuçlarına göre değerlendirildiğinde 8 tanesinin hedef genlerinin mitokondriyal protein transportu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 2.2). Ancak, birden fazla mitokondriyal yolla ilişkili olduğu bulunan ve farede korunduğu bilinen dört öncelikli aday miRNA'nın (miR-134-5p, miR-708-5p, miR-382-5p ve miR-409-3p) arttırılmış ifadelerinin doğrudan mitokondri işlevi üzerindeki etkileri, C2C12 fare miyoblastlarında araştırılmıştır. Hasta gruplarındaki miRNA artışını taklit etmek amacıyla, aday miRNA'lar C2C12 fare miyoblastlarına transfekte edilmiş ve mitokondriyal morfoloji/ işlev analizleri (mitokondri dinamiği/morfolojisi analizi, MTT-metabolik aktivite analizi ve ATP üretimi analizi) gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda, kas hücrelerinde artmış miR-382-5p ve miR-409-3p ifadesinin ATP üretiminde azalışa ve mitokondri ağ yapısında bozulmaya sebep olduğu gösterilerek, bu miRNA'lardaki ifade artışının direkt olarak mitokondri hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 2.3 ve 2.4, yayınlanmamış veri).

Tez çalışması kapsamında mitokondri hasarı ile direkt ilişkilendirilmiş olan söz konusu iki miRNA (miR-382-5p & miR-409-3p), C2C12 hücrelerine pcDNA3/mitoGFP plazmidi ile birlikte transfekte edilmiş ve transfekte hücrelerde mitoGFP-TOM20 eş yerleşimi analiz edilmiştir. Analizler sonucunda miR-409-3p'nin aksine, miR-382-5p transfekte edilmiş hücrelerdeki MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde istatistiksel olarak anlamlı şekilde ~%50 oranında azalma olduğu gösterilmiş (\*\*\*) $p < 0.001$ ) ve miR-382-5p ifade artışının mitokondriyal protein import mekanizması hasarına neden olduğu tespit

edilmiştir (Bkz. Şekil 4.6 ve 4.7). Bu çalışma ile, mitokondriyal protein import mekanizması ile tez kapsamında çalışılan hastalıklarda ifadesi arttığı tespit edilmiş olan miR-382-5p arasında bağlantı kurularak, nöromusküler hastalıklarda ortak olarak gözlenen mitokondriyal import mekanizması hasarının sebebinin artmış miR-382-5p olabileceği yönünde tamamlayıcı nitelikte bir veri elde edilmiştir.

miR-382-5p'nin mitokondriyal işlevlerle ilişkilendirildiği çalışmalar mevcut olsa da (150, 151), bu miRNA'nın mitokondriyal protein importu ile ilişkisi günümüze kadar gösterilmemiştir. Dahlmans ve ark. (150) tarafından C2C12 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, miR-382-5p'nin baskılanması sonucunda mitokondriyal dinamik ve biyogenez ile ilişkili genlerin ifadesinde artış; mitokondriyal ribozomda sentezlenen proteinlerin ve solunum zinciri proteinlerinin ifadesinde ise azalma olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada miR-382-5p'nin baskılanmasının mitonükleer protein dengesini bozduğu sonucuna varılmıştır. Zhou ve ark. (151) tarafından yapılmış başka bir çalışmada ise, miR-382'nin tümör ilişkili makrofajlarda mitokondriyal biyogenezde rolü olan *Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator (PGC-1α)* genini hedeflediği tespit edilmiştir.

Tez çalışmasına ek olarak yapılan *in-silico* analizlerde, miR-382-5p'nin bağlanma olasılığı olan genler miRWalk 2.0 veri tabanı ile belirlenmiş ve bu genler Human MitoCarta2.0 listesindeki mitokondriyal genler ile karşılaştırılarak, miR-382-5p'nin olası mitokondriyal hedef genleri belirlenmiştir. Bu gen listesi ile *Gene Ontology (GO)*-'Biyolojik Süreç' kategorisinde yapılan gen zenginleştirme analizleri sonucunda, mitokondriyal protein importu ile ilişkili üç hedef protein (*Translocase of inner mitochondrial membrane 17A (TIMM17A)*, *Translocase of outer mitochondrial membrane 40 like (TOMM40L)*, *GrpE protein homolog 2 (GRPEL2)*) olduğu tespit edilmiştir. Tez devamında yapılacak olan çalışmalarla, potansiyel hedef genlerin hastalara ait primer miyoblast hücrelerindeki ifadesi araştırılacak ve devamında 3'-UTR lusiferaz aktivite analizi ile miR-382-5p ile fiziksel interaksyonları analiz edilebilecektir.

Son yıllarda tedavi amaçlı kullanılan miRNA patentlerinin sayısı giderek artmakta olup, patentlerin büyük çoğunluğu kanser ve inflamatuvar hastalıkların tedavilerinde

kullanılması önerilen miRNA'larla ilişkilidir. Ek olarak, metabolik ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisine yönelik miRNA patentleri de mevcuttur. Bu miRNA'lardan bazıları klinik-öncesi, faz I ve II klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (152). Dolayısıyla, sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili olduğu saptanmış olan miRNA'lar ve hedef genleri de tedavi hedefi olma potansiyelini taşımaktadır. Bunun yanı sıra, miR-382-5p'nin mitokondriyal protein import mekanizması hasarı ile ilişkili olduğunun tespit edilmiş olması, bu miRNA'nın ifade artışı gösterdiği ya da patomekanizmasında mitokondriyal protein import mekanizması hasarı olan farklı hastalıkların patogenezlerinin aydınlatılmasına da katkı sağlayacaktır.

Tez çalışmasının ikinci kısmında, optimize edilen "*hypotonic swelling*" yöntemi ile hasta ve kontrol primer miyoblast hücrelerinden mitokondriyal fraksiyon izole edilmiş ve LC/MS-MS ile proteomik analizler gerçekleştirilerek hastalara ait mitokondriyal fraksiyonda miktarları değişen aday proteinler tespit edilmiştir.

Literatürde proteomik, metabolomik vb. yüksek ölçekli -omik analizleri veya mitokondriyal işlev testleri gibi farklı amaçlara yönelik olarak, çok çeşitli biyolojik kaynaklardan mitokondri izolasyonu yapılmaktadır. Mitokondri izolasyonu için birçok farklı yöntem tanımlanmıştır. Bazı çalışmalarda mitokondri izolasyon kitleri kullanılırken, bazılarında ayırıcı santrifüj (*differential centrifugation*) veya ultrasantrifüj (*density-gradient centrifugation*) yöntemleri kullanılmıştır (153-157). Bu yöntemlerin kendi içinde farklı avantajları ve dezavantajları bulunmakla beraber, her izolasyon yöntemi her hücre/doku tipine uygun olmamaktadır. Örneğin, ultrasantrifüj yönteminde mitokondri saflaştırılması sürecinde çok fazla protein kaybedildiği için başlangıç hücre sayısının yaklaşık  $1 \times 10^9$  hücre (yaklaşık 200 adet T75 flask) olması gerektiği belirtilmiştir (158). Primer hücreler sınırlı sayıda proliferasyon kapasitesine (*Hayflick limit*) sahip oldukları için daha az sayıda hücreden izolasyon yapılabilmekte ve ultrasantrifüj yöntemi kullanılamamaktadır. Ek olarak, izolasyon sonrası yapılacak olan deney türüne göre de izolasyon yöntemi değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, mitokondriyal proteomik çalışmalarında mitokondrilerin canlılığının ve solunum kapasitelerinin korunması gerekli

değilken; sitoplazma, çekirdek gibi diğer hücresel kompartmanların mitokondriyal fraksiyondan uzaklaştırılması büyük önem arz etmektedir.

Tez kapsamında iki farklı izolasyon kiti (*Qproteome mitochondria isolation kit-Qiagen & Mitochondria isolation kit for cultured cells-Thermo Scientific*) ile denemeler yapılmış, ancak sitoplazma ve çekirdek kontaminasyonu sebebiyle saf bir mitokondri fraksiyonu elde edilememiştir. Öte yandan ayırıcı santrifüj yönteminde, hücreleri toplama şekli, parçalama şekli, mitokondri izolasyon tamponu, santrifüj hızları gibi parametreler değiştirilerek otuz farklı protokol uygulanmış ve her izolasyon sonrasında izole edilen fraksiyonun *Western Blot* ile kalite kontrolü sonucunda saf mitokondri pelleti elde edilemediği gözlemlenmiştir. Ek olarak, kitten bağımsız olarak yapılan mitokondri izolasyonunun en önemli parametrelerinden biri hücreleri parçalama şeklidir. Literatürdeki çalışmalarda farklı hücre tipleri için sonikasyon, homojenizasyon, şırıngadan geçirme gibi yöntemler kullanılmıştır (153, 154, 159). Optimizasyon denemelerinde, sonikasyon yöntemi ile C2C12 fare miyoblast hücre hattından saf mitokondri fraksiyonu elde edilirken, aynı yöntemle primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonda sitoplazmanın uzaklaştırılmadığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, tez kapsamında primer miyoblast hücrelerinden mitokondri izole edilmesi amacıyla *Dounce* homojenizatör kullanılmıştır.

Literatürde mitokondri izolasyonu amacıyla çok farklı tampon içerikleri kullanıldığı görülmektedir. Bazı çalışmalarda, tez çalışmasında kullandığımız gibi yüksek konsantrasyonda sukroz ve düşük konsantrasyonda mannitol kullanılırken (160, 161), bazılarında ise yüksek konsantrasyonda mannitol ve düşük konsantrasyonda sukroz (162, 163) kullanılmıştır. Mannitolün osmotik olarak aktif olması ve mitokondri membranına nüfuz etmesi sebebiyle mitokondri izolasyonunda yüksek konsantrasyonda kullanılmaması, onun yerine yüksek konsantrasyonda sukroz içeren izolasyon tamponlarının kullanılması önerilmektedir (136). Bunun yanı sıra, literatürde mitokondri izolasyon tamponunda yağsız BSA kullanıldığı görülmektedir (160, 164-168). Yağsız BSA'nın hücre parçalandığında ortaya çıkan yağ asitlerini tutarak mitokondriilerin hasar

görmesini engellediği ve oksidatif fosforilasyon için gerekli olduğu bilinmektedir (166, 167). Solunum testi gibi işlevsel analizlere yönelik yapılan mitokondri izolasyonlarında, kullanılan izolasyon tamponlarında BSA kullanılması önerilirken, protein kantitasyonu amaçlı çalışmalarda kontaminasyon yaratmaması için kullanımı önerilmemektedir. Tez kapsamında proteomik çalışması için mitokondriyal fraksiyon izole edildiğinden, SOL izolasyon tamponuna BSA eklenmemiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan mitokondri izolasyonu denemelerinde, ayırıcı santrifüjlerin hızları ve sürelerinin de mitokondri izolasyon kalitesini belirleyen diğer faktörlerden olduğu ve uygun şekilde santrifüj yapılmasına dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Parçalanmayan hücrelerin ve çekirdeklerin uzaklaştırıldığı ilk santrifüj basamağında santrifüj hızı düşük veya süresi kısa olursa, mitokondriyal fraksiyonda hem sitoplazmik hem de çekirdek kontaminasyonu gözlenirken; santrifüj hızının yüksek veya süresinin uzun olduğu durumda mitokondriyal proteinlerin kaybedildiği saptanmıştır. Mitokondrilerin çöktürüldüğü santrifüj basamaklarında ise, hız düşük veya süre kısa olduğunda izole edilen mitokondri miktarında azalma, tam tersi durumda da mitokondriyal fraksiyonda sitoplazma kontaminasyonu gözlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan primer hücrelerden mitokondriyal fraksiyonun izolasyonu çalışmaları sonucunda, bahsi geçen tüm koşullar ve solüsyonlar optimize edilerek “*hypotonic swelling*” yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu yöntem, temel olarak ayırıcı santrifüj temelli olsa da, homojenizasyon öncesi hücrelerin hipotonik ortamda bekletilerek şişirilmesi ve devamında patlatılmasıyla hücresel fraksiyonların daha rahat ayrılabilirdiği ek aşamaları da içermektedir (136). Bu yöntemle izole edilen mitokondriyal fraksiyonda, proteomik analizler için uygun olacak şekilde sitoplazma ve çekirdek kontaminasyonunun bulunmadığı tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.8). Tez çalışmasında, her hasta ve kontrol primer miyoblastları için toplam üçer T75 flasktan mitokondriyal fraksiyon izole edildikten sonra proteomik analizler gerçekleştirilmiştir. LC-MS/MS tekniğinde her örnek üç kez MS kolonundan geçirilecek şekilde okunmuş ve analiz edilmiştir.

Hastalardan elde edilen primer hücreler hastalıkları en iyi yansıtan biyolojik kaynaklardan biri olmasına rağmen, tez kapsamında yapılan mitokondriyal proteomik çalışmalarında bazı dezavantajlar ile karşılaşmıştır. Primer hücrelerin sınırlı proliferasyon kapasiteleri nedeniyle, iskelet kas dokusu ve sınırsız bölünebilen hücre hatlarına kıyasla daha kısıtlı sayıdaki hücreden mitokondri izolasyonu yapılabilmektedir. Devamında, LC-MS/MS analizi için cihaza yüklenen protein miktarının da kısıtlı olması 120 adet yüksek güvenilirlikte protein tanımlamasına imkan sağlamıştır. Blanco-Fernandez ve ark. (169)'nın yaptığı bir çalışmada, mitokondri izolasyonu yapılan hücre sayısı tez kapsamında kullanılan hücre sayısının 70 katı olduğu için, LC-MS/MS analizi sonucunda tanımladıkları protein sayısı tez kapsamında tanımlanan protein sayısının 3 katı olmuştur. LC-MS/MS cihazına yüklenen protein miktarı ile tanımlanan protein sayısının doğru orantılı olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra literatürde, iskelet kas dokusu ve miyoblast hücre hatlarıyla yapılan mitokondriyal proteomik çalışmaları mevcuttur (170, 171). Ancak, tamamlanan tez çalışması primer miyoblastlardan mitokondri izolasyonu sonrasında kalite kontrolünün yapılarak gerçekleştirildiği ilk mitokondriyal proteomik çalışmasıdır.

LC-MS/MS sonucunda, hasta ve kontrol bireylere ait mitokondriyal fraksiyondaki protein miktarları karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Elde edilen yüksek ölçekli veri setlerinin değerlendirilmesi ile hasta bireylerde kontrollere kıyasla miktar farklılığı gösteren 35 adet (18 artan ve 17 azalan) mitokondriyal protein tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Bu protein listesi ile yapılan *Gene Ontology* analizleri sonucunda, bu proteinlerin mitokondriyal membran organizasyonu, ETZ, mitokondriyal ATP sentezi, mitokondriyal translasyonun regülasyonu ve mitokondri organizasyonu gibi süreçlerde görev aldığı tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.12). Membran organizasyonu ve mitokondriyal protein importu ilişkili süreçlerdir. Membrandaki lipit kompozisyonunun membran organizasyonunu, translokazların yerleşimini ve dolayısıyla mitokondriyal protein importu etkilediği gösterilmiştir. Örneğin, Megakoniyal KMD hastalığının patogeneğinde de gözlenen fosfatidilkolin (PC) eksikliğinin membran organizasyonunu ve TIM23 kompleksinin stabilizasyonunu bozduğu bilinmektedir (32, 172). Tez kapsamında çalışılan



üç hastalıkta da mitokondriyal membran organizasyonu ile ilişkili proteinlerin miktar farklılığı göstermesi, mitokondriyal protein importu ile ilişkilendirilebilir. Ek olarak, ATP üretimi ve mitokondriyal protein importu karşılıklı etkileşimde olan iki süreç olarak nitelendirilmektedir. Mitokondriyal protein importu için ATP'ye ihtiyaç duyulmasının yanı sıra, ATP üretimi için gerekli solunum zinciri proteinlerinin membrana yerleşimi için de import proteinlerinin gerekli olduğu bilinmektedir (15-17). Tez kapsamında çalışılan tüm hastalık gruplarında iskelet kasında ATP miktarının azaldığı bilinmektedir (21-23, 25). Bu bilgiler ışığında, tez kapsamında mitokondriyal protein import hatası saptadığımız primer miyoblastlarda ATP sentezi ve ETZ yolaklarında da hasar olması beklenen bir sonuçtur.

*Reactome* veri tabanında yapılan yolak analizlerinde, tezin hipotezine uygun şekilde hastalarda miktarı değişen mitokondriyal proteinlerin, protein lokalizasyonu ve mitokondriyal protein import yolağı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. STRING (2) veri tabanında yapılan protein etkileşim analizleri sonucunda elde edilen etkileşim ağına bakıldığında, 22 proteinin birbiriyle etkileşim içinde olduğu, 13 proteinin ise diğerleriyle etkileşimi olmadığı saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.14). Bu etkileşim ağına, mitokondriyal protein importu ile ilişkili olan 6 protein (SLC25A6, SLC25A4, PMPCB, SPG7, TOM22, CHCHD3) olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.15). Bu proteinler *abundance*, peptit skoru ve kat değişimi gibi parametrelere göre incelenmiş olup öncelikli olarak dört aday protein (SLC25A4, SLC25A6, PMPCB, SPG7) belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, mitokondriyal protein sentezi ile ilişkili olduğu bilinen ve yapısındaki hataların kombine oksidatif fosforilasyon hataları ile ilişkilendirildiği MRPL3 proteini de beşinci aday protein olarak seçilmiştir (Bkz. Tablo 4.3).

Proteomik analizlerin doğrulanması amacıyla aday beş protein için yapılan *Western Blot* analizleri sonucunda, *ADP/ATP transporter'* olarak görev yapan SLC25A4 proteininin miktarının, proteomik analizler ile uyumlu şekilde, hasta hücrelerinin mitokondriyal fraksiyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.16 ve 4.17). Tüm hasta gruplarında mitokondriyal fraksiyonda miktarının azaldığı tespit edilen SLC25A4'ün total hücredeki ifadesi RNA ve protein seviyesinde analiz

edildiğinde ise, hasta gruplarında hem protein hem de RNA seviyesinde SLC25A4 ifadesinin değişmediği tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.18). Bu bilgiler ışığında, *SLC25A4* gen ifadesinin hastalarda azalmadığı, ancak proteinin mitokondriye yerleşiminde azalma olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra, ek olarak hasta ve kontrol primer miyoblastlarında yapılan SLC25A4 & TOM20 eş yerleşim analizinde hasta hücrelerinde mitokondriye yerleşen SLC25A4 miktarının istatistiksel olarak azaldığı gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.19 ve 4.20). SLC25A4 proteini, *Adenine nucleotide translocator* (ANT1) ismiyle de bilinmektedir. Bu protein, hem ATP sentezi için gerekli olan ADP'yi mitokondriyal matrikse aktarır, hem de hücresel aktiviteler için gerekli olan ATP'yi sitozole gönderir. İnsan ADP/ATP taşıyıcılarının, günlük aktivitelerimizi sürdürebilmek için her gün mitokondri iç membranından yaklaşık 65 kg ATP taşıdığı tahmin edilmektedir (173, 174). Üç ANT izoformu bulunmasına karşılık, ANT1'in kalp ve iskelet kasına özgül olduğu gösterilmiştir (175).

SLC25A4'ün, iç membranı birçok kez kateden diğer hidrofobik *transporter* proteinler gibi kesilebilir sinyal dizilerine sahip olmadığı ve taşıdığı hidrofobik internal sinyal dizileri sayesinde TIM22 import yolağı ile iç membrana yerleştiği gösterilmiştir. (73). Bu sebeple, ileri dönemde TIM22 import yolağında görevli proteinlerin ifadelerinin analiz edilmesi ile bu yolaktaki olası bozukluklar aydınlatılabilir. Bunun yanı sıra, SLC25A4 proteininin iç membranda en çok bulunan protein olduğu ve eksikliğinin mitokondriyal morfoloji bozukluklarıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (176). Ek olarak, mayada yapılan bir çalışmada, SLC25A4'ün mayadaki ortoloğu olan Aac2 proteininin yerleşimi veya stabilizasyonu için kardiyolipine ihtiyaç duyduğu ve hem solunum kompleksleriyle (kompleks III ve IV), hem de diğer mitokondriyal taşıyıcı proteinlerle etkileşimde olduğu gösterilmiştir. Kardiyolipin eksikliğinde ise Aac2 interaktomunun değiştiği, Aac2'nin kompleks III ve IV ile olan fiziksel etkileşimini kaybettiği ve oksidatif fosforilasyon etkinliğinin azaldığı tespit edilmiştir (177). Dolayısıyla, iç membrana yerleşemeyen SLC25A4 proteininin ATP/ADP transportu, enerji üretimi ve mitokondri morfolojisini etkilemesi beklenen bir sonuç olarak düşünülebilir.

Literatürde *SLC25A4* genindeki mutasyonlar, otozomal dominant progresif eksternal oftalmopleji, ailesel hipertrofik kardiyomyopati, miyopati, mtDNA depleasyonu ve çoklu mtDNA delesyonları ile ilişkilendirilmiştir (178-182). Ayrıca, birçok farklı firmanın nöromusküler hastalıklar ve kardiyomyopati panellerinde mutasyon analizi için *SLC25A4* geni bulunmaktadır (183-185). Literatürde *SLC25A4* proteininin tez kapsamında çalışılan hastalıklardan sadece biri ile ilişkilendirildiği tek bir çalışma mevcuttur. Capitano ve ark. (186)'nın yaptığı bir proteomik çalışmasında DMD hastalarına ait iskelet kası dokularında *SLC25A4* proteinin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Ancak, devamında proteinin DMD patogenezinin etkisine, sekonder mitokondri hasarı ile ilişkisine ya da mitokondriye transportuna ilişkin herhangi bir işlevsel çalışma yapılmadığı gözlenmiştir. Tez kapsamında yapılan mitokondriyal proteomik çalışması sonucunda *SLC25A4*, sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili hastalıklarda aday bir tedavi hedefi olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda tez kapsamında çalışılan hastalıklarda sadece mitokondriyal protein importunun değil, ATP/ADP transportunun da hasarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. İleri dönemde, hasta sayısının ve hastalık panelinin genişletilmesi ile *SLC25A4*'ün organel hasarına etkisi daha net aydınlatılabilecek ve mitokondrilerdeki azalmış yerleşiminin ATP/ADP transport kinetiği üzerindeki etkisi izole edilen mitokondrilerde yapılacak olan biyokimyasal deneylerle tanımlanabilecektir.

Nadir nöromusküler hastalıklar için tedavi seçenekleri çoğunlukla tek gen-tek hedef yaklaşımını benimsemektedir ve kişiye özgül yenilikçi tedavi seçeneklerinin önünü açacak klinik öncesi çalışmalar sadece bazı hastalıklar için bulunmaktadır. Tez çalışması ile, patogenezinde sekonder mitokondri hasarının görüldüğü nadir nöromusküler hastalıklarda (DMD, Ullrich KMD ve Megakoniyal KMD) mitokondriyal import mekanizmasının potansiyel rolü aydınlatılmış, organel hasarının önlenmesi/geriye döndürülmesi amacıyla yeni ve farklı hastalık grupları için ortak tedavi hedefleri tanımlanabilmesine olanak sağlanmıştır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Primer miyoblastlarda mitokondriyal protein importunun analiz edildiği ilk çalışma gerçekleştirildi.
- Primer miyoblastlara pcDNA3/Mito-GFP transfeksiyonu yapıldı ve mitokondri belirteci olan TOM20 antikoru ile immünfloresan boyamalar sonrasında, tüm hastalara ait (DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD) primer miyoblastlarda MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde kontrol hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde (~%50 oranında) azalma gözlemlendi.
- Sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili nöromusküler hastalıklarda mitokondriyal protein import mekanizmasında (*pre-sequence*/ TIM23 import yolu) bozukluk olduğu saptandı.
- pcDNA3/mito-GFP ile birlikte miR-382-5p transfekte edilmiş C2C12 hücrelerinde MitoGFP-TOM20 eş yerleşiminde negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde ~%50 azalma olduğu saptandı.
- Önceki çalışmalarımızda mitokondri hasarı ile direkt ilişkilendirdiğimiz miR-382-5p'nin miyoblast hücrelerindeki artırılmış ifadesinin mitokondriyal protein import mekanizması hasarına da neden olduğu tespit edildi.
- Primer miyoblastlarda ilk mitokondriyal proteomik çalışması gerçekleştirildi ve analizler sonucunda 120 adet yüksek güvenilirlikte protein tanımlaması yapıldı.
- Optimize edilen "*hypotonic swelling*" yöntemi ile primer miyoblast hücrelerinden saf mitokondri izolasyonu yapıldı. Hipotonik tamponda bekleme süresi 10 dk, *Dounce* homojenizatörde vuruş sayısı 10 olduğu durumda, çekirdek ve sitoplazma fraksiyonlarının mitokondriyal fraksiyondan tamamen uzaklaştırıldığı saptandı.

- Proteomik analizleri sonucunda, hastalık grupları (DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD) ayrı ayrı kontrol bireyler ile kıyaslandığında;
  - DMD hastasının mitokondriyal proteomunda, 33 proteinin miktarında artış ve 21 proteinin miktarında azalış olduğu,
  - Megakoniyal KMD hastasının mitokondriyal proteomunda, 21 proteinin miktarında artış ve 30 proteinin miktarında azalış olduğu,
  - Ullrich KMD hastalarının mitokondriyal proteomunda, 35 proteinin miktarında artış ve 25 proteinin miktarında azalış olduğu tespit edildi.
- Proteomik analizleri sonucunda, tüm hastalar (DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD) tek bir grup halinde kontrol bireyler ile kıyaslandığında; ortak olarak 35 adet mitokondriyal proteinde miktar farklılığı olduğu, bu proteinlerin 18'inin miktarının hastalarda artmış, 17'sinin ise azalmış olduğu saptandı.
- *Gene Ontology* (GO)'deki gen zenginleştirme analizleri sonucunda, tüm hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen 35 proteinin, mitokondriyal membran organizasyonu, ETZ, mitokondriyal ATP sentezi, mitokondriyal translasyonun regülasyonu ve mitokondri organizasyonu gibi süreçlerde görev aldığı tespit edildi.
- Tüm hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda miktar farklılığı tespit edilen 35 proteinin STRING (2) veri tabanında yapılan işlevsel zenginleştirme ve protein-protein etkileşim analizleri sonucunda, bu proteinler arasında mitokondriyal protein importu ile ilişkili 6 protein (SLC25A6, SLC25A4, PMPCB, SPG7, TOM22, CHCHD3) olduğu tespit edildi.
- Aday olarak seçilen beş mitokondriyal protein (SLC25A4, SLC25A6, PMPCB, SPG7 ve MRPL3) için LC-MS/MS sonuçlarının *Western Blot* ile validasyonu yapıldı. Analizler sonucunda, tüm hasta gruplarına ait primer miyoblastlardan izole edilen mitokondriyal fraksiyonlardaki SLC25A4 miktarının, proteomik analizler ile uyumlu şekilde, kontrol hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi.

- İmmünfloresan boyamalar sonucunda hasta ve kontrol bireylere ait primer miyoblastlarda yapılan SLC25A4 & TOM20 eş yerleşim analizinde, tüm hasta hücrelerinde mitokondrilerde yerleşim gösteren SLC25A4 miktarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptandı.
- SLC25A4'ün total hücredeki ifadesi RNA ve protein seviyesinde sırasıyla qRT-PCR ve *Western Blot* ile analiz edildiğinde, hastalara ait primer miyoblast hücrelerinde SLC25A4 ifadesinin hem protein hem de RNA seviyesinde değişmediği tespit edildi.
- *SLC25A4* gen ifadesinin DMD, Megakonyal KMD ve Ullrich KMD primer miyoblast hücrelerinde azalmadığı, ancak proteinin organelde yerleşiminde hata olması sonucunda mitokondrilerdeki miktarının azaldığı sonucuna varıldı.

## 6.2. Öneriler

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

- Sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili nöromusküler hastalıklarda saptadığımız mitokondriyal protein import hatası ile bu hastalıklarda ifadesi artmış ve hedef genleri mitokondriyal protein importu ile ilişkili olan miR-382-5p arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacıyla bu miRNA'nın hedef genleri tanımlanabilir. Devamında 3'-UTR lusiferaz aktivite analizi ile miR-382-5p ile fiziksel etkileşimleri analiz edilebilir.
- Sekonder mitokondri hasarının gözlemlendiği nöromusküler hastalıklarda iskelet kas dokusunda artışını tespit etmiş olduğumuz ve mitokondriyal protein import hatası ile direkt ilişkilendirdiğimiz miR-382-5p'nin ifadesi hasta primer miyoblastlarında susturularak/azaltılarak, mitokondriyal protein importunun düzeliş düzelmediği araştırılabilir.
- Tez kapsamında optimize etmiş olduğumuz mitokondriyal protein import analizi (*Pre-sequence/ TIM23* import yolağı), sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili farklı primer miyoblast hücrelerinde tekrarlanarak hastalık paneli genişletilebilir.

- SLC25A4 proteinin mitokondriye yerleşiminden sorumlu proteinlerin ifadeleri incelenerek, SLC25A4'ün organelle yerleşimindeki hatanın nedenleri araştırılabilir.
- Kontrol primer miyoblast hücrelerine membran potansiyelini düşürecek kimyasallar uygulanarak SLC25A4 yerleşiminin azalıp azalmadığı kontrol edilebilir. Bu şekilde, hastalarda azaldığı saptanan mitokondriyal SLC25A4 yerleşiminin membran potansiyeli ile ilişkisi aydınlatılabilir.
- Hastalara ait primer miyoblastlardaki azalmış SLC25A4 yerleşiminin ATP/ADP transport kinetiği üzerindeki etkisi, izole edilen mitokondrielerde yapılacak olan ileri analizlerle incelenebilir.
- Sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili nöromusküler hastalık tanısı almış hastalara ait iskelet kas biyopsi dokularında TOM20 ve SLC25A4 eş boyaması yapılabilir. Çalışmanın devamında TOM20-SLC25A4 eş yerleşiminin analiz edilmesiyle mitokondrielerde yerleşen SLC25A4 miktarının azalıp azalmadığı ex-vivo ortamda araştırılabilir.
- Total ve mitokondriyal SLC25A4 ifadesi, sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili farklı primer miyoblast hücrelerinde araştırılarak hastalık paneli genişletilebilir.
- Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda ortak ifade artışı/azalışı saptanmış olan, tez kapsamında çalışılan beş aday protein dışındaki diğer proteinlere yönelik araştırmalar gerçekleştirilebilir. Hastalara ait mitokondriyal fraksiyonlarda yapılacak *Western Blot* analizi ile bu proteinlerin ifade azalışı/artışı doğrulandıktan sonra, ilgili oldukları yollara ilişkin işlevsel analizler gerçekleştirilebilir. Bu şekilde, nöromusküler hastalıklarda gözlenen sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili farklı yolların aydınlatılması da mümkün olabilir.
- LC-MS/MS sonucunda elde edilen yüksek ölçekli veri setleri, tez kapsamında çalışılan her hastalık için ayrı ayrı değerlendirilebilir ve DMD, Megakoniyal KMD ve Ullrich KMD hastalıklarının patogenezeğine özgül yeni aday proteinler tanımlanabilir.
- Mitokondriyal proteomik çalışması, sekonder mitokondri hasarı ile ilişkili farklı primer miyoblast hücrelerinin kullanılmasıyla ve/veya daha fazla sayıda hücreden mitokondri

izole edilerek tekrar edilebilir. Bu şekilde proteomik analizinin kapsamı arttırılabilir ve farklı aday proteinler tanımlanabilir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Wiedemann N, Pfanner N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:685-714.
2. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research.* 2018;47(D1):D607-D13.
3. Al Teneiji A, Siriwardena K, George K, Mital S, Mercimek-Mahmutoglu S. Progressive Cerebellar Atrophy and a Novel Homozygous Pathogenic *DNAJC19* Variant as a Cause of Dilated Cardiomyopathy Ataxia Syndrome. *Pediatric Neurology.* 2016;62:58-61.
4. Kang Y, Stroud DA, Baker MJ, De Souza DP, Frazier AE, Liem M, et al. Sengers Syndrome-Associated Mitochondrial Acylglycerol Kinase Is a Subunit of the Human TIM22 Protein Import Complex. *Molecular Cell.* 2017;67(3):457-70.e5.
5. Ojala T, Polinati P, Manninen T, Hiippala A, Rajantie J, Karikoski R, et al. New mutation of mitochondrial *DNAJC19* causing dilated and noncompaction cardiomyopathy, anemia, ataxia, and male genital anomalies. *Pediatric Research.* 2012;72(4):432-7.
6. Roesch K, Curran SP, Tranebjaerg L, Koehler CM. Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet.* 2002;11(5):477-86.
7. Takakubo F, Cartwright P, Hoogenraad N, Thorburn DR, Collins F, Lithgow T, et al. An amino acid substitution in the pyruvate dehydrogenase E1 alpha gene, affecting mitochondrial import of the precursor protein. *Am J Hum Genet.* 1995;57(4):772-80.
8. Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Accumulation of Amyloid Precursor Protein in the Mitochondrial Import Channels of Human Alzheimer's Disease Brain Is Associated with Mitochondrial Dysfunction. *The Journal of Neuroscience.* 2006;26(35):9057.
9. Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, Barrett CW, Zharikov A, Borah A, et al. alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2016;8(342):342ra78.
10. Yano H, Baranov SV, Baranova OV, Kim J, Pan Y, Yablonska S, et al. Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nat Neurosci.* 2014;17(6):822-31.
11. Altmann K, Westermann B. Role of Essential Genes in Mitochondrial Morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell.* 2005;16(11):5410-7.

12. Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, Neupert W, et al. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 2002;13(3):847-53.
13. Herlan M, Bornhövd C, Hell K, Neupert W, Reichert AS. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *Journal of Cell Biology*. 2004;165(2):167-73.
14. Meisinger C, Rissler M, Chacinska A, Szklarz LKS, Milenkovic D, Kozjak V, et al. The Mitochondrial Morphology Protein Mdm10 Functions in Assembly of the Preprotein Translocase of the Outer Membrane. *Developmental Cell*. 2004;7(1):61-71.
15. Liu W, Duan X, Fang X, Shang W, Tong C. Mitochondrial protein import regulates cytosolic protein homeostasis and neuronal integrity. *Autophagy*. 2018;14(8):1293-309.
16. Mapa K, Sikor M, Kudryavtsev V, Waegemann K, Kalinin S, Seidel CA, et al. The conformational dynamics of the mitochondrial Hsp70 chaperone. *Mol Cell*. 2010;38(1):89-100.
17. Wachter C, Schatz G, Glick BS. Protein import into mitochondria: the requirement for external ATP is precursor-specific whereas intramitochondrial ATP is universally needed for translocation into the matrix. *Molecular biology of the cell*. 1994;5(4):465-74.
18. Martin J, Mahlke K, Pfanner N. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem*. 1991;266(27):18051-7.
19. Kovermann P, Truscott KN, Guiard B, Rehling P, Sepuri NB, Müller H, et al. Tim22, the Essential Core of the Mitochondrial Protein Insertion Complex, Forms a Voltage-Activated and Signal-Gated Channel. *Molecular Cell*. 2002;9(2):363-73.
20. Truscott KN, Kovermann P, Geissler A, Merlin A, Meijer M, Driessen AJ, et al. A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*. 2001;8(12):1074-82.
21. Castro-Gago M, Dacruz-Alvarez D, Pintos-Martínez E, Beiras-Iglesias A, Arenas J, Martín MÁ, et al. Congenital neurogenic muscular atrophy in megaconial myopathy due to a mutation in CHKB gene. *Brain and Development*. 2016;38(1):167-72.
22. Gutierrez Rios P, Kalra AA, Wilson JD, Tanji K, Akman HO, Area Gomez E, et al. Congenital megaconial myopathy due to a novel defect in the choline kinase Beta gene. *Arch Neurol*. 2012;69(5):657-61.
23. Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet*. 2003;35(4):367-71.

24. Mitsuhashi S, Hatakeyama H, Karahashi M, Koumura T, Nonaka I, Hayashi YK, et al. Muscle choline kinase beta defect causes mitochondrial dysfunction and increased mitophagy. *Human Molecular Genetics*. 2011;20(19):3841-51.
25. Rybalka E, Timpani CA, Cooke MB, Williams AD, Hayes A. Defects in Mitochondrial ATP Synthesis in Dystrophin-Deficient Mdx Skeletal Muscles May Be Caused by Complex I Insufficiency. *PLoS One*. 2014;9(12):e115763.
26. Shkryl VM, Martins AS, Ullrich ND, Nowycky MC, Niggli E, Shirokova N. Reciprocal amplification of ROS and Ca<sup>2+</sup> signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2009;458(5):915-28.
27. Tagliavini F, Sardone F, Squarzone S, Maraldi NM, Merlini L, Faldini C, et al. Ultrastructural changes in muscle cells of patients with collagen VI-related myopathies. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2013;3(4):281-6.
28. Vila MC, Rayavarapu S, Hogarth MW, Van der Meulen JH, Horn A, Defour A, et al. Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death & Differentiation*. 2017;24(2):330-42.
29. Aksu-Menges E, Akkaya-Ulum YZ, Dayangac-Erden D, Balci-Peynircioglu B, Yuzbasioglu A, Topaloglu H, et al. The Common miRNA Signatures Associated with Mitochondrial Dysfunction in Different Muscular Dystrophies. *Am J Pathol*. 2020;190(10):2136-45.
30. Aksu E, Talim B, Balci-Hayta B. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in an invitro model of mitochondrial unfolded protein response. *The European Human Genetics Conference; 27-30 May 2017; Copenhagen-Denmark2017*.
31. Gebert N, Ryan MT, Pfanner N, Wiedemann N, Stojanovski D. Mitochondrial protein import machineries and lipids: A functional connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2011;1808(3):1002-11.
32. Schuler M-H, Di Bartolomeo F, Martensson CU, Daum G, Becker T. Phosphatidylcholine Affects Inner Membrane Protein Translocases of Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 2016.
33. Schuler MH, Di Bartolomeo F, Bottinger L, Horvath SE, Wenz LS, Daum G, et al. Phosphatidylcholine affects the role of the sorting and assembly machinery in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins. *J Biol Chem*. 2015;290(44):26523-32.
34. Benz R. Biophysical properties of porin pores from mitochondrial outer membrane of eukaryotic cells. *Experientia*. 1990;46:131-7.
35. Jaworska A, Malek K, Kudelski A. Intracellular pH – Advantages and pitfalls of surface-enhanced Raman scattering and fluorescence microscopy – A review. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021;251:119410.

36. Xian H, Liou Y-C. Functions of outer mitochondrial membrane proteins: mediating the crosstalk between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Cell Death & Differentiation*. 2021;28(3):827-42.
37. Moyes CD, Le Moine CMR. TISSUE RESPIRATION | Specializations in Mitochondrial Respiration of Fish. In: Farrell AP, editor. *Encyclopedia of Fish Physiology*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 966-72.
38. Lemasters JJ. Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22 Suppl 1:S31-7.
39. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. 2 ed: Sinauer Associates; 2000.
40. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. 1999;283(5407):1488-93.
41. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*. 2015;13(1):89.
42. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012;148(6):1145-59.
43. Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem*. 2004;271(3):462-9.
44. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*. 2000;529 Pt 1(Pt 1):57-68.
45. Hogeboom GH, Schneider WC, Pallade GE. Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J Biol Chem*. 1948;172(2):619-35.
46. Kennedy EP, Lehninger AL. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 1949;179(2):957-72.
47. Lehninger AL. ESTERIFICATION OF INORGANIC PHOSPHATE COUPLED TO ELECTRON TRANSPORT BETWEEN DIHYDRODIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE AND OXYGEN. II. *Journal of Biological Chemistry*. 1949;178(2):625-44.
48. Lill R, Diekert K, Kaut A, Lange H, Pelzer W, Prohl C, et al. The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem*. 1999;380(10):1157-66.
49. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397(6718):441-6.

50. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 4):807-15.
51. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a021220.
52. Rygiel KA, Picard M, Turnbull DM. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *J Physiol.* 2016;594(16):4499-512.
53. Sebastián D, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends Mol Med.* 2017;23(3):201-15.
54. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(2):105-17.
55. Archer SL. Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. *New England Journal of Medicine.* 2013;369(23):2236-51.
56. Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ, et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol.* 2012;32(2):309-19.
57. Gomes LC, Benedetto GD, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology.* 2011;13(5):589-98.
58. Rambold AS, Kostelecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(25):10190-5.
59. Song M, Mihara K, Chen Y, Scorrano L, Dorn GW, 2nd. Mitochondrial fission and fusion factors reciprocally orchestrate mitophagic culling in mouse hearts and cultured fibroblasts. *Cell Metab.* 2015;21(2):273-86.
60. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell.* 2008;134(1):112-23.
61. Aviram N, Schuldiner M. Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *J Cell Sci.* 2017;130(24):4079-85.
62. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell.* 2009;138(4):628-44.
63. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):655-67.
64. Cichocki BA, Krumpke K, Vitali DG, Rapaport D. Pex19 is involved in importing dually targeted tail-anchored proteins to both mitochondria and peroxisomes. *Traffic.* 2018;19(10):770-85.

65. Jores T, Lawatscheck J, Beke V, Franz-Wachtel M, Yunoki K, Fitzgerald JC, et al. Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial  $\beta$ -barrel proteins. *J Cell Biol.* 2018;217(9):3091-108.
66. Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell.* 2003;112(1):41-50.
67. Bausewein T, Mills DJ, Langer JD, Nitschke B, Nussberger S, Kühlbrandt W. Cryo-EM Structure of the TOM Core Complex from *Neurospora crassa*. *Cell.* 2017;170(4):693-700.e7.
68. Vögtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, et al. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell.* 2009;139(2):428-39.
69. Doyle SR, Kasinadhuni NR, Chan CK, Grant WN. Evidence of evolutionary constraints that influences the sequence composition and diversity of mitochondrial matrix targeting signals. *PLoS One.* 2013;8(6):e67938.
70. Geissler A, Krimmer T, Bömer U, Guiard B, Rassow J, Pfanner N. Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the  $\Delta\psi$ -dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol Biol Cell.* 2000;11(11):3977-91.
71. Huang S, Taylor NL, Whelan J, Millar AH. Refining the definition of plant mitochondrial presequences through analysis of sorting signals, N-terminal modifications, and cleavage motifs. *Plant Physiol.* 2009;150(3):1272-85.
72. Sinzel M, Tan T, Wendling P, Kalbacher H, Özbalci C, Chelius X, et al. Mcp3 is a novel mitochondrial outer membrane protein that follows a unique IMP-dependent biogenesis pathway. *EMBO Rep.* 2016;17(7):965-81.
73. Wiedemann N, Pfanner N, Ryan MT. The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *Embo J.* 2001;20(5):951-60.
74. Milenkovic D, Ramming T, Müller JM, Wenz LS, Gebert N, Schulze-Specking A, et al. Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria. *Mol Biol Cell.* 2009;20(10):2530-9.
75. Sideris DP, Petrakis N, Katrakili N, Mikropoulou D, Gallo A, Ciofi-Baffoni S, et al. A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding. *J Cell Biol.* 2009;187(7):1007-22.
76. Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG. YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell.* 1992;71(7):1143-55.

77. Gold VA, Chroszicki P, Bragoszewski P, Chacinska A. Visualization of cytosolic ribosomes on the surface of mitochondria by electron cryo-tomography. *EMBO Rep.* 2017;18(10):1786-800.
78. Wienhues U, Becker K, Schleyer M, Guiard B, Tropschug M, Horwich AL, et al. Protein folding causes an arrest of preprotein translocation into mitochondria in vivo. *Journal of Cell Biology.* 1991;115(6):1601-9.
79. Papić D, Elbaz-Alon Y, Koerdt SN, Leopold K, Worm D, Jung M, et al. The role of Djp1 in import of the mitochondrial protein Mim1 demonstrates specificity between a cochaperone and its substrate protein. *Mol Cell Biol.* 2013;33(20):4083-94.
80. Chacinska A, Lind M, Frazier AE, Dudek J, Meisinger C, Geissler A, et al. Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell.* 2005;120(6):817-29.
81. Kiebler M, Pfaller R, Sollner T, Griffiths G, Horstmann H, Pfanner N, et al. Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature.* 1990;348(6302):610-6.
82. Stojanovski D, Rissler M, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial morphology and protein import—A tight connection? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2006;1763(5):414-21.
83. Hawlitschek G, Schneider H, Schmidt B, Tropschug M, Hartl FU, Neupert W. Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell.* 1988;53(5):795-806.
84. Joseph A-M, Ljubicic V, Adhietty PJ, Hood DA. Biogenesis of the mitochondrial Tom40 channel in skeletal muscle from aged animals and its adaptability to chronic contractile activity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2010;298(6):C1308-C14.
85. Sirrenberg C, Bauer MF, Guiard B, Neupert W, Brunner M. Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature.* 1996;384(6609):582-5.
86. Sirrenberg C, Endres M, Folsch H, Stuart RA, Neupert W, Brunner M. Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature.* 1998;391(6670):912-5.
87. Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schonfisch B, Rospert S, Ryan MT, et al. Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature.* 2003;424(6948):565-71.
88. Becker T, Pfannschmidt S, Guiard B, Stojanovski D, Milenkovic D, Kutik S, et al. Biogenesis of the mitochondrial TOM complex - Mim1 promotes insertion and assembly of signal-anchored receptors. *Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(1):120-7.

89. Hulett JM, Lueder F, Chan NC, Perry AJ, Wolyneć P, Likic VA, et al. The transmembrane segment of Tom20 is recognized by Mim1 for docking to the mitochondrial TOM complex. *J Mol Biol.* 2008;376(3):694-704.
90. Popov-Celeketić J, Waizenegger T, Rapaport D. Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol.* 2008;376(3):671-80.
91. Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Szklarz LKS, Schulze-Specking A, et al. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *Embo J.* 2004;23(19):3735-46.
92. Naoe M, Ohwa Y, Ishikawa D, Ohshima C, Nishikawa S, Yamamoto H, et al. Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(46):47815-21.
93. Stiller SB, Hopker J, Oeljeklaus S, Schutze C, Schrempp SG, Vent-Schmidt J, et al. Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins. *Cell Metab.* 2016;23(5):901-8.
94. Yano H, Baranov SV, Baranova OV, Kim J, Pan Y, Yablonska S, et al. Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nature Neuroscience.* 2014;17(6):822-31.
95. Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. *The Lancet.* 2018;391(10139):2560-74.
96. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16080.
97. Rahman S. Mitochondrial disease in children. *J Intern Med.* 2020;287(6):609-33.
98. Niyazov DM, Kahler SG, Frye RE. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Mol Syndromol.* 2016;7(3):122-37.
99. Mavraki E, Labrum R, Sergeant K, Alston CL, Woodward C, Smith C, et al. Genetic testing for mitochondrial disease: the United Kingdom best practice guidelines. *European Journal of Human Genetics.* 2023;31(2):148-63.
100. Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 1988;318(21):1363-8.
101. Kieny P, Chollet S, Delalande P, Le Fort M, Magot A, Pereon Y, et al. Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Ann Phys Rehabil Med.* 2013;56(6):443-54.
102. McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Han JJ, Escolar DM, Florence JM, et al. The cooperative international neuromuscular research group Duchenne natural history



study--a longitudinal investigation in the era of glucocorticoid therapy: design of protocol and the methods used. *Muscle Nerve*. 2013;48(1):32-54.

103. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*. 1989;45(4):498-506.

104. Onopiuk M, Brutkowski W, Wierzbicka K, Wojciechowska S, Szczepanowska J, Fronk J, et al. Mutation in dystrophin-encoding gene affects energy metabolism in mouse myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;386(3):463-6.

105. Percival JM, Siegel MP, Knowels G, Marcinek DJ. Defects in mitochondrial localization and ATP synthesis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy are not alleviated by PDE5 inhibition. *Hum Mol Genet*. 2013;22(1):153-67.

106. Schuh RA, Jackson KC, Khairallah RJ, Ward CW, Spangenburg EE. Measuring mitochondrial respiration in intact single muscle fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302(6):R712-9.

107. Moore TM, Lin AJ, Strumwasser AR, Cory K, Whitney K, Ho T, et al. Mitochondrial Dysfunction Is an Early Consequence of Partial or Complete Dystrophin Loss in mdx Mice. *Front Physiol*. 2020;11:690.

108. Yao S, Chen Z, Yu Y, Zhang N, Jiang H, Zhang G, et al. Current Pharmacological Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:689533.

109. Buyse GM, Van der Mieren G, Erb M, D'Hooge J, Herijgers P, Verbeken E, et al. Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance. *Eur Heart J*. 2009;30(1):116-24.

110. McKenna MJ, Medved I, Goodman CA, Brown MJ, Bjorksten AR, Murphy KT, et al. N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. *J Physiol*. 2006;576(Pt 1):279-88.

111. Spurney CF, Rocha CT, Henricson E, Florence J, Mayhew J, Gorni K, et al. CINRG pilot trial of coenzyme Q10 in steroid-treated Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2011;44(2):174-8.

112. Mitsuhashi S, Ohkuma A, Talim B, Karahashi M, Koumura T, Aoyama C, et al. A congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities caused by defective de novo phosphatidylcholine biosynthesis. *Am J Hum Genet*. 2011;88(6):845-51.

113. Nishino I, Kobayashi O, Goto Y, Kurihara M, Kumagai K, Fujita T, et al. A new congenital muscular dystrophy with mitochondrial structural abnormalities. *Muscle Nerve*. 1998;21(1):40-7.

114. Shy GM, Gonatas NK, Perez M. Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy. *Brain*. 1966;89(1):133-58.
115. Bardhan M, Polavarapu K, Bevinahalli NN, Veeramani PK, Anjanappa RM, Arunachal G, et al. Megaconial congenital muscular dystrophy secondary to novel CHKB mutations resemble atypical Rett syndrome. *J Hum Genet*. 2021;66(8):813-23.
116. Haliloglu G, Talim B, Sel CG, Topaloglu H. Clinical characteristics of megaconial congenital muscular dystrophy due to choline kinase beta gene defects in a series of 15 patients. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(6):1099-108.
117. Mitsuhashi S, Nishino I. Phospholipid synthetic defect and mitophagy in muscle disease. *Autophagy*. 2011;7(12):1559-61.
118. Quinlivan R, Mitsuhashi S, Sewry C, Cirak S, Aoyama C, Moore D, et al. Muscular dystrophy with large mitochondria associated with mutations in the CHKB gene in three British patients: extending the clinical and pathological phenotype. *Neuromuscul Disord*. 2013;23(7):549-56.
119. Ríos PG, Kalra AA, Wilson JD, Tanji K, Akman HO, Gómez EA, et al. Congenital Megaconial Myopathy Due to a Novel Defect in the Choline Kinase Beta Gene. *Archives of Neurology*. 2012;69(5):657-61.
120. Aksu-Menges E, Eylem CC, Nemutlu E, Gizer M, Korkusuz P, Topaloglu H, et al. Reduced mitochondrial fission and impaired energy metabolism in human primary skeletal muscle cells of Megaconial Congenital Muscular Dystrophy. *Sci Rep*. 2021;11(1):18161.
121. Sayed-Zahid AA, Sher RB, Sukoff Rizzo SJ, Anderson LC, Patenaude KE, Cox GA. Functional rescue in a mouse model of congenital muscular dystrophy with megaconial myopathy. *Hum Mol Genet*. 2019;28(16):2635-47.
122. Tavasoli M, Lahire S, Sokolenko S, Novorolsky R, Reid SA, Lefsay A, et al. Mechanism of action and therapeutic route for a muscular dystrophy caused by a genetic defect in lipid metabolism. *Nat Commun*. 2022;13(1):1559.
123. Baker NL, Mörgelin M, Peat R, Goemans N, North KN, Bateman JF, et al. Dominant collagen VI mutations are a common cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(2):279-93.
124. Hicks D, Lampe AK, Barresi R, Charlton R, Fiorillo C, Bonnemann CG, et al. A refined diagnostic algorithm for Bethlem myopathy. *Neurology*. 2008;70(14):1192.
125. Okada M, Kawahara G, Noguchi S, Sugie K, Murayama K, Nonaka I, et al. Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan. *Neurology*. 2007;69(10):1035.

126. Pace RA, Peat RA, Baker NL, Zamurs L, Mörgelin M, Irving M, et al. Collagen VI glycine mutations: Perturbed assembly and a spectrum of clinical severity. *Annals of Neurology*. 2008;64(3):294-303.
127. Castagnaro S, Pellegrini C, Pellegrini M, Chrisam M, Sabatelli P, Toni S, et al. Autophagy activation in COL6 myopathic patients by a low-protein-diet pilot trial. *Autophagy*. 2016;12(12):2484-95.
128. Merlini L, Angelin A, Tiepolo T, Braghetta P, Sabatelli P, Zamparelli A, et al. Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(13):5225-9.
129. Merlini L, Sabatelli P, Armaroli A, Gnudi S, Angelin A, Grumati P, et al. Cyclosporine A in Ullrich congenital muscular dystrophy: long-term results. *Oxid Med Cell Longev*. 2011;2011:139194.
130. Duarte FV, Palmeira CM, Rolo AP. The Role of microRNAs in Mitochondria: Small Players Acting Wide. *Genes (Basel)*. 2014;5(4):865-86.
131. Schneider HC, Berthold J, Bauer MF, Dietmeier K, Guiard B, Brunner M, et al. Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*. 1994;371(6500):768-74.
132. van der Laan M, Wiedemann N, Mick DU, Guiard B, Rehling P, Pfanner N. A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria. *Curr Biol*. 2006;16(22):2271-6.
133. Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Van der Klei-Van Moorsel JM, Luyt-Houwen IE, Van 't Veer-Korthof ET, et al. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci*. 1983;62(1-3):327-55.
134. Gebert N, Joshi AS, Kutik S, Becker T, McKenzie M, Guan XL, et al. Mitochondrial Cardiolipin Involved in Outer-Membrane Protein Biogenesis: Implications for Barth Syndrome. *Current Biology*. 2009;19(24):2133-9.
135. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):676-82.
136. Panov AV. *Practical Mitochondriology: Pitfalls and Problems in Studies of Mitochondria: CreateSpace Independent Publishing Platform: CreateSpace Independent Publishing Platform*; 2013.
137. Coudert E, Gehant S, de Castro E, Pozzato M, Baratin D, Neto T, et al. Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. *Bioinformatics*. 2023;39(1).
138. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:128.

139. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W90-7.
140. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, Clarke DJB, Evangelista JE, Jenkins SL, et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Current Protocols.* 2021;1(3):e90.
141. Dodds E, Dunckley MG, Naujoks K, Michaelis U, Dickson G. Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. *Gene Ther.* 1998;5(4):542-51.
142. Trivedi RA, Dickson G. Liposome-mediated gene transfer into normal and dystrophin-deficient mouse myoblasts. *J Neurochem.* 1995;64(5):2230-8.
143. Yamano S, Dai J, Moursi AM. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. *Mol Biotechnol.* 2010;46(3):287-300.
144. Quenneville SP, Chapdelaine P, Rousseau J, Beaulieu J, Caron NJ, Skuk D, et al. Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with  $\phi$ C31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. *Molecular Therapy.* 2004;10(4):679-87.
145. Franco-Iborra S, Cuadros T, Parent A, Romero-Gimenez J, Vila M, Perier C. Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell Death & Disease.* 2018;9(11):1122.
146. Sekar D, Johnson J, Biruntha M, Lakhmanan G, Gurunathan D, Ross K. Biological and Clinical Relevance of microRNAs in Mitochondrial Diseases/Dysfunctions. *DNA Cell Biol.* 2020;39(8):1379-84.
147. Zhang S, Cheng Z, Wang Y, Han T. The Risks of miRNA Therapeutics: In a Drug Target Perspective. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:721-33.
148. Catanesi M, d'Angelo M, Tupone MG, Benedetti E, Giordano A, Castelli V, et al. MicroRNAs Dysregulation and Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
149. Paramasivam A, Vijayashree Priyadharsini J. MitomiRs: new emerging microRNAs in mitochondrial dysfunction and cardiovascular disease. *Hypertens Res.* 2020;43(8):851-3.
150. Dahlmans D, Houzelle A, Andreux P, Wang X, Jorgensen JA, Moullan N, et al. MicroRNA-382 silencing induces a mitonuclear protein imbalance and activates the mitochondrial unfolded protein response in muscle cells. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):6601-10.


151. Zhou H, Gan M, Jin X, Dai M, Wang Y, Lei Y, et al. miR-382 inhibits breast cancer progression and metastasis by affecting the M2 polarization of tumor-associated macrophages by targeting PGC-1 $\alpha$ . *Int J Oncol*. 2022;61(4).
152. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Lee SS. Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *J Adv Res*. 2021;28:127-38.
153. Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Research Notes*. 2012;5(1):513.
154. Dixit B, Vanhoozer S, Anti NA, O'Connor MS, Boominathan A. Rapid enrichment of mitochondria from mammalian cell cultures using digitonin. *MethodsX*. 2021;8:101197.
155. Djafarzadeh S, Jakob SM. Isolation of Intact Mitochondria from Skeletal Muscle by Differential Centrifugation for High-resolution Respirometry Measurements. *J Vis Exp*. 2017(121).
156. Sims NR, Anderson MF. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1228-39.
157. Younis AZ, Lavery GG, Christian M, Doig CL. Rapid isolation of respiring skeletal muscle mitochondria using nitrogen cavitation. *Frontiers in Physiology*. 2023;14.
158. Clayton DA, Shadel GS. Isolation of mitochondria from tissue culture cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014;2014(10):pdb.prot080002.
159. Liao PC, Bergamini C, Fato R, Pon LA, Pallotti F. Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Methods Cell Biol*. 2020;155:3-31.
160. Caldeira DAF, de Oliveira DF, Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Nascimento JHM, Zin WA, Maciel L. Isolation of Mitochondria From Fresh Mice Lung Tissue. *Front Physiol*. 2021;12:748261.
161. Frezza C, Cipolat S, Scorrano L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols*. 2007;2(2):287-95.
162. Corcelli A, Saponetti MS, Zaccagnino P, Lopalco P, Mastrodonato M, Liquori GE, et al. Mitochondria isolated in nearly isotonic KCl buffer: Focus on cardiolipin and organelle morphology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2010;1798(3):681-7.
163. Ishii M, Beeson G, Beeson C, Rohrer B. An improved method for isolation of mitochondria from cell lines that enables reconstitution of calcium-dependent processes. *Anal Biochem*. 2019;577:52-8.
164. Goldstein AH, Anderson JO, McDaniel RG. Effects of protectants on the activity of wheat mitochondria. *Prep Biochem*. 1981;11(1):33-47.

165. Korge P, Honda HM, Weiss JN. Effects of fatty acids in isolated mitochondria: implications for ischemic injury and cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(1):H259-69.
166. Ngo J, Benador IY, Brownstein AJ, Vergnes L, Veliova M, Shum M, et al. Isolation and functional analysis of peridroplet mitochondria from murine brown adipose tissue. *STAR Protoc*. 2021;2(1):100243.
167. Sacktor B, O'Neill JJ, Cochran DG. The requirement for serum albumin in oxidative phosphorylation of flight muscle mitochondria. *J Biol Chem*. 1958;233(5):1233-5.
168. Weinbach EC, Garbus J. The rapid restoration of respiratory control to uncoupled mitochondria. *J Biol Chem*. 1966;241(16):3708-13.
169. Blanco-Fernandez J, Jourdain AA. Two-Step Tag-Free Isolation of Mitochondria for Improved Protein Discovery and Quantification. *J Vis Exp*. 2023(196).
170. Kruse R, Sahebkhitiari N, Højlund K. The Mitochondrial Proteomic Signatures of Human Skeletal Muscle Linked to Insulin Resistance. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15).
171. Schaffer LV, Rensvold JW, Shortreed MR, Cesnik AJ, Jochem A, Scalf M, et al. Identification and Quantification of Murine Mitochondrial Proteoforms Using an Integrated Top-Down and Intact-Mass Strategy. *J Proteome Res*. 2018;17(10):3526-36.
172. Poulaki A, Giannouli S. Mitochondrial Lipids: From Membrane Organization to Apoptotic Facilitation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7).
173. Buono MJ, Kolkhorst FW. Estimating ATP resynthesis during a marathon run: a method to introduce metabolism. *AMER PHYSIOLOGICAL SOC 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814 USA*; 2001. p. 70-1.
174. Garrett RH. *Biochemistry: Cengage Learning Canada Inc*; 2015.
175. Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem*. 1992;267(21):14592-7.
176. Thompson K, Majd H, Dallabona C, Reinson K, King MS, Alston CL, et al. Recurrent De Novo Dominant Mutations in SLC25A4 Cause Severe Early-Onset Mitochondrial Disease and Loss of Mitochondrial DNA Copy Number. *Am J Hum Genet*. 2016;99(4):860-76.
177. Claypool SM, Oktay Y, Boonthueung P, Loo JA, Koehler CM. Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*. 2008;182(5):937-50.
178. Agostino A, Valletta L, Chinnery PF, Ferrari G, Carrara F, Taylor RW, et al. Mutations of ANT1, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO). *Neurology*. 2003;60(8):1354-6.

179. Echaniz-Laguna A, Chassagne M, Ceresuela J, Rouvet I, Padet S, Acquaviva C, et al. Complete loss of expression of the ANT1 gene causing cardiomyopathy and myopathy. *J Med Genet.* 2012;49(2):146-50.
180. Komaki H, Fukazawa T, Houzen H, Yoshida K, Nonaka I, Goto Y. A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions. *Ann Neurol.* 2002;51(5):645-8.
181. Palmieri L, Alberio S, Pisano I, Lodi T, Meznaric-Petrusa M, Zidar J, et al. Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* 2005;14(20):3079-88.
182. Strauss KA, DuBiner L, Simon M, Zaragoza M, Sengupta PP, Li P, et al. Severity of cardiomyopathy associated with adenine nucleotide translocator-1 deficiency correlates with mtDNA haplogroup. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(9):3453-8.
183. Invitae. Invitae Comprehensive Neuromuscular Disorders Panel USA: Invitae Corporation; 2023 [Available from: <https://www.invitae.com/us/providers/test-catalog/test-03280>].
184. Mikrogenlab. Cardiomyopathy Panel (110 Genes) Ankara, Turkey: Mikrogenlab; 2023 [Available from: <https://en.mikrogenlab.com/test/cardiomyopathy-panel-110-genes/>].
185. Services WUP. Cardiomyopathy panel | NGS St. Louis, USA: Washington University in St. Louis; 2023 [Available from: <https://pathologyservices.wustl.edu/items/cardiomyopathy-gene-set-ngs/>].
186. Capitanio D, Moriggi M, Torretta E, Barbacini P, De Palma S, Viganò A, et al. Comparative proteomic analyses of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy muscles: changes contributing to preserve muscle function in Becker muscular dystrophy patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020;11(2):547-63.

## 8. EKLER

## EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

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

Sayı : 16969557 - 590

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 31 MART 2020 SALI  
**Toplantı No** : 2020/07  
**Proje No** : GO 20/286(Degerlendirme Tarihi: 31.03.2020)  
**Karar No** : 2020/07-12

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Burcu HAYTA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Murat KASAP, Doç. Dr. Gürler AKPINAR, Dr. Öğr. Üyesi Beril TALIM ile birlikte çalışacakları ve Arş. Gör. Evrim Aksu MENGES'in doktora tezi olan, GO 20/286 kayıt numaralı, "*Mitokondri Hasarı ile İlişkili Nörö-müsküler Hastalıklarda Mitokondriyal Protein İmport Mekanizmasının Araştırılması*" başlıklı proje önerisi araştırmamızın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, primer miyoblast hücre kültürlerinde tamamlanmak üzere 01 Nisan 2020-01 Nisan 2023 tarihleri arasında geçerli olacak şekilde etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	Başkan	9. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	10. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA	(Üye)	11. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM	(Üye)	12. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
5. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	13. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	
6. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)	14. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	
7. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	15. Av. Meltem ONURLU	(Üye)
8. Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)		

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:



## EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

## Evrim Aksu Mengeş-Doktora tezi


## ORJİNALLİK RAPORU

<b>%6</b>	<b>%6</b>	<b>%1</b>	<b>%0</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>tbgder.org</b> İnternet Kaynağı	<b>%3</b>
<b>2</b>	<b>openaccess.hacettepe.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>3</b>	<b>avesis.hacettepe.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>4</b>	<b>www.researchgate.net</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	<b>www.dent.ege.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	<b>tur.legatechnics.com</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>7</b>	<b>acikbilim.yok.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>8</b>	<b>www.biorxiv.org</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>9</b>	<b>Submitted to Ege Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	<b>&lt;%1</b>

**EK-3: Tez Çalışması Dijital Makbuz**



## Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Evrim Aksu Menges  
Ödev başlığı: Evrim-Doktora tez  
Gönderi Başlığı: Evrim Aksu Menges-Doktora tezi  
Dosya adı: Evrim\_Aksu\_Menges\_\_Doktora\_tezi\_26.01.2024turnitin.docx  
Dosya boyutu: 35.32M  
Sayfa sayısı: 78  
Kelime sayısı: 10,320  
Karakter sayısı: 79,230  
Gönderim Tarihi: 29-Oca-2024 02:41ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2266376322

TEZ  
BAŞLIĞI

YAZAR ADI

YAZAR SOYADI

YAZAR E-POSTA ADRESİ

YAZAR TELEFON NO

YAZAR İLETİŞİM NO

YAZAR İMZA

YAZAR İMZA

YAZAR İMZA

Copyright 2024 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Evrin AKSU MENGEŞ, M.Sc.**

---