

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

**MEGAKONİYAL KONJENİTAL MÜSKÜLER DİSTROFİ
HASTALIĞINDA MİTOKONDRI DİNAMİĞİNİN İNCELENMESİ**

Evrin AKSU

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2017

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

**MEGAKONİYAL KONJENİTAL MÜSKÜLER DİSTROFİ
HASTALIĞINDA MİTOKONDRI DİNAMİĞİNİN İNCELENMESİ**

Evrin AKSU

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Burcu HAYTA**

**ANKARA
2017**

ONAY SAYFASI

Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi Hastalığında Mitokondri Dinamiğinin

İncelenmesi

Evrin AKSU

Bu çalışma 07.07.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Serap DÖKMECİ Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD.	(imza) 
Tez Danışmanı:	Doç. Dr. Burcu HAYTA Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD.	(imza) 
Üye:	Prof. Dr. Pervin DİNÇER Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD.	(imza) 
Üye:	Doç. Dr. Çağdaş Devrim SON ODTÜ Biyoloji Bölümü	(imza) 
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Beril TALİM Hacettepe Üniversitesi Pediatrik ve Perinatal Patoloji Ünitesi	(imza) 

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

17 Temmuz 2017

(imza)
Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) 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.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir. (Bu seçenекle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

o Tezimin/Raporumun 07.07.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum. (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi



21.06.17

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, Tez Danışmanınının Doç. Dr. Burcu Hayta danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Evrin AKSU



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda destek olan, bilgisini ve değerli katkılarını esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Burcu Hayta'ya, çalışmamı okuyarak değerli yorumlarını benimle paylaşan tez jüri üyeleri Prof. Dr. Serap Dökmeçi, Prof. Dr. Pervin Dinçer, Doç. Dr. Çağdaş Son ve Yrd. Doç. Dr. Beril Talim'e,

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

Her zaman yanımda ve bana destek olan çok sevgili çalışma arkadaşlarıma ve dostum Dilan Akın'a,

Uzakta olmalarına rağmen çalışmalarım süresince her daim sonsuz sevgi, anlayış ve sabırla bana destek olan sevgili aileme,

Her zaman olduğu gibi tez çalışmam sürecinde de elinden gelen her türlü yardımı ve fedakârlığı gösteren, sevgisi ve anlayışıyla benden desteğini esirgemeyen Harun Mengeş'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi THD-2015-7717 projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

Aksu, E., Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi Hastalığında Mitokondri Dinamiğinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017. Mitokondri kalite kontrolünün önemli bileşenleri olarak kabul edilen füzyon ve fisyon mekanizmaları mitokondri dinamiği olarak tanımlanmakta ve organel morfolojisini ve işlevini düzenlemektedirler. Farklı genetik temelleri olan birçok nöromüsküler hastalığın patogenezinde mitokondri işlev ve morfoloji kaybı gözlenmiş olmasına rağmen, mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarının bu hastalıkların patolojik sürecine etkisi günümüze kadar araştırılmamıştır. Tez çalışmasında; fosfatidilkolin sentezinden sorumlu enzimlerden ilkin kodlayan Kolin Kinaz Beta (*CHKB*) genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan ve sarkolemmaya yakın yerleşimli aşırı büyük (megakoniyal) mitokondriler ile karakterize nadir nöromüsküler hastalıklardan Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi (KMD)'nin patogenezinde mitokondri dinamiğinin olası rolü araştırılmıştır. Tez kapsamında, Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücreleri uygun koşullarda miyotüplere farklılaştırılmış ve immünfloresan (IF) boyamalar ile mitokondri morfolojisinin, yerleşiminin ve dinamik ağ yapısının bozulduğu gözlenmiştir. Mitokondriyal füzyon/fisyonda görevli temel proteinler Western Blot ve IF boyamalar ile kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiş olup, mitokondriyal füzyon proteinlerinin (Mfn1, Mfn2, OPA1) seviyesinde kontrole göre herhangi bir değişim saptanmazken, fisyonda 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 (**) $p < 0,0025$] sonucuna ulaşılmıştır. Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsisinden alınmış olan kesitlerde *in-vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi, mitokondri dinamiği, mitokondriyal fisyon, mitokondriyal füzyon

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi THD-2015-7717 projesi ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Aksu, E., Investigation of Mitochondrial Dynamics in Megaconial Congenital Muscular Dystrophy, Hacettepe University Institute of Health Sciences Medical Biology Programme Master of Science Thesis, Ankara, 2017. Mitochondrial fusion and fission events, important constituents of mitochondrial quality control mechanisms, are known as mitochondrial dynamics and regulate morphology and function of the organelle. Although mitochondrial dysfunction and dysmorphology have been implicated in the pathogenesis of several different neuromuscular disorders, no studies to date have investigated the potential role of mitochondrial dynamics in the progression of these disorders. In this thesis, the potential role of mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Megaconial Congenital Muscular Dystrophy (CMD) has been investigated. Megaconial CMD is characterized by enlarged (megaconial) mitochondria at the periphery of muscle fibers and caused by mutations in the Choline Kinase Beta (*CHKB*) gene which encodes an enzyme that catalyzes the first step of phosphatidylcholine biosynthesis. In this study, after differentiation of primary myoblasts of Megaconial CMD patient into myotubes, impaired mitochondrial dynamics, localization and morphology were observed by immunofluorescent (IF) staining. Proteins involved in mitochondrial fusion and fission were analyzed by Western Blot and IF analysis. A statistically significant decrease in the expression levels of fission proteins (Drp1, Mff, Fis1) were detected compared to control [as 3.6 (**p<0.0001), 2.1 (**p<0.0001), and 3 fold (**p<0.0025) respectively], but there was no statistically significant difference in the expression levels of fusion proteins (Mfn1, Mfn2, OPA1). Moreover, the results of *in-vitro* studies were confirmed in skeletal muscle biopsy of a Megaconial CMD patient.

Key words: mitochondrial dynamics, mitochondrial fusion, mitochondrial fission, Megaconial Congenital Muscular Dystrophy

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: THD-2015-7717)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mitokondri ve İşlevleri	4
2.2. Mitokondri ve Kalite Kontrol Mekanizmaları	5
2.3. Mitokondri Dinamiği	6
2.4. Mitokondriyal Füzyon Mekanizması	7
2.5. Mitokondriyal Fisyon Mekanizması	9
2.6. Mitokondriyal Füzyon ve Fisyon Mekanizmalarının Regülasyonu	11
2.7. Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi Hastalığı	12
2.8. Fosfatidilkolin Sentezi ve Mitokondri ile İlişkisi	14
2.9. Megakoniyal KMD Hastalığının Patogenezinde Mitokondri Dinamiğinin Olası Rolü	15
3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER	18
3.1. Gereçler	18
3.1.1. Hücre Kültürü	18
3.1.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	19
3.1.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE)	19
3.1.4. Western Blot	20
3.1.5. İmmünfloresan Boyama	22
3.2. Yöntemler	23
3.2.1. Hücre Kültürü	23
3.2.2. Western Blot Analizi	24
3.2.3. Primer Hücrelerde İmmünfloresan Boyama	28
3.2.4. Doku Kesitlerinde İmmünfloresan Boyama	29

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Primer Miyoblast Hücre Kültürü ve Miyoblastların Miyotüplere Farklılaştırılması	31
4.2. Megakoniyal KMD Hastasına Ait Primer Hücrelerde Mitokondri Ağının IF Boyama ile Analizi	33
4.3. Megakoniyal KMD Hastasına Ait Primer Hücrelerde Hasarlı Mitokondri Yerleşiminin Konfokal Mikroskobu ile Analizi	36
4.4. Megakoniyal KMD Hastasına Ait Primer Hücrelerinde Mitokondriyal Füzyon/Fisyon Proteinlerinin Western Blot Analizi	38
4.5. Megakoniyal KMD ve Kontrol Primer Hücrelerinde Mitokondriyal Fisyon Proteinlerinin IF Boyama ile Analizi	40
4.6. Megakoniyal KMD ve Kontrol İskelet Kas Dokusunda Mitokondri Ağının IF Boyama ile Analizi	44
4.7. Megakoniyal KMD ve Kontrol İskelet Kas Biyopsi Örneklerinden Alınan Kesitlerde Mitokondriyal Fisyon Proteinlerinin IF Boyama ile Analizi	44
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	56
6.1. Sonuçlar	56
6.2. Öneriler	57
7. KAYNAKLAR	59
8. EKLER	
EK 1: Tez Çalışması İle İlgili Etik Kurul İzni	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece santigrat
µM	Mikromolar
AF488/ 568	<i>Alexa Fluor 488/ 568</i>
APAF1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
APS	Amonyum per sülfat
ATP	Adenozin trifosfat
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bç	baz çifti
BSA	Dana Serum Albümini
CaMKIα	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Ia</i>
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CHKB	Kolin Kinaz Beta
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMD	<i>Duchenne Müsküler Distrofi</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit
Drp1	<i>Dynamin-related protein 1</i>
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
ETZ	Elektron Transport Zinciri
FBS	Fetal dana serumu
Fis1	<i>Mitochondrial fission protein 1</i>
g	Gram
GTPaz	Guanozin trifosfataz
HRP	<i>Horseradish</i> Peroksidaz
INF2	<i>Inverted formin 2</i>

IP3R	İnositol 1,4,5-trifosfat reseptörü
kDa	Kilo Dalton
KMD	Konjenital Musküler Distrofi
L	Litre
LDS	Lityum dodesil sülfat
LGMD2A	<i>Limb Girdle</i> Musküler Distrofi tip 2A
L-OPA1	<i>Long- Optic Atrophy 1</i>
MAM	Mitokondri-asosiye membran
MAPL	<i>Mitochondrial-anchored protein ligase</i>
Mfn1/2	Mitofusin 1/ 2
Mff	<i>Mitochondrial fission factor 1</i>
mg	Miligram
MIB	<i>Mitofusin-binding protein</i>
MiD49/ 51	<i>Mitochondrial dynamics protein 49/ 51</i>
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mM	Milimolar
ml	Mililitre
MPP	<i>Mitochondrial processing protease</i>
NaCl	Sodyum klorür
nDNA	Nükleer DNA
OPA1	<i>Optic Atrophy Protein 1</i>
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Fosfatidilkolin
PE	Fosfatidiletanolamin
PFA	Paraformaldehit
PGC1α	<i>Peroxisome proliferative activated receptor-δ coactivator 1α</i>
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
PKA	Protein kinaz A

PS	Fosfatidilserin
PVDF	Polivinilidin Florür
<i>rmd</i>	<i>Rostracaudal</i> müsküler distrofi
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	Ribosomal ribonkleik asit
ROS	Reaktif Oksijen Trleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEN5	<i>Sentrin Specific Protease 5</i>
Stoml2	<i>Stomatin-like protein2</i>
SUMO-1	<i>Small ubiquitin-like modifier-1</i>
S-OPA1	<i>Short- Optic Atrophy 1</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween20</i>
Tom20	<i>Translocase of Outer Membrane 20</i>
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit
UPRmt	Mitokondriyal Katlanmamış Protein Cevabı
UPS	Ubikitin Proteolitik Sistem

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Mitokondriyal füzyon mekanizması ve bu süreçte görev alan temel proteinler.	8
2.2. Mitokondriyal fisyon mekanizması ve bu süreçte görev alan temel proteinler.	10
2.3. Mitokondriyal fisyon mekanizmasında gözlenen organel boğumlanma sürecinin ER ile ilişkisi.	11
2.4. Megakoniyal KMD iskelet kas biyopsisinin karakteristik histolojik özellikleri.	14
2.5. Fosfatidil kolin biyosentez yolları (Kennedy ve MAM yolu).	15
4.1. Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücrelerinin miyojenik farklılaşma görüntüleri.	32
4.2. Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde mitokondri morfolojisinin ve ağ yapısının floresan mikroskobu görüntüleri.	34
4.3. Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde mitokondri morfolojisinin ve ağ yapısının konfokal mikroskobu görüntüleri.	35
4.4. Megakoniyal KMD hastasına ait miyoblast, miyotüp ve fibroblast hücrelerinde mitokondri morfolojisinin ve ağ yapısının iki farklı alan görüntüsü.	36
4.5. Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde hasarlı mitokondriilerin yerleşiminin konfokal mikroskobu görüntüleri.	37
4.6. Kontrol bireye ve Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde mitokondriyal füzyon ve fisyonda görevli temel proteinlerin Western Blot analizi.	39
4.7. Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücrelerinde mitokondriyal fisyonda görevli Drp1 proteininin IF boyama görüntüsü.	41
4.8. Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücrelerinde mitokondriyal fisyonda görevli Fis1 proteininin IF boyama görüntüsü.	42
4.9. Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücrelerinde mitokondriyal fisyonda görevli Mff proteininin IF boyama görüntüsü.	43
4.10. Kontrole Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsi örneklerinden alınan boyuna kesitlerde mitokondri ağ yapısının floresan mikroskop görüntüsü.	44

- 4.11.** Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsi örneklerinden alınan enine kesitlerde mitokondriyal fisyonda görevli Drp1 proteininin IF boyama görüntüleri. 46
- 4.12.** Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsi örneklerinden alınan enine kesitlerde mitokondriyal fisyonda görevli Fis1 proteininin IF boyama görüntüleri. 47
- 4.13.** Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsi örneklerinden alınan enine kesitlerde mitokondriyal fisyonda görevli Mff proteininin IF boyama görüntüleri. 48
- 5.1.** Megakoniyal KMD hastalığının patogenezinde mitokondriyal fisyon mekanizmasının olası rolü. 53

1. GİRİŞ

Mitokondriler ökaryot hücrelerin yaşamını sürdürebilmeleri için enerji sağlamak gibi hayati önem taşıyan bir işleve sahip olmanın yanı sıra, yağ asidi metabolizması, aminoasit sentezi ve Demir (Fe)/Sülfür (S) kümelerinin oluşumu, Ca^{+2} homeostazı ve sinyalizasyonu ve hücre ölümü gibi birçok yolda kritik rol oynamaktadır (1-5). Özellikle iskelet kası, kalp kası ve nöron gibi yüksek enerji kullanımına gereksinim duyan hücre ve dokularda fazla sayıda bulunur. Bilimsel araştırmalar sonucunda statik yapısı olduğu düşünülen mitokondrilerin, sürekli fisyon ve füzyon mekanizmaları geçiren mobil organeller olduğu saptanmıştır (6-8). Mitokondriyal füzyon iki mitokondrinin birleşip tek bir yapı oluşturması iken, mitokondriyal fisyon bir mitokondrinin bölünerek iki ya da daha fazla yapı meydana getirmesi işlemidir. Fisyon ve füzyon mekanizmaları, dinamik bir mitokondri ağı oluşumuna neden olmakta ve hücre içerisinde süregelen bu organel hareketleri mitokondri dinamiği olarak tanımlanmaktadır (9). Bu iki zıt mekanizma arasındaki denge hücrenin içinde bulunduğu fizyolojik duruma göre mitokondri morfolojisini ve boyutunu etkilemesinin yanı sıra, mitokondri işlevini de düzenler (10). Bu nedenle mitokondri dinamiği, organel düzeyindeki hücresel kalite kontrol mekanizmalarının önemli bir bileşeni olarak kabul edilmektedir (11). Göreceli olarak düşük seviyedeki stres altındaki hücrelerin mitokondrileri, hasarlı organeldeki hataları seyreltmek amacıyla sağlıklı mitokondrilerle füzyona girmeyi tercih ederken, hücresel stresin arttığı durumda organelin en hasarlı kısmının yok edilmesi amacıyla fisyon geçirmeyi tercih ederler (5). Mitokondri ve hücre için hayati önem teşkil eden bu iki yolak, birçok hücresel işlemde yer alan guanozin trifosfat (GTPaz)'ların *Dynamin* süper aile üyeleri tarafından düzenlenmekte olup, bu faktörlerin mayadan memelilere kadar korunduğu saptanmıştır (12). Halen birçok noktada eksik bilgiler bulunmakla birlikte, mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarının, bu yollarda görevli temel proteinlerin post-transkripsiyonel ve post-translasyonel modifikasyonları aracılığıyla kontrol edildiği tespit edilmiştir.

Mitokondriyal DNA (mtDNA) veya nükleer DNA (nDNA)'daki mutasyonlara bağlı olarak oluşan primer mitokondriyal solunum zinciri hataları, hücredeki enerji üretimini doğrudan etkilemekte ve öncelikli olarak iskelet kası ve sinir sistemi

bulguları ile karakterize olan mitokondriyal hastalıkların (mitokondriyal sitopatiler) patogeneğinde önemli bir role sahip olmaktadır. Bu hastalıklarda, mitokondri hasarı beklenen primer bulgu olarak gözlenmektedir (13). Ancak, mitokondriyal sitopatiler dışındaki genetik ve patolojik olarak farklı birçok nöromusküler hastalıkta da ortak bir bulgu olarak mitokondriyal hasar gözlenmektedir (14). Son yıllarda, organel seviyesindeki kalite kontrolünün önemli bileşenlerinden olan mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarının, hücredeki normal fizyolojik ve patolojik süreçlerde mitokondri işlevinin regülasyonunda önemli rolleri olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir. Ancak, bu mekanizmaların birçok nöromusküler hastalıkta ortak bir bulgu olarak gözlenen mitokondriyal hasara etkilerini araştırmaya yönelik bir çalışma günümüze kadar yapılmamıştır.

Tez çalışması kapsamında; mitokondri işlev-morfoloji bozukluğuyla ilişkili nadir nöromusküler hastalıklardan olan Megakoniyal Konjenital Musküler Distrofi (KMD)'nin patogeneğinde mitokondri dinamiğinin olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Megakoniyal KMD (OMIM 602541), 2011 yılında çoğunluğunu (toplam 15 hastanın 10'u) Türkiye'den hastaların oluşturduğu bireylerde tanımlanmış olan, lipit biyosentez hatası ile karakterize ilk KMD tipidir (15). Ökaryot hücre zarlarında en çok bulunan fosfolipit olan fosfatidilkolin (PC) biyosentez yolağındaki ilk aşamayı katalizleyen enzimi kodlayan Kolin Kinaz Beta (*CHKB*) (MIM 612395) genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmakta ve otozomal resesif kalıtım göstermektedir (15). Klinik olarak pediatrik dönemde ortaya çıkan kas güçsüzlüğü, motor gelişim basamaklarında gecikme, mental retardasyon ile karakterize olmakla beraber, hastalığın en karakteristik bulgusu iskelet kas biyopsilerinde kas liflerinde sarkolemaya yakın olarak yoğunlaşmış ve hücre merkezinde seyrek olarak gözlenen morfolojik olarak aşırı büyük (megakoniyal) mitokondrilerdir (15-17). Mitokondrilerin bu sıradışı morfolojisi, hastalığın patogeneğinde mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarının rolü olduğunu düşündürmektedir. Fare modellerinde yapılan çalışmalarda *Chkb* gen mutasyonları; ROS (reaktif oksijen türleri) üretimi artışı, mitokondriyal işlev bozukluğu ve mitofaji yolağının aktive olması ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen (18, 19) günümüze kadar bu hastalığın patogeneğinde mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarının işlevini araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca, hücre içinde PC üretimini telafi edebilmek

için hasarlı PC biyosentez yolağının (*Kennedy* yolağı) yerine alternatif bir yolak olan mitokondri ile ilişkili/asosiye endoplazmik retikulum (ER) membran (MAM) yolağının devreye girebileceğı ve buna bağılı olarak MAM'da işlev kaybı meydana gelebileceğı öne sürülmüştür (20). Mitofusin 2 (Mfn2) ve *Mitochondrial fission protein 1* (Fis1) gibi mitokondri dinamiğinde görevli bazı temel proteinlerin MAM ile ilişkili olduğı bilindiğinden, Megakoniyal KMD hastalığında gözlenen PC sentez hatasının hücrede dolaylı yoldan mitokondri dinamiğı hasarı oluşturması hastalığın patogeneğine etki eden faktörlerden biri olabilir (21, 22).

Bu doğrultuda tez çalışmasında, *CHKB* geninde homozigot olarak c.722A>G (p.Asn241Ser) yanlış anlamlı mutasyonu taşıyan Megakoniyal KMD hastasından kurulan primer miyoblast hücre kültürü uygun koşullarda miyotüplere farklılaştırılmış, kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak mitokondri morfolojisi, yerleşimi ve dinamik ağ yapısı incelenmiş, mitokondriyal fisyon [*Dynamin related protein 1* (Drp1), *Mitochondrial fission factor* (Mff), Fis1) ve füzyonda (Mitofusin1(Mfn1), Mfn2 ve *Optic Atrophy 1* (OPA1)] görevli temel proteinleri tanıyan uygun antikorlar ile Western Blot analizi ve immünfloresan (IF) boyamalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Western Blot ile ifade seviyesinde azalma saptanan proteinler Megakoniyal KMD hastasına ait kas biyopsilerinde IF boyama yapılarak kontrol ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondri ve İşlevleri

Ökaryot organizmaların tamamında bulunan ve canlılığın devamı için gerekli olan mitokondriler, kendi genomuna sahip yarı-özerk organelerdir. Organelin kendine özgü kompartmanlara ayrılmış olan yapısına baktığımızda; iki katlı iç ve dış membran, membranlar arası boşluk ve mtDNA'yı da içeren jel kıvamında matriks yapısından oluştuğunu görürüz. Ağır ve hafif zincir olmak üzere çift zincirden oluşan ve halkasal yapıda bulunan mtDNA, 16.569 baz çifti (bç) uzunluğunda olup, 37 gen içermekte ve elektron transport zinciri (ETZ)'nde görevli bazı temel proteinlerin yanı sıra, ATP sentaz enziminin belirli alt ünitelerini kodlamak suretiyle toplam 13 polipeptit ve mitokondriye özgü 22 tRNA ve 2 rRNA sentezinden sorumludur (23). Mitokondriyal proteom; mtDNA ve nDNA tarafından kodlanan 1200 kadar proteinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (24). Mitokondriyal proteinlerin yalnızca %1'i mtDNA tarafından kodlanmakta iken, geriye kalan %99'u nDNA tarafından kodlanmakta ve sitozolde serbest ribozomlarda gerçekleşen translasyon sonrasında translokaz proteinleri yardımıyla mitokondriye taşınmaktadır (25, 26). Mitokondri işlevi hücre yaşamı ve ölümü için kritik öneme sahiptir ve her iki genomun koordineli olarak çalışması ile birçok faktör tarafından kontrol edilmektedir (23). Organelin en önemli işlevi hücre içi metabolik faaliyetlerin devamlılığı için gerekli olan ATP'nin üretimi olup; enerji eldesi hücre solunum sürecinde gerçekleşen oksidatif fosforilasyon aracılığıyla sağlanmaktadır. Karbonhidratların yanı sıra, yağ asitlerinin β -oksidasyon ile yıkımının gerçekleşmesi de mitokondrinin görevleri arasındadır (5). Enerji ihtiyacına göre memeli somatik hücreleri çok farklı sayılarda (80-2000) mitokondri içerebildikleri gibi (27), organel başına mtDNA kopya sayısı da farklı (1-15) olabilmektedir (28). Enerji üretimine ek olarak mitokondriler; ETZ, solunum reaksiyonları, DNA sentezi ve tamiri ile ribozom biyogenezinde rol oynayan birtakım proteinlerin yapısına katılan demir (Fe)-sülfür (S) kümelerinin biyogenezinde de görev almaktadır (3). Hücre içinde Ca^{+2} homeostazı ve sinyalizasyonu süreçlerinde de mitokondrinin rolü bulunmaktadır. Mitokondri dış membranında bulunan mitokondriyal Ca^{+2} *uniporter* ve Na^{+2}/Ca^{+2} pompaları aracılığıyla sitoplazma ile; inositol 1,4,5-trifosfat reseptörü (IP3R) ve voltaj bağımlı anyon kanalları aracılığıyla

da endoplazmik retikulum (ER) ile mitokondri arasında iyon değişimi sağlanmaktadır (1, 2). Bunun yanı sıra mitokondriler hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptoz yollarında kritik bir role sahiptir. Apoptoz sürecini başlatan ölüm sinyali geldiğinde pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri oligomerize olarak mitokondri dış zarına yerleşir ve zarın geçirgenliğinin artmasına sebep olur. Açılan porlardan sitozole çıkan sitokrom C, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ve prokaspaz 9 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturmakta ve kaspaz aktivasyonu ile apoptozu aktive etmektedir (4). Aynı zamanda mitokondriler, ER ve peroksizom ile iletişime girerek metabolit, protein ve lipit değişimi yapmakta ve bu şekilde hücre içindeki organeller arası iletişimde de rol oynamaktadır (29).

2.2. Mitokondri ve Kalite Kontrol Mekanizmaları

Mitokondriler, enerji ihtiyacına bağlı olarak hücre döngüsünden bağımsız olarak sürekli gerçekleştirdikleri DNA replikasyonu ve solunum reaksiyonlarının yan ürünü olan ROS birikimi sebebiyle yüksek miktarda strese ve mtDNA hasarına maruz kalmaktadır. Hücrelerin sağlığını ve yaşam süresini etkileyen bu organellerin bu nedenlere bağlı olarak farklı seviyelerde kalite kontrol mekanizmaları ile kontrol edilmesi gerekmektedir. Bunlar moleküler seviyede, organel seviyesinde ve hücresel seviyede kalite kontrol mekanizmaları olacak şekilde üç temel başlık altında toplanabilir. Solunum zincirinin yan ürünü olan ROS'ların süperoksit dismutaz, peroksiredoksin gibi anti-oksidan enzimlerle temizlenmesi (30) ayrıca matrikste ve zarlar arası boşlukta mitokondriyal homeostazın bozulması durumunda devreye giren ve organelin protein katlama kapasitesini arttırmak için şaperon proteinlerin ve katlanamayan proteinleri tanıyarak yıkımını sağlamakla görevli proteazların ifade artışlarını sağlayan mitokondriyal katlanmamış protein cevabı (UPR_{mt}) ve organelin dış zarında biriken katlanamamış/yanlış katlanmış proteinlerin Ubikitin Proteolitik Sistem (UPS) ile yıkımı moleküler seviyedeki kalite kontrol mekanizmalarını oluşturmaktadır (31). Organel seviyesinde kalite kontrol mekanizmaları ise, son yıllarda temel bileşenleri ve ayrıntılı mekanizması aydınlatılmaya çalışılan mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmaları ile hasarlı organelin tamamen yok edilmesi işlemi olan mitofajidir. Organel hasarının ve hücresel stresin tamir edilemediği durumda apoptoz ile hücrenin yok edilmesi ise hücresel seviyede kalite

kontrol mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır (32). Geçtiğimiz yıllarda bu kalite kontrol mekanizmalarının hiyerarşik olarak çalışmaları, hasar arttıkça daha üst seviyede bir kalite kontrol mekanizmasının devreye girdiği kabul ediliyorken (33), güncel çalışmalarda bu mekanizmaların belirli bir sıra ile devreye girmedikleri, stres uyarımına ve süresine, yardımcı proteinlerin aktivasyonuna ve mitokondriyal hasarın derecesine bağlı olarak farklı sıralamalarla da gerçekleşebilecekleri bulgularına ulaşılmıştır (32). Ancak son yıllarda, birbirinden farklı birçok hastalığın patogenezinde organel seviyesindeki kalite kontrol mekanizmalarından mitokondri dinamiğinin doğrudan veya dolaylı olarak işlevi olduğu tespit edilmiştir (9, 34-36).

2.3. Mitokondri Dinamiği

Hücre içinde statik ve silindirik yapıda olduğu düşünülen mitokondrilerin, ilk kez 1914'te canlı tavuk embriyo hücrelerinin farklı zamanlarda ışık mikroskobunda incelenmesi sonucunda hareketli oldukları ve bölündükleri fikri öne sürülmüştür (7). Ancak 1950'lerde, elektron mikroskopi teknolojisinin gelişmesine paralel olarak mitokondrilerin silindirik şekilde ve tek tek duran statik organeller olduğu fikri baskın hale gelmiştir (8). 1990'ların başında ise, faz-kontrast ve canlı hücre floresan mikroskobunun geliştirilmesiyle birlikte sağlıklı hücrelerde sürekli füzyon ve fisyon geçiren dinamik organeller olduğu saptanmış olup, ilerleyen yıllarda bu dinamizmin moleküler mekanizması ve görev alan temel elemanlar tanımlanmaya başlamıştır (6). Mitokondriyal füzyon, iki mitokondrinin iç ve dış zarlarının koordineli olarak birleşmesi işlemidir. Mitokondriyal fisyon mekanizması ise, tek bir mitokondrinin bölünerek iki ya da daha fazla bağımsız yapı meydana getirmesi olaydır. Hücre içinde süregelen bu fisyon ve füzyon mekanizmaları, dinamik bir mitokondri ağı oluşumuna neden olmakta ve mitokondri dinamiği olarak tanımlanmaktadır (5). Hücre homeostazının devamlılığı için bu dinamik ağ yapısının kontrol altında tutulması gerekmektedir. Enerji ihtiyacı olan ve düşük seviyede stres altındaki mitokondriler füzyonu tercih ederken, yüksek seviyede stres altındaki hasar görmüş mitokondriler, hasarlı kısımlarından kurtularak yeni mitokondriler oluşturmak ve kalite kontrolü kolaylaştırmak için fisyon geçirmeyi tercih ederler (5). Mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmaları organelin hücre içindeki sayısını ve boyutunu etkilemekte olup bu iki mekanizma arasındaki denge mitokondri morfolojisini belirlemektedir (10).

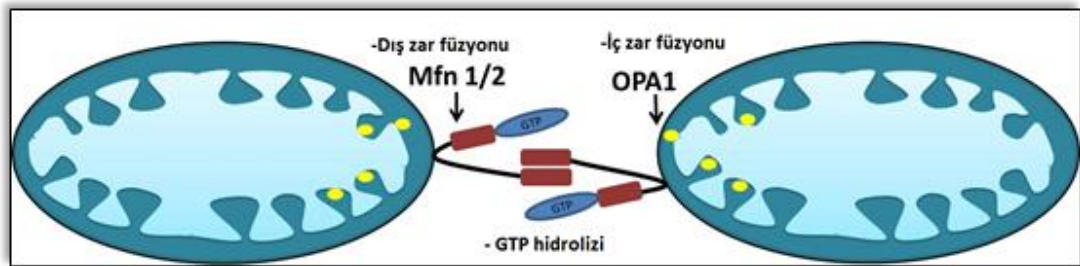
Hücrede füzyon oranı arttığında uzun veya birbirine bağlı borucuklar şeklinde mitokondriler gözlenirken; fisyon oranı arttığında ise bölünmüş, küçük küre şeklinde mitokondriler gözlenmektedir (37). İki zıt mekanizma arasındaki denge, organel morfolojisinin yanı sıra, mitokondrilerin işlevini ve dağılımlarını da düzenler. Bu nedenle mitokondri dinamiği, organel düzeyindeki kalite kontrol mekanizmalarının önemli bir bileşeni olarak kabul edilmektedir (11).

Mitokondrinin yaşam döngüsü, var olan organelin büyümesi ve bölünmesi yani mitokondriyal biyogenez ile başlayıp, hasarlı mitokondrilerin yok edilmesi işlemi olan mitofaji ile son bulur. Bu iki olay arasında mitokondriler sürekli olarak füzyon ve fisyon geçirerek hücrenin fizyolojik durumuna göre heterojen bir mitokondri ağı oluştururlar (38). Hücre bölünmesi sırasında gerçekleşen mitokondriyal biyogenez sürecinde, simetrik bölünme aracılığıyla tek mitokondriden iki ya da daha fazla sağlıklı mitokondri meydana gelirken, fisyon sürecinde asimetric bölünme aracılığıyla tek mitokondriden bir sağlıklı ve bir hasarlı/depolarize mitokondri meydana gelir ve depolarize mitokondri mitofaji ile yok edilir (39). Yapılan çalışmalarda mitokondriyal biyogenez ile füzyon yolağının ilişkili olduğu ve ortak olarak *Peroxisome proliferative activated receptor- δ coactivator 1 α* (PGC-1 α) tarafından kontrol edildiği yönünde bulgular elde edilmekle birlikte (40-44), mitokondri dinamiği ve biyogenezi arasındaki işlevsel ilişkiyi net olarak açıklamak için ek araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4. Mitokondriyal Füzyon Mekanizması

Mitokondriyal füzyon, iki organelin iç ve dış zarlarının koordineli bir şekilde, farklı proteinler aracılığıyla iki kademedede birleşmesi işlemidir. Düşük seviyede hücrel stres durumunda, birikmiş DNA mutasyonlarının ve okside olmuş proteinlerin seyreltilmesi amacıyla sağlıklı mitokondri ile kısmen hasarlı mitokondri füzyonu gerçekleşmekte ve bu şekilde hasarlı mitokondri, eksiklerini sağlıklı mitokondri sayesinde tamamlayabilmektedir. Ayrıca mitokondriyal füzyon, membran lipidlerinin ve matrikslerin karışıp yeniden düzenlenmesini sağlayarak solunum zinciri bileşenlerinin doğru yerleşimi ve dolayısıyla organel işlevi için büyük önem taşımaktadır (45-47).

Dış zara yerleşik bulunan Mfn1 ve Mfn2 proteinleri iki mitokondrinin dış zarlarının birleşmesini sağlarken, OPA1 proteini iç zar birleşmesini koordine eder. Bu mekanizma mayadan memelilere kadar korunmuştur (12). Mitokondriyal füzyonun ilk aşaması olan iki mitokondrinin dış zarlarının birbirine tutunarak yaklaşması Mfn1 ve Mfn2 proteinleri aracılığıyla gerçekleşir. Mfn1 ve Mfn2, karşılıklı olarak (*trans*) çalışarak homo- hetero-oligomerik antiparalel çift kıvrımlı yapılar oluşturabilen, mitokondrinin dış zarına yerleşik *Dynamine* ailesi üyesi büyük GTPaz'lardandır. *Mitofusin*'in iki izoformu olan Mfn1 ve Mfn2, mitokondriyal füzyon mekanizmasında tanımlanan ilk anahtar proteinler olmakla birlikte, paralog genler tarafından kodlanmakta ve %81 oranında homoloji göstermektedirler (35, 48, 49). Mitokondriyal füzyonun ikinci aşaması olan, iki mitokondrinin zarlar arası boşluklarının etkileşimi ve iç zar füzyonu, OPA1 proteini tarafından düzenlenir (Şekil 2.1). OPA1, zarlar arası boşlukta, iç zara yerleşik olarak bulunan *Dynamine* ailesi üyesi GTPaz'dır. OPA1 proteininin alternatif *splicing* sonucu oluşan 8 adet formu ve her bir formun kısa ve uzun izoformları bulunmaktadır (50). Mitokondriyal füzyonun iki aşamasında da GTP hidrolizi gerçekleşmektedir (45). *In-vivo* ortamda iç ve dış zar füzyonunun senkronize olarak gerçekleşip gerçekleşmediği kesin olmamakla birlikte *in-vitro* deneylerde mitokondri membran potansiyelini bozan kimyasal ajan muamelesiyle füzyon mekanizmasının iki aşamasının birbirinden bağımsız olarak da gerçekleşebileceği gösterilmiştir (51).



Şekil 2.1. Mitokondriyal füzyon mekanizması ve bu süreçte görev alan temel proteinler (Aksu ve Balci-Hayta'dan uyarlanmıştır (2016)(52)).

Mfn1 proteininin iki mitokondriyi birbirine bağlama kapasitesinin Mfn2'ye oranla daha yüksek olduğu ve saflaştırılmış haldeki Mfn1'in GTPaz aktivitesinin Mfn2'den 8 kat fazla olduğu saptanmıştır (53, 54). Ayrıca Mfn1-Mfn2 hetero-oligomerik yapıların, homo-oligomerik yapılarla kıyasla (Mfn1-Mfn1 veya Mfn2-

Mfn2) mitokondriyal füzyonun daha etkin bir şekilde gerçekleşmesini sağladıkları tespit edilmiştir (55).

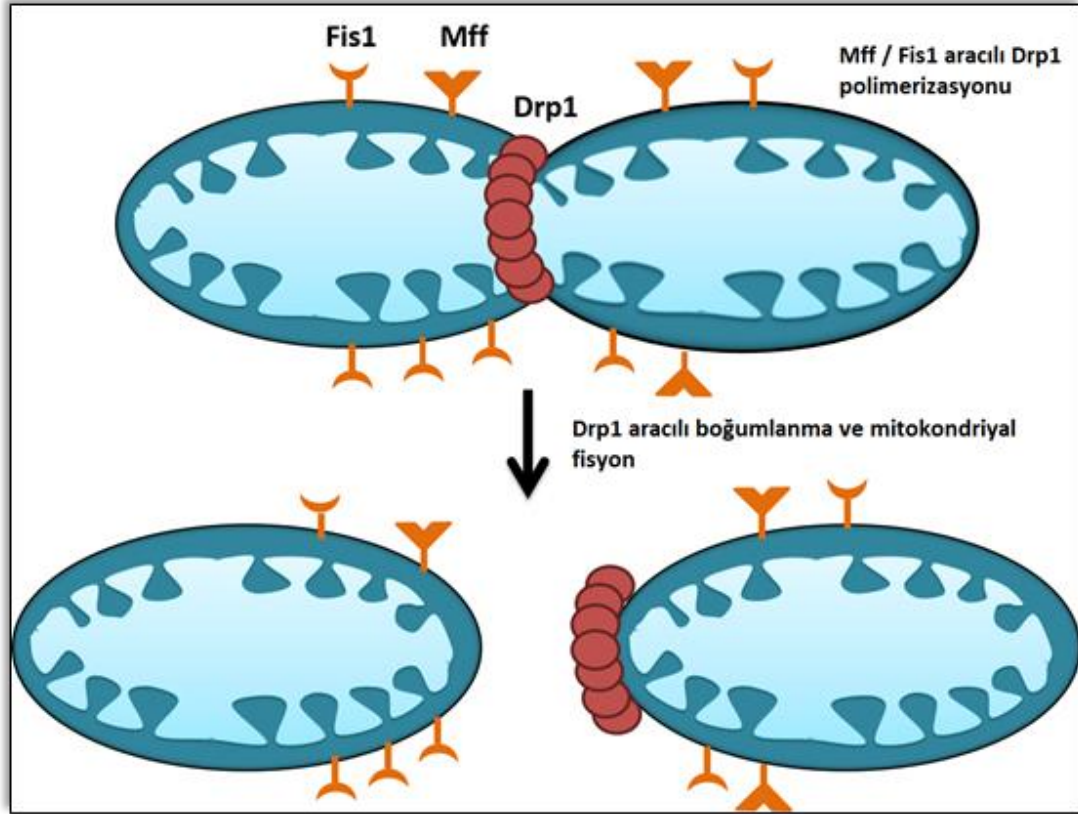
Yapılan çalışmalarla OPA1 proteininin kristanın düzenlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (46, 56, 57). Fare dokusunda ve kültür hücrelerinde yapılan çalışmalarda ise Mfn1-2 veya OPA1'i kodlayan genler *knock-out* edilip, füzyon mekanizması tamamen devre dışı bırakıldığında, mitokondriyal DNA içeriği, membran potansiyeli ve solunum zinciri aktivitesinde ciddi seviyede azalma olduğu görülmüştür (58, 59). Bunun yanı sıra, mitokondriyal füzyon mekanizmasının embriyonik gelişim sürecinde de önemli rol oynadığı Mfn1 veya Mfn2 *knock-out* fare modelinde yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur (58). Mitokondriyal işlev ve hücre homeostazı için hayati önem taşıyan bu mekanizma henüz tamamen aydınlatılamamış olsa da, mitokondriyal füzyon sürecinde görevli temel proteinlerin post-transkripsiyonel ve post-translasyonel modifikasyonlar ile kontrol edildiği bilinmektedir (48).

2.5. Mitokondriyal Fisyon Mekanizması

Mitokondri dinamiğinin diğer bir bileşeni olan fisyon, tek bir mitokondriden iki ya da daha fazla bağımsız organel oluşumu olmakla beraber, mitokondrinin hücre iskeleti elemanları aracılığıyla taşınmasında, hasarlı organellerin mitofaji yoluyla yok edilmesinde ve kristanın şeklinin düzenlenerek zarlar arası boşluktan pro-apoptotik faktörlerin salınması aşamalarında da görevli temel bir mekanizmadır (38, 60).

Mitokondriyal fisyon mekanizmasında *Dynamine* aile üyesi Drp1 proteini kilit rol oynamaktadır. Drp1, dimer veya tetramer olarak, çoğunlukla sitoplazmada bulunmakla birlikte, mitokondriyal fisyonun başlayacağı bölgelerde, ER'ye ve mikrotübüllere bağlı veziküllere yakın yerleşimde de bulunabilmektedir (61, 62). Mitokondri bölüneceği zaman Drp1; Fis1 ve Mff başta olacak şekilde dış membrana yerleşik GTPaz olmayan reseptör proteinler tarafından mitokondrinin dış zarına, genellikle mitokondrinin ER ile iletişim halinde olduğu bölgelere getirilir. Bunun sonucunda, Drp1 spiral oluşturarak organeli boğumlamak suretiyle iç ve dış zarı birbirinden ayırır (10, 63) (Şekil 2.2). Yapılan farklı çalışmalarda Fis1 veya Mff genleri *knock-down* edildiğinde, Drp1'in mitokondri dış zarına getirilmesi

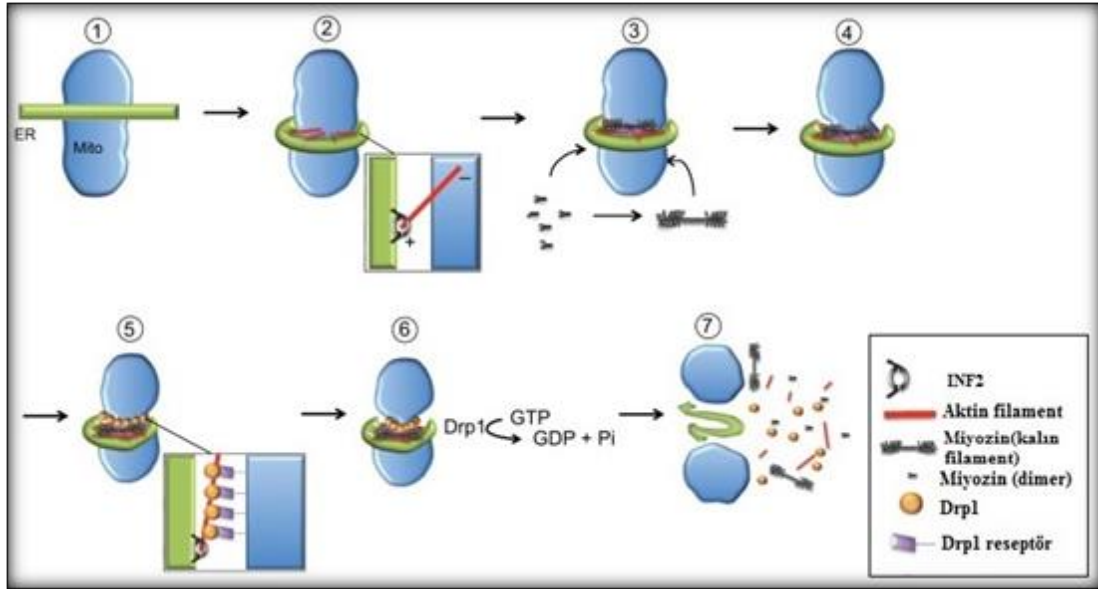
gerçekleşemediği için hücrelerde uzun ve tübüler mitokondriler gözlenirken, bu genlerin arttırılmış ifadesinin bölünmüş, küçük yuvarlak morfolojide mitokondri yapısı oluşumunu sağladığı gözlenmiştir (64, 65). Fis1 ve Mff'ye ek olarak, *Mitochondrial dynamics protein 49 ve 51* (MiD49 ve MiD51) proteinlerinin de Drp1 için reseptör proteinler olduğu bilinmekle birlikte (66), bu proteinlerin fisyon mekanizmasındaki görevleri halen aydınlatılamamıştır.



Şekil 2.2. Mitokondriyal fisyon mekanizması ve bu süreçte görev alan temel proteinler. (Aksu ve Balci-Hayta'dan uyarlanmıştır (2016) (52)).

Son yıllarda, fisyon mekanizmasındaki organel boğumlanma süreci için ER ile ilişkili olabilecek bir mekanizma önerilmiştir. Söz konusu mekanizmaya göre, fisyonun gerçekleşeceği noktada mitokondri ve ER etkileşime girer ve ER tübülleri fisyon bölgesini çevreleyerek sıkılaşmaya başlar. Ardından, ER'de yerleşik olarak bulunan *inverted formin 2* (INF2) fisyon bölgesinde aktin filament polarizasyonu sağlar. Daha sonra motor proteinlerden miyozin II bu birleşmeyi kuvvetlendirir. Fis1 ve Mff aracılığıyla mitokondri membranına yerleşen Drp1'in GTP hidrolizi ile mitokondri membranını boğumlamasını tetikler (67, 68). Ayrıca, hücre iskelet

elemanlarından septinlerin de hem Drp1 hem de miyozin II ile interaksiyona girerek fisyon katkısı sağladığı tespit edilmiştir (69). Mitokondri bölündükten sonra aktin, miyozin ve Drp1 oligomerinden oluşan fisyon kompleksi dağılır (67, 68) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Mitokondriyal fisyon mekanizmasında gözlenen organel boğumlanma sürecinin ER ile ilişkisi. (Hatch ve ark.'dan uyarlanmıştır (2014) (67)).

2.6. Mitokondriyal Füzyon ve Fisyon Mekanizmalarının Regülasyonu

Hücre içinde sağlıklı bir mitokondri popülasyonu bulundurmak için füzyon ve fisyon mekanizmalarının belirli bir denge halinde bulunması ve çok sıkı bir şekilde denetlenmesi gerekmektedir. Füzyon ve fisyon görevli temel proteinler post-transkripsiyonel ve -translasyonel modifikasyonlar ile kontrol edilerek işlevsel hale gelmektedirler.

Mitofusin-binding protein (MIB), *stomatin-like protein2* (Stoml2), pro-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinden Bax ve Bak, ayrıca *membrane-associated RING-CH* (MARCH-V) proteinlerinin, mitokondriyal füzyonda görevli Mfn1 ve/veya Mfn2 ile etkileşime girerek füzyonu düzenledikleri tespit edilmiştir (70-74). Diğer taraftan mitokondriyal füzyon regülasyonu OPA1 proteinin işlenmesi ile düzenlenir (75). OPA1 proteinin *alternative splicing* ile üretilmiş 8 formu bulunduğu ve 3 farklı kesim noktası (S1, S2 ve *mitochondrial processing protease*-MPP kesim bölgeleri) taşıdığı tespit edilmiştir (50). Her bir *splice* formunun bir uzun (L-OPA1) ve bir veya daha

fazla kısa izoformu (S-OPA1) oluşmaktadır (75-77). OPA1 proteinleri mitokondriye taşınca ilk olarak MPP kesim noktasından kesilir ve mitokondri hedefleme sinyali çıkartılarak membrana yerleşik uzun OPA1 izoformu (L-OPA1) oluşturulur. Daha sonra bu proteinler, özgül proteazlar aracılığıyla S1 veya S2 kesim bölgelerinden kesilerek transmembran *domaini* atılır, zarlar arası boşluğa yerleşik olan kısa izoform (S-OPA1) meydana gelmiş olur (78). Bazı çalışmalarda, bu iki izoformun birlikte işlevsel olarak füzyonu gerçekleştirdikleri saptanmışken (47), yapılan farklı araştırmalarda füzyonun gerçekleşebilmesi için sadece uzun izoformun yeterli olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir (79). Dolayısıyla, OPA1'in proteolitik kesime uğraması proteini inaktifleştirmenin basit bir yolu mu yoksa S-OPA1'lerin farklı görevleri var mı sorularının yanıtları halen net olarak bilinmemektedir (75).

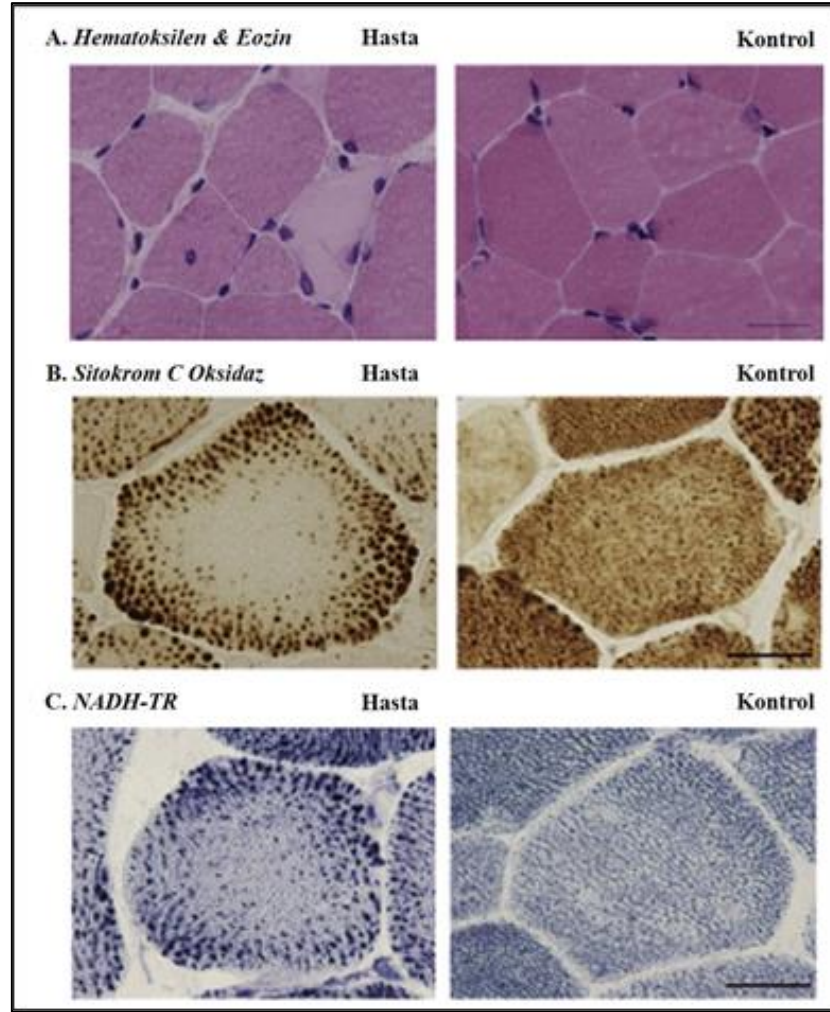
Mitokondriyal fisyonunda görevli temel proteinlerin regülasyonu da, fosforilasyon, ubikitinasyon, sumolasyon ve nitrosilasyon gibi birçok farklı post-translasyonel mekanizma aracılığıyla gerçekleşmektedir (10). *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Ia* (CaMKI α), *cyclin B-cyclin-dependent kinase* (Cyclin B-CDK), protein kinaz A (PKA) proteinleri, Drp1 proteinini üç farklı noktadan (Ser616, Ser637 ve Ser 693) fosforile ederek pozitif veya negatif yönde fisyonu regüle ederler (80-82). E3 ubikitin ligaz MARCH-V'in Drp1'i ve Fis1'i ubikitinleyerek fisyonu pozitif yönde etkilediği tespit edilmiştir (83). Buna ek olarak, *small ubiquitin-like modifier-1* (SUMO-1) ve *mitochondrial-anchored protein ligase* (MAPL)'in Drp1'e SUMO grubu ekleyerek fisyonu arttırdığı ve *sentrin specific protease 5* (SEN5)'in ise Drp1'den SUMO grubunu çıkararak fisyonu negatif yönde etkilediği bilinmektedir (84, 85).

2.7. Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi Hastalığı

Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi (KMD) (OMIM 602541), ilk kez 1998 yılında Japonya'dan 4 KMD hastasının incelendiği bir çalışmada, kas liflerinde sarkolemmaya yakın olarak yoğunlaşmış ve hücre merkezinde seyrek olarak gözlenen aşırı büyük (megakoniyal) mitokondriler ile karakterize yeni bir KMD tipi olarak tanımlanmıştır (16, 17). Sher ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı bir başka araştırmada ise, PC biyosentez yolağının (*Kennedy yolağı*) ilk aşamasını katalizleyen Kolin Kinaz Beta enzimini (86, 87) kodlayan *Chk β* geninde delesyon içeren fare

modelinde benzer histopatolojik bulgulara rastlanmıştır (19). İskelet kasında burundan kuyruğa (*rostromcaudal*) kas distrofi *gradienti* gözlenen bu fare modelinde (*rmd* fare), ilk kez bir fosfolipit biyosentez hatasının kas distrofisine sebep olduğu görülmüştür (19). Bu çalışmada, *Chkβ* gen mutasyonlarının; PC seviyesinin azalmasına, mitokondrilerde işlev kaybına ve mitofaji yolağının aktivasyonuna sebep olduğu gözlenmiştir. Kasta işlevsel olmayan mitokondrilerin yok edilmesine dengeleyici cevap olarak kalan mitokondrilerde hacim artışı olduğu öne sürülmüştür (88). *Rmd* farenin kas biyopsisinde saptanmış olan ilginç mitokondri morfolojisi bulgularının, 1998 yılında incelenen 4 Japon KMD hastasının bulguları ile uyumluluk göstermesi üzerine, farklı ülkelerden (10'u Türkiye, 4'ü Japonya, 1'i İngiltere) benzer bulgular saptanmış olan 15 KMD hastasının *CHKB* geni analiz edilerek hastalıktan sorumlu gen olduğu tespit edilmiştir. Mitsuhashi ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bu çalışmada, ökaryot hücre membranlarında en çok bulunan fosfolipit olan PC biyosentez yolağında ilk aşamada görevli enzimi kodlayan ve 11 ekzondan oluşan *CHKB* geninde homozigot veya bileşik heterozigot mutasyonlar (anlamsız, yanlış anlamlı, *splice site* mutasyonları, çerçeve kaymasına sebep olan/olmayan delesyonlar) saptanmış olup, hastalığın otozomal resesif olarak kalıtıldığı gösterilmiştir (15). Fakat mutasyon tipi ile hastalığın ciddiyeti arasında bir ilişki kurulamamıştır (88).

Megakoniyal KMD hastalığının klinik özelliklerine baktığımızda, hayatın ilk yıllarında ortaya çıkan kas güçsüzlüğü, motor gelişim basamaklarında ve konuşma becerisinde gecikme, beyinde yapısal anomali olmaksızın mental retardasyon ile karakterizedir (15). Bunlara ek olarak hastalarda, otistik özellikler (ekolali, tipik el hareketleri) ve ciddi davranış problemleri de (self mutilasyon, uyku bozuklukları, agresif hareketler, dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu) gözlenmektedir. Ayrıca, hastaların %40'ında dilate kardiyomyopati bulguları saptanmış olup, bazı hastalarda da iktiyoz-benzeri deri bulguları da ek olarak ortaya çıkmaktadır (89).

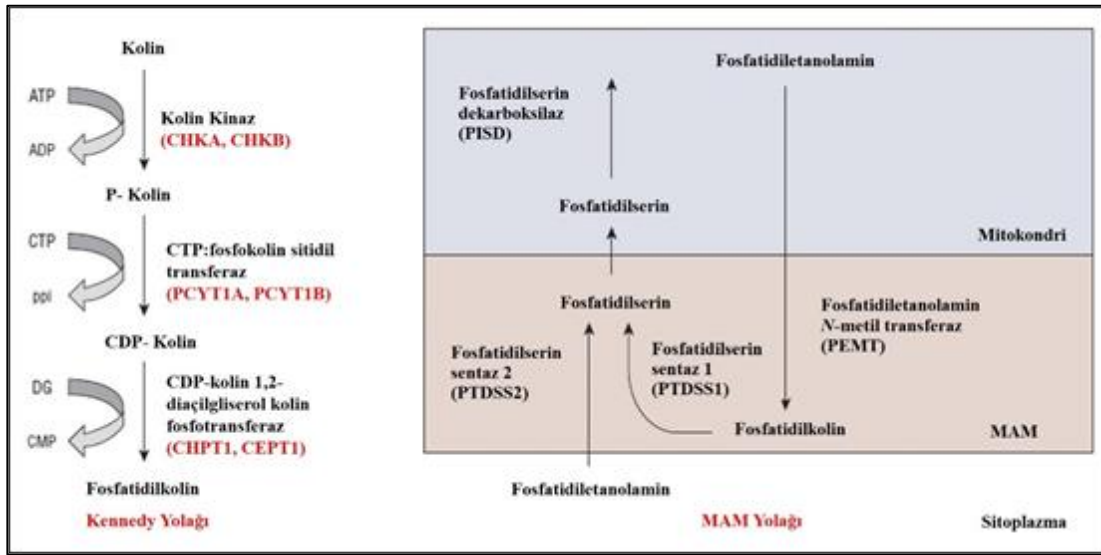


Şekil 2.4. Megakoniyal KMD iskelet kas biyopsisinin karakteristik histolojik özellikleri; (A) Hematoksilen Eozin Boyaması, (B) Sitokrom C oksidaz boyaması, (C) NADH-TR boyaması (Mitsuhashi ve ark.'dan uyarlanmıştır (2011) (15) Ölçek: 1µm).

2.8. Fosfatidilkolin Sentezi ve Mitokondri ile İlişkisi

CHKB geni, (MIM 612395, NM_005198.4, GenBank Gene ID 1120) 22. kromozomun uzun kolunda (22q13.33) yerleşim göstermekte, 11 ekzondan oluşmakta ve *CHKB* enzimini kodlamaktadır. *CHKB* enzimi, kolin kinazın (*CHK*) üç izoformundan ($\alpha 1$, $\alpha 2$ ve B) biri olup, PC biyosentez yolağının ilk aşamasını katalizlemektedir (90). PC, ökaryotik membran fosfolipitlerinin %50'sinden fazlasını oluşturması sebebiyle membranların yapısı ve işlevinde çok önemli rol oynamaktadır (91). *Rmd* fare modelinde yapılan çalışmalarda, PC'nin tüm dokulardaki biyomembranlarda bulunmasına rağmen *CHKB* mutasyonlarının sadece bazı dokuları etkilemesi *CHK* izoformlarının dokuya spesifik ifade olması ile açıklanmıştır (15, 19).

PC ve fosfatidiletanolamin (PE) *de novo* sentezi sitoplazmada ve ER'de (kasta sarkoplazmik retikulum) *Kennedy* yolağı ile gerçekleşmektedir. Bu yolakta ilk olarak CHKB aracılığıyla kolin fosfokoline, etanolamin fosfoetanolamine dönüştürülür ve devamında gerçekleşen enzimatik reaksyonlarla PC ve PE oluşturulur (20). Aynı zamanda, MAM'da gerçekleşen ikinci bir fosfolipit biyosentez yolağı da bulunmaktadır (92). PC ve PE, MAM da yerleşik bulunan fosfatidilserin sentaz aracılığıyla fosfatidilserin (PS)'e dönüştürüldükten sonra mitokondriye giren PS, matrikste bulunan PS karboksilaz yardımıyla PE'ye dönüştürülür. PE daha sonra MAM'a dönerek MAM'da yerleşik olarak bulunan PE metiltransferaz aracılığıyla PC'ye dönüştürülür (93) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Fosfatidil kolin biyosentez yolları (Kennedy ve MAM yolağı) (Gutierrez ve ark.'dan uyarlanmıştır (2012) (20)).

2.9. Megakoniyal KMD Hastalığının Patogenezinde Mitokondri Dinamiğinin Olası Rolü

Mitokondri dinamiğinde görev alanlar da dâhil olmak üzere, mitokondride görev alan proteinlerin çoğu nükleer genom tarafından kodlanmaktadır. mtDNA veya nDNA'daki mutasyonlara bağlı olarak oluşan primer mitokondriyal solunum zinciri hataları, hücredeki enerji üretimini doğrudan etkilemekte ve öncelikli olarak iskelet kası ve sinir sistemi bulguları ile karakterize olan mitokondriyal hastalıklarının (mitokondriyal sitopatiler) patogenezinde önemli bir role sahip olmaktadır. Bu

hastalıklarda, mitokondri işlev/morfoloji kaybı ve mitokondri dinamiği hataları beklenen bulgular olarak gözlenmektedir (13). Bunun yanı sıra; füzyon ve fisyon yolağında işlev gören proteinleri kodlayan genlerde saptanmış olan mutasyonların Charcot-Marie-Tooth nöropati tip 2 ve Otozomal Dominant Optik Atrofi gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların da içinde bulunduğu bir grup hastalığın patogenezinde doğrudan etki ettiği bilinmektedir (34-36, 94). Ancak geçtiğimiz son on yılda, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson) gibi mitokondri ile ilişkilendirilmeyen birçok farklı hastalığın patomekanizmasında da bozulmuş mitokondri dinamiğinin işlevi olduğu saptanmıştır (9).

Mitokondriyal miyopati dışındaki birçok farklı nöromüsküler hastalıkta [Duchenne Müsküler Distrofi (DMD), Limb Girdle Müsküler Distrofi tip 2A (LGMD2A), Megakoniyal KMD ve Kollajen VI Miyopatisi] mitokondriyal işlev ve morfoloji kaybı gözlenmekle beraber, nedenleri günümüze kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan deneysel çalışmalar, mitokondrielerde gözlenen işlev kaybının kas dejenerasyonunun erken safhalarında rolü olduğunu kanıtlamaktadır (14). Ayrıca, farklı genetik temelleri olan bu hastalıkların bir kısmında iskelet kas dokusunda mitofajik belirteçler saptanmıştır (95). Ancak, nöromüsküler hastalıklara ilişkin olarak organel seviyesindeki kalite kontrol mekanizmalarından mitokondri dinamiğinin ve bu mekanizmada görevli proteinlerin patolojik sürece etkisi olup olmadığını araştırmaya yönelik bir çalışma günümüze kadar yapılmamıştır. Mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarının kas lifi dejenerasyon sürecinin neresinde yer aldığı ve moleküler araçların bu yolaktaki potansiyel rolleri güncel araştırma konuları arasında yer almaktadır.

Tez çalışması kapsamında çalışılan Megakoniyal KMD, kas dokusunda mitokondri işlev-morfoloji bozukluğuyla ilişkili nadir nöromüsküler hastalıklar kategorisinde yer alan bir KMD tipidir (15). Hücredeki temel PC biyosentez yolağındaki (*Kennedy* yolağı) ilk aşamayı katalizleyen enzimi kodlayan *CHKB* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. *Kennedy* yolağında meydana gelen aksaklığı giderebilmek ve hücre içinde PC üretimini telafi edebilmek amacıyla alternatif olarak MAM yolağının devreye girebileceği, ancak organelde oluşabilecek stres nedeniyle, MAM'da işlev kaybı meydana gelebileceği öne sürülmüştür (20).

Mitokondri dinamiğinde görevli Mfn2 ve Fis1 gibi bazı temel proteinlerin MAM ile ilişkili olduğu bilinmektedir (21, 22). Bu nedenle, fosfolipit biyosentez hatasının hücrede dolaylı yoldan mitokondri dinamiği hasarı oluşturması beklenen bir sonuç olarak düşünülmüştür (20). Hastalığın en önemli ayırıcı bulgusu iskelet kas biyopsilerinde kas liflerinde sarkolemmaya yakın olarak yoğunlaşmış ve hücre merkezinde seyrek olarak gözlenen megakoniyal mitokondrilerdir (15, 17). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda, *CHKB* gen mutasyonları mitokondrilerde işlev kaybı ve mitofaji yolağının aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (19). Ancak, günümüze kadar bu hastalığın patogenezinde mitokondriyal kalite kontrol mekanizmalarının en önemli bileşenleri arasında yer alan füzyon ve fisyon mekanizmalarının işlevini araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Bu amaçla, tez çalışması kapsamında Megakoniyal KMD hastalığının patogenezinde mitokondri dinamiğinin olası rolü araştırılmıştır.

3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

- *CHKB* geninde homozigot (NM_005198.3) c.722A>G (p.Asn241Ser) mutasyonu taşıyan Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücresi (EuroBioBank, MRC CNMD Biobank London, Dubowitz Neuromuscular Unit, Institute of Child Health, örnek no: NH10-1412A)
- Kontrol primer miyoblast hücresi (EuroBioBank, örnek no: 145-01)
- *CHKB* geninde 8. ekzonda homozigot olarak (NM_005198.4) c.922C>T (p.Gln308X) mutasyonu taşıyan Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsi doku kesitleri (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Patoloji Ünitesi)
- Rutin tanı amaçlı amaçlı alınmış ve herhangi bir patolojik bulgu saptanmamış olan kontrol bireye ait iskelet kas biyopsi doku kesitleri (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Patoloji Ünitesi)

3.1.1. Hücre Kültürü

- *Skeletal Muscle Cell Growth Medium* (PromoCell)
- *Skeletal Muscle Cell Growth Medium SupplementMix* (PromoCell)
- *Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium* (PromoCell)
- *Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium SupplementMix* (PromoCell)
- Fetal Dana Serumu (FBS) (Biochrom)
- L-glutamin, 200 mM (Biochrom)
- At Serumu (HS) (Gibco)
- Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) (Biochrom)
- Tripsin/EDTA Solüsyonu (Biochrom)
- 1x Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS), pH 7,4 (Sigma)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)
- Hücre proliferasyonunu sağlayan hücre kültür ortamı:

Skeletal Muscle Cell Growth Medium	: 93 ml
Skeletal Muscle Cell Growth Medium Supplement Mix	: 5 ml
2 mM L-glutamin	: 1 ml

- | | |
|------------------------------------------------------------|---------|
| %1 Pen/Strep | : 1 ml |
| • Hücre farklılaşmasını sağlayan hücre kültür ortamı: | |
| Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium | : 96 ml |
| Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium Supplement Mix | : 2 ml |
| 2 mM L- glutamin | : 1 ml |
| %1 Pen/Strep | : 1 ml |

3.1.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

- Protein izolasyon tamponu (pH 7,4):

Trizma-baz	: 10 mM
NaCl	: 300 mM
EDTA	: 2 mM
Triton-X-100	: % 0,5
Proteaz inhibitörü tableti (Roche)	: 1 adet
- Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)
- *Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., NH, USA)

3.1.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

- %12'lik ayırıcı jel (10 ml):

%30 Akrilamid / bisakrilamid	: 4,0 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	: 2,5 ml
%10 SDS	: 0,1 ml
%10 amonyum persülfat (APS)	: 0,1 ml
TEMED	: 0,004 ml
Distile su	: 3,3 ml
- %15'lik ayırıcı jel (10 ml):

%30 Akrilamid / bisakrilamid	: 5,0 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	: 2,5 ml
%10 SDS	: 0,1 ml
%10 amonyum persülfat (APS)	: 0,1 ml

- | | |
|------------|------------|
| TEMED | : 0,004 ml |
| Distile su | : 2,3 ml |
- %5'lik toplayıcı jel (5ml):

%30 Akrilamid / bisakrilamid	: 0,83 ml
1M Tris (pH 6,8)	: 0,63 ml
%10 SDS	: 0,05 ml
%10 amonyum persülfat (APS)	: 0,05 ml
TEMED	: 0,005 ml
Distile su	: 3,4 ml

3.1.4. Western Blot

- Mini Protean II elektroforez seti (Bio-Rad)
- *LDS 4X Sample Buffer* (Invitrogen)
- *NuPAGE 10X Sample Reducing Agent* (Invitrogen)
- *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (10,000-260,000 Da)* (Sigma)
- Yürütme tamponu (pH 8,3):

Trizma baz	: 3,02 g
Glisin	: 14,4 g
SDS	: 1 g
Distile su	: 1 L
- Yarı kuru elektroforetik transfer cihazı (Bio-Rad)
- Polivinilidin Florür (PVDF) membran
- *Whatmann* filtre kâğıdı
- Yarı kuru transfer tamponu (pH 8,3):

Trizma baz	: 3,03 g
Glisin	: 14,4 g
Metanol	: 200 ml
Distile su	: 1L
- *Ponceau S* çözeltisi:

% 0,1 Ponceau S (Sigma)	
-------------------------	--

% 5 Glasiyal asetik asit

- *Coomassie Blue* çözeltisi:

%0,025 *Coomassie Brilliant Blue R-250*

%40 Metanol

%7 Glasiyal asetik asit

- Yıkama tamponu (1xTBS-T) (pH 7,4):

20mM Trizma baz : 2,42 g

NaCl : 8 g

%0,05 Tween-20 : 0.5 ml

Distile su : 1 L

- Bloklama tamponu:

Yağsız süt tozu : 1 g

%0,05 TBS-T : 10 ml

- Primer antikorlar:

Fare monoklonal Anti-Mfn1 (Abcam, ab57602) (1:1000)

Fare monoklonal Anti-Mfn2 (Abcam, ab56889) (1:1500)

Fare monoklonal Anti-OPA1 (BD Biosciences, 612606) (1:1000)

Fare monoklonal Anti-DLP1 (BD Biosciences, 611112) (1:500)

Fare monoklonal Anti-TTC11 (Fis1) (Novus Biologicals, H00051024-M01) (1:1000)

Fare monoklonal Anti-Mff (Santa Cruz Biotechnology, sc-398617) (1:500)

Tavşan poliklonal Anti-Desmin (Sigma, D8281) (1:200)

Tavşan poliklonal HRP-konjuge anti- β -aktin (Cell Signaling Technology, 7074) (1:1000)

- Sekonder antikorlar:

Keçi Anti-Tavşan IgG (H+L) HRP konjuge (Invitrogen, 65-6120) (1:1000)

Keçi Anti-Fare IgG (H+L) HRP konjuge (Sigma, A2304) (1:5000)

- *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific)

- GeneGnome5 kemilüminesans görüntüleme cihazı (Syngene)

3.1.5. İmmünfloresan Boyama

- 1x Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS), pH 7,4 (Sigma)
- %4 Paraformaldehit / 1xPBS (a/h), pH 7,2-7,4 (Sigma)
- Triton X-100 (Sigma)
- Tween 20 (Sigma)
- Dana Serum Albümini (BSA), 0,1 g/ml (Sigma)
- Keçi Serumu
- *Prolong Gold Antifade* Kaplama Solüsyonu- DAPI'li (Molecular Probes, P36935)
- Permeabilizasyon solüsyonu: %0,2 TritonX-100 / 1xPBS (h/h)
- Bloklama solüsyonu:

%0,1 Tween20 / 1xPBS (h/h)	: 0,4 ml
Keçi serumu	: 0,05 ml
BSA (0,1 g/ml)	: 0,05 ml
- Antikor sulandırım solüsyonu:

Keçi serumu	: 0,05 ml
%0,1 Tween20 / 1xPBS (h/h)	: 0,45 ml
- Primer Antikorlar
 - Fare monoklonal Anti-Mfn1 (Abcam, ab57602) (1:100)
 - Fare monoklonal Anti-Mfn2 (Abcam, ab56889) (1:100)
 - Fare monoklonal Anti-OPA1 (BD Biosciences, 612606) (1:100)
 - Fare monoklonal Anti-DLP1 (BD Biosciences, 611112) (1:100)
 - Fare monoklonal Anti- TTC11 (Fis1) (Novus Biologicals, clone #1G9, H00051024-M01) (1:100)
 - Fare monoklonal Anti-Mff (Santa Cruz Biotechnology, clone #B-2, sc-398617) (1:100)
 - Fare monoklonal Anti-Desmin (Enogene) (1:100)
 - Tavşan poliklonal Anti-Tom20 (Santa Cruz Biotechnology, clone #FL-145, sc-11415) (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)

- *Pappen* (Abcam)
- Leica DMI 4000 with Andor DSD2 Spinning Disk Attachment konfokal mikroskobu
- Carl-Zeiss Axioplan 2 floresan mikroskobu
- Leica DMIL *inverted* mikroskop
- Nikon Eclipse E400 floresan mikroskobu

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

Kontrol ve Megakoniyal KMD Hastasına Ait Dondurulmuş Primer Miyoblast Hücrelerinin Kültür Ortamında Açılması ve Pasajlanması

Tez çalışması kapsamında yapılan primer hücre kültürü çalışmalarında, *CHKB* geninde homozigot olarak (NM_005198.3) c.722A>G (p.Asn241Ser) mutasyonunu taşıyan Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücreleri (EuroBioBank) ve kas dokusunda herhangi bir patolojik bulgu saptanmamış kontrol bireye ait miyoblast hücreleri (EuroBioBank) kullanılmıştır (Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması imzalanmıştır). Tez kapsamında yapılacak tüm çalışmalar için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınmıştır (Tarih: 24.06.2015, Karar no: GO 15/421-31). (Bkz. EK 1).

- Erken pasajdaki primer miyoblast hücreleri (pasaj no:2-5); fetal dana serumu, fetuin, deksametazon, insülin, epidermal büyüme faktörü ve temel fibroblast büyüme faktörü içeren ve hücrelerin proliferasyonunu sağlayan hücre kültür ortamı içinde %70 yoğunluğa ulaşana kadar, %5 oranında CO₂ içeren, 37°C'deki etüvde inkübe edildi.
- Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında hücre kültür ortamı çekilerek 1xPBS ile yıkandı.
- Trypsin/EDTA solüsyonu ile 37°C'de 3 dk inkübe edilerek hücreler kaldırıldı.

- Tripsin/EDTA solüsyonunun 4 katı hacimde serum içeren hücre kültür ortamı eklendi ve pipetaj yapılarak tripsin inaktive edildi.
- Hücreler falkon tüpe aktarıldı ve oda sıcaklığında 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Pelet üzerine hücre proliferasyonunu sağlayan hücre kültür ortamı eklendi ve pipetaj yapılarak hücreler pasajlandı.
- Pasaj sonrası artan hücreler 1×10^6 hücre/ml dondurma ortamı (%90 fetal dana serumu, %10 DMSO) olacak şekilde dondurularak ileri çalışmalar için sıvı azot tanklarında saklanmıştır.

Primer Miyoblast Hücrelerinin Farklılaştırılması

- Pasajlanan hücreler %90 yoğunluğa gelince, hücre kültür ortamı çekilerek 1xPBS ile yıkandı.
- Hücreler üzerine, miyoblastların füzyona girerek çok çekirdekli miyotüpleri oluşturması için gerekli olan ve farklılaşmayı sağlayan hücre kültür ortamı (%1 L-glutamin ve 2 mM Pen/Strep içeren) eklendi.
- Hücre kültür ortamı iki günde bir değiştirilecek şekilde hücreler farklılaştırıldı.
- Farklılaşma öncesi ve farklılaşmanın 1., 3., 5., 7., 9., 11., 13. günlerinde hücre kültür kaplarında alan taraması yapılarak o kuyucuğu en iyi yansıtacak şekilde her zaman dilimi için *inverted* mikroskopta (Leica DMIL) üçer fotoğraf çekildi.

3.2.2. Western Blot Analizi

Kontrol ve Megakoniyal KMD hastasına ait farklılaşmış hücrelerde, mitokondriyal fisyon (Drp1, Mff, Fis1) ve füzyonda (Mfn1, Mfn2, OPA1) görevli temel proteinleri tanıyan uygun antikorlar ile Western Blot ile analizi yapıldı.

Hücre Kültüründen Protein İzolasyonu

- Farklılaşmanın 13. gününde hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı.

- Tripsinize edilmiş hücrelere hücre kültür ortamı eklenerek tripsin inaktive edildi.
- Hücreler falkon tüpe aktarıldı ve oda sıcaklığında 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Pelet 150 µl proteaz inhibitörü içeren protein izolasyon tamponu ile toplanarak 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı.
- Örnekler buz üzerine alınıp sonikatör cihazı ile %50 amplitütte, 20 sn'lik sinyaller 9 defa verilerek parçalandı.
- Oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant toplanarak -20°C'de saklandı.

Protein Miktar Tayini

İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları *BCA Protein Assay Kit* (Pierce) kullanılarak ölçüldü.

- %1 SDS kullanılarak kör çözelti hazırlandı.
- 2 mg/ml derişimindeki albümin standartları %1 SDS ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

BCA protein *assay* için standart örneklerin sulandırım oranları:

	Kör çözelti	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1,2mg/ml
BSA(2 mg/ml)	-	2,5 µl	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl
% 1 SDS	50 µl	47,5 µl	45 µl	40 µl	30 µl	20 µl

- İzole edilen protein örnekleri %1 SDS ile 10 kat seyreltildi.
- 1:50 oranında B ve A çözeltileri kullanılarak çalışma çözeltisi hazırlandı.
- Standart çözeltiler ve seyreltilen protein örnekleri üzerine 1'er ml çalışma çözeltisi eklendi.
- 37°C'de 30 dk inkübe edildi.

- Standart çözeltilerin NanoDrop ND-1000 cihazında 562nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri ile standart eğri çizildi.
- Protein örneklerinin absorbansları üçer kez ölçülerek standart eğri yardımı ile miktarları tayin edildi.
- Elde edilen değerler sulandırma faktörü olan 10 ile çarpılarak proteinlerin asıl konsantrasyon değerleri hesaplandı.

SDS-PAGE

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrışmalarını sağlamak için SDS-PAGE kullanıldı. Bu amaçla *resolving* (ayırıcı) ve *stacking* (toplayıcı) olacak şekilde iki katmanlı jel sistemi hazırlandı.

- Poliakrilamid jelin aralarına döküleceği camlar %70'lik etanol ile iyice temizlendi.
- Dikey jel sisteminin (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* BIO-RAD) iki camı arasına 0,75 mm kalınlığında *spacerlar* yerleştirilerek camlar jel dökme aparatına yerleştirildi.
- İlk olarak pipet yardımıyla %12 oranında akrilamid içeren ayırıcı jel döküldü. Bu işlem sırasında toplayıcı jelin dökülmesi için 3 cm boşluk bırakıldı ve jelin düz olması için üzerine izopropil alkol eklendi.
- Jel polimerleşince izopropil alkol döküldü ve jel distile su ile yıkandı.
- %5'lik toplayıcı jel hazırlanarak ayırıcı jelin üzerine camların sonuna kadar döküldü ve hemen 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi.
- Jel polimerleştikten sonra camlar ile birlikte aparattan çıkarılarak 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 tüplerinin içlerine 30 µg protein, 2 µl *10x sample reducing agent* ve 5 µl *4x sample buffer*'a toplam hacim 20 µl olacak

şekilde su eklenerek örnekler yükleme için hazırlandı. Tüpler kaynayan suyun içinde 5dk bekletildikten sonra jele yüklendi.

- Önce örnekler toplayıcı jelden ayırıcı jele geçinceye kadar 80V'ta 1 saat elektroforez uygulandı. Ardından protein ağırlık belirleyicisi takip edilerek 100V'ta yaklaşık 1,5 saat yürütmeye devam edildi.
- Jel tanktan çıkarıldı ve toplayıcı jel kesilerek atıldı.

Western Blot

SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılan proteinlerin nitroselüloz membrana transferi gerçekleştirildikten sonra membrana uygun primer ve sekonder antikor uygulanıp 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 15dk boyunca yarı kuru transfer tamponunda bekletildi.
- Yarı kuru transfer cihazına sırasıyla 5 adet *whatmann* kâğıdı, nitroselüloz 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 nitroselüloz membrana transfer edildiği anlaşıldı.
- Protein örneklerinin eşit miktarda yüklendiğinin kontrol edilebilmesi için PVDF membran *Ponceau S.* solüsyonu ile boyandı ve tüm kuyucuklarda yüklemenin eşit olduğu gözlemlendi.

- Primer antikorun özgül olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla, distile su ile temizlenen membran çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklama çözeltisi (1xTBS-T içinde %10'luk süt tozu) ile inkübe edildi.
- Bloklamanın ardından membran gece boyunca +4°C'de 1xTBS-T içinde %5'lik süt tozu çözeltisi ile hazırlanmış primer antikor solüsyonu ile inkübe edildi.
- Primer antikor uygulaması sonrası, membran çalkalayıcı üzerinde 4 defa 10 dk boyunca 1xTBS-T ile yıkanarak bağlanmayan antikor uzaklaştırıldı.
- Bunu takiben membran oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat boyunca 1xTBS-T içinde %10'luk süt tozu çözeltisi ile hazırlanmış sekonder antikor solüsyonu ile inkübe edildi.
- Membran çalkalayıcı üzerinde 6 defa 10 dk boyunca 1xTBS-T ile yıkandı.
- 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* kemilüminesans görüntüleme cihazı kullanılarak uygun poz süreleri ile membranın fotoğrafları çekildi.

3.2.3. Primer Hücrelerde İmmünfloresan Boyama

- 6 kuyucuklu hücre kültürü kapları içerisine yerleştirilen 15 mm çapında 0,17 mm kalınlığa sahip steril yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılan kontrol ve hasta bireyin primer miyoblast hücreleri miyotüplere farklılaştırıldı ve farklılaşmanın 13. gününde kuyucuklardan kültür ortamı çekildi.
- Hücreler 2 kez 5 dk 1xPBS ile yıkandıktan sonra 15 dk oda sıcaklığında %4 PFA solüsyonu içerisinde bekletilerek fikse edildi.
- Fiksasyon sonrası hücreler 3 kez 5 dk 1xPBS ile yıkanarak PFA uzaklaştırıldı.
- Hücreler oda sıcaklığında, 1xPBS içerisinde hazırlanmış %0,2 Triton X-100 permeabilizasyon çözeltisinde bekletildi.

- Permeabilizasyon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra, 3 kez 5 dk 1xPBS ile yıkama yapıldı.
- Hücreler %0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 BSA (0,1 g/ml) ve %10 keçi serumundan oluşan bloklama çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Primer antikorlar sulandırım çözeltisi (%0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 keçi serumu) içerisinde uygun oranda sulandırıldı ve gece boyunca +4 °C'de hücreler üzerinde bekletildi.
- Lameller pens yardımıyla 20 kez 1xPBS çözeltisine batırılıp çıkarılarak yıkama yapıldı.
- Sekonder antikor, sulandırım çözeltisi (%0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 keçi serumu) içerisinde uygun oranda sulandırılıp 1 saat süre ile oda sıcaklığında hücreler üzerinde bekletildi. Bu ve bundan sonraki aşamalar preparatların ışık görmeyeceği şekilde gerçekleştirildi.
- Lameller pens yardımıyla 20 kez 1xPBS çözeltisine batırılıp çıkarılarak yıkama yapıldı.
- Lam üzerine DAPI içeren *Prolong Gold Antifade* çözeltisi damlatılarak lamel kapatıldı ve preparatlar ışık görmeyecek şekilde bir gece oda sıcaklığında, daha sonra +4°C'de saklandı.
- Negatif kontrol olarak hücreler primer antikor yerine yalnızca antikor sulandırım çözeltisi (%0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 keçi serumu) içerisinde inkübe edilip ardından sekonder antikor ile inkübe edildi.
- Preparatlar floresan mikroskopta uygun filtreler kullanılarak görüntülendi.

3.2.4. Doku Kesitlerinde İmmünfloresan Boyama

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD., Pediatrik Patoloji Ünitesi'nde rutin tanı amaçlı alınmış olan ve arşiv materyali olarak saklanan, kontrol ve hasta bireye (*CHKB* geninin 8. ekzonunda homozigot olarak (NM_005198.4) c.922C>T (p.Gln308X) anlamsız mutasyonu taşıyan) ait iskelet kas biyopsi dokularından lam üzerine alınan 7 µm'lik kesitler kullanılmıştır.

- Kesitler 30 dk oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, dokuların etrafı *Pappen* ile işaretlendi.

- Dokular 10 dk %4'lük PFA çözeltisinde bekletilerek fiksasyon yapıldı.
- Fiksasyon sonrası dokular 2 kez 10 dk 1xPBS ile yıkanarak PFA'nın uzaklaştırılması sağlandı.
- Dokular 15 dk oda sıcaklığında, 1xPBS içerisinde hazırlanmış %0,2 Triton X-100 permeabilizasyon çözeltisinde bekletildi.
- 3 kez 5 dk 1xPBS ile yıkama yapılarak permeabilizasyon çözeltisi uzaklaştırıldı.
- Preparatlar %0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 BSA (0,1 g/ml) ve %10 keçi serumundan oluşan blokama çözeltisi ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Primer antikorlar sulandırım çözeltisi (%0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 keçi serumu) içerisinde uygun oranda sulandırıldı ve gece boyunca +4°C'de preparatlar üzerinde bekletildi.
- 3 kez 10 dk 1xPBS ile yıkama yapıldı.
- Sekonder antikor, sulandırım çözeltisi (%0,1 Tween20 içinde hazırlanmış %10 keçi serumu) içerisinde uygun oranda sulandırılıp 1 saat süre ile oda sıcaklığında kesitler üzerinde bekletildi.
- 3 kez 10 dk 1xPBS ile yıkama yapıldı.
- Kesitlerin üzerine DAPI içeren *Prolong Gold Antifade* çözeltisi damlatılarak lamel kapatıldı ve ışık görmeyecek şekilde bir gece oda sıcaklığında kurutuldu.
- Preparatlar floresan mikroskopta uygun filtreler kullanılarak görüntülendi.

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

İmmüno floresan boyama sonrası preparatlar, Carl- Zeiss Axioplan 2 floresan mikroskobu ve *Leica DMI 4000 with Andor DSD2 Spinning Disk Attachment* konfokal mikroskobunda görüntülendi ve boyama sonuçları kontrol hücre ve dokularla karşılaştırmalı olarak ImageJ (*Bio-Formats Plugin*) ile analiz edildi. Western Blot sonucu elde edilen protein bantlarının yoğunluğu ImageJ programında bulunan 'Jel Analizi' işlevi kullanılarak kantite edildi. Yükleme kontrolü olarak *housekeeping* gen olan aktin kullanılırken, ilgili proteinlerin ifade miktarları desmin proteinine oranlanarak, sadece kas hücrelerindeki protein ifade seviyeleri değerlendirildi. Sonuçlar *Student's t-test* yardımıyla istatistiksel olarak değerlendirildi.

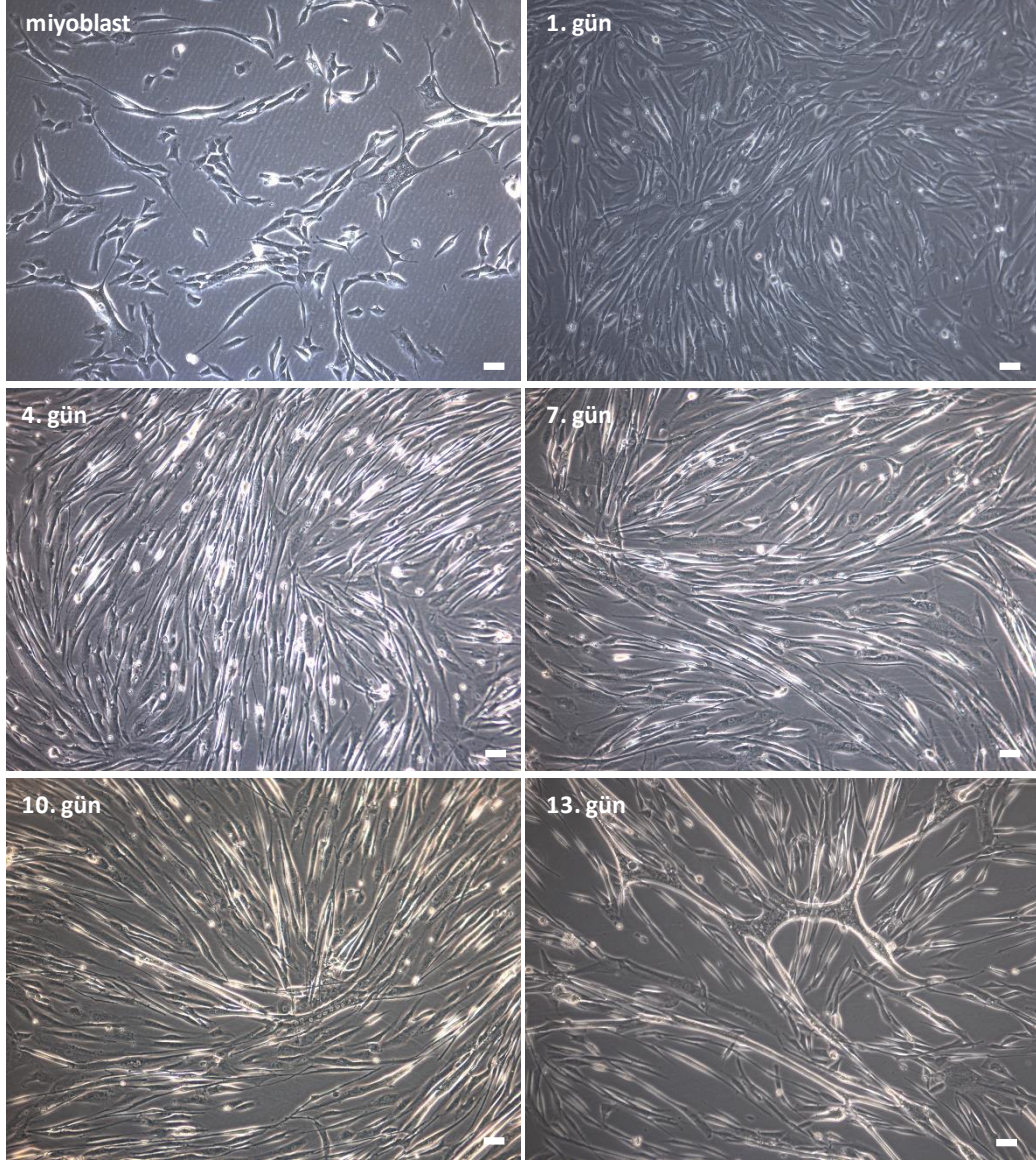
4. BULGULAR

Tez çalışması kapsamında; mitokondri işlev-morfoloji bozukluğuyla ilişkili nadir nöromusküler hastalıklardan olan Megakoniyal KMD'nin patogeneğinde mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarının olası rolü araştırılmıştır. Bu amaca yönelik olarak hücre kültüründe yapılan çalışmalarda biyobankadan getirilmiş olan kontrol (EuroBioBank, örnek no: 145-01) ve Megakoniyal KMD hastasına ait (EuroBioBank, örnek no: NH10-1412A) primer miyoblast hücreleri kullanılmıştır. Bu hasta, *CHKB* geninin 6. ekzonunda homozigot olarak (NM_005198.4) c.722A>G (p.Asn241Ser) yanlış anlamlı mutasyonu taşımaktadır. Bu mutasyon fonksiyonel kolin kinaz *domain*'ini (aa.47-388) etkilemekte olup, iskelet kasında azalmış PC seviyesiyle ilişkilendirilmiştir (96). Tez kapsamında hücre kültüründen elde edilen verileri doğrulamak amacıyla yapılan IF boyamalarda, kontrol ve *CHKB* geninin 8. ekzonunda homozigot olarak (NM_005198.4) c.922C>T (p.Gln308X) anlamsız mutasyonu (15) taşıyan hastanın iskelet kas biyopsi dokusundan alınan kesitler kullanılmıştır.

4.1. Primer Miyoblast Hücre Kültürü ve Miyoblastların Miyotüplere Farklılaştırılması

Primer miyoblast hücre kültürü diğer primer kültürlerden farklı olarak heterojen bir kültür olmakla birlikte, miyoblastların yaşamlarını sürdürebilmesi ve miyojenik farklılaşmanın gerçekleşebilmesi için ortamda bir miktar fibroblastların da bulunması gerekmektedir (97). Miyoblastların hücre döngüsü ortalama 24 saat iken, bu döngü fibroblast hücreleri için yaklaşık 18 saattir (98, 99). Bu nedenle, uygun kültür ortamı kullanılmadığında fibroblast hücreleri miyoblastlardan daha hızlı çoğalarak kültür ortamına kolaylıkla hâkim olmaktadır. Fibroblast kontaminasyonu en aza indirgenmiş ve miyoblastların çoğunlukta olduğu hücre kültür koşulları, miyoblastların hücre döngüsünü hızlandıran özel hücre kültür ortamı kullanımı ile mümkün olmaktadır. Megakoniyal KMD hastasına ve iskelet kasında patolojik bir bulgu saptanmamış kontrol bireye ait primer miyoblast hücreleri, bu kültür ortamında uygun yoğunluğa (%90) ulaştıktan sonra, hücre bölünmesinin durdurulup miyojenik farklılaşmanın indüklenmesi amacıyla, kültür ortamındaki serum miktarı azaltılarak hücrelerin farklılaşması ve çok çekirdekli miyotüpleri oluşturması sağlanmıştır. Farklılaşma öncesinde ve farklılaşmanın ilerleyen günlerinde, hücre

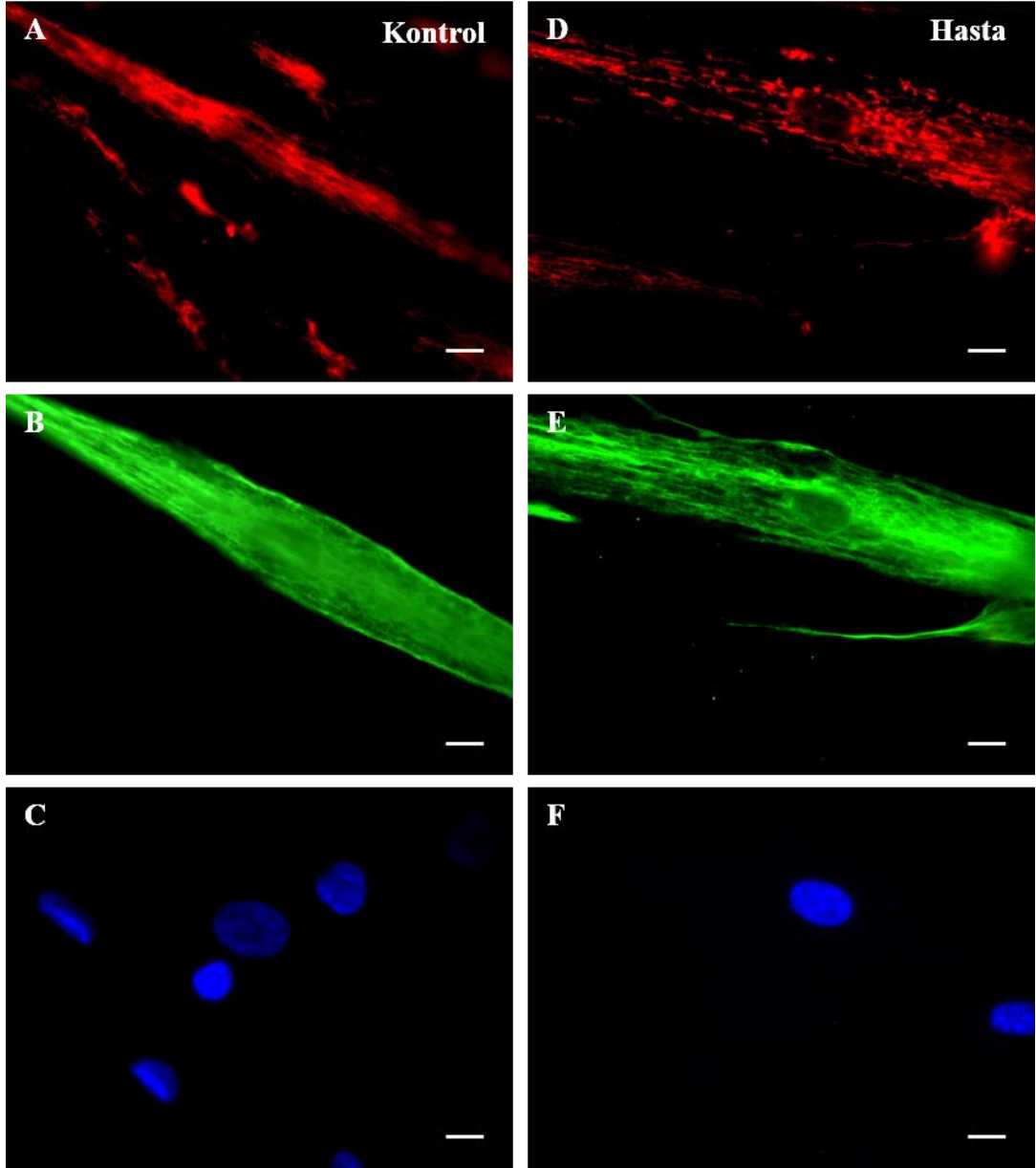
kültür kaplarında alan taraması yapılarak o kuyucuğu en iyi yansıtacak şekilde her zaman dilimi için üçer fotoğraf çekilerek (Şekil 4.1) miyojenik farklılaşma süreci incelendi. Farklılaşmanın 14. gününden itibaren hücre ölümünde artış gözlenmesi üzerine, çok çekirdekli miyotüp oluşumunun en iyi gözleendiği gün farklılaşmanın 13. günü olarak belirlendi.



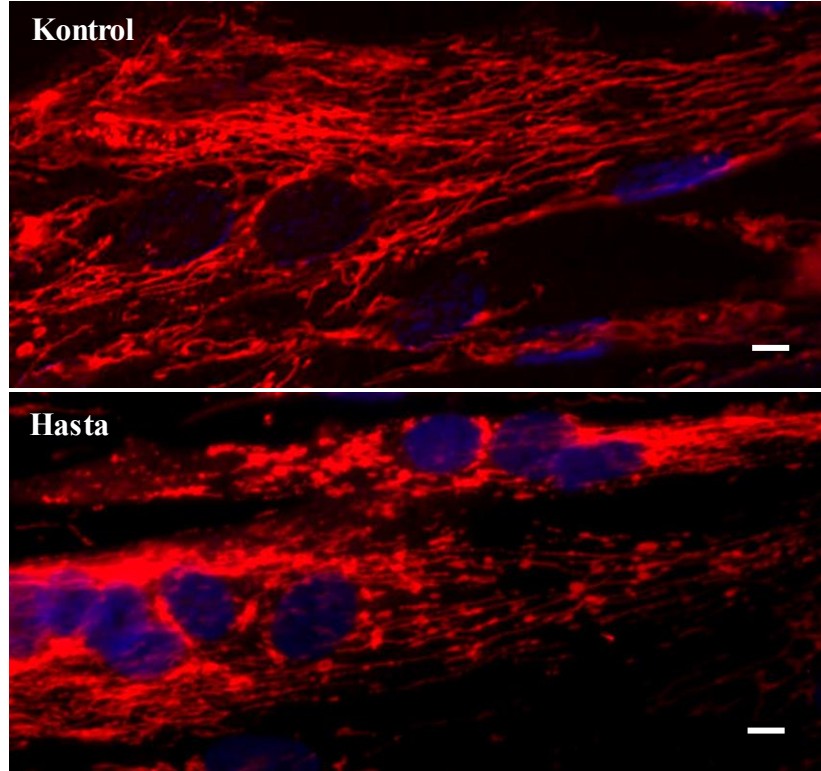
Şekil 4.1. Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücrelerinin miyojenik farklılaşma görüntüleri (Ölçek: 50µm, Mikroskop: Leica DMIL *inverted* mikroskop).

4.2. Megakoniyal KMD Hastasına Ait Primer Hücrelerde Mitokondri Ağının IF Boyama ile Analizi

Farklılaşmanın 13. günündeki hücrelerde; kas hücrelerine (miyoblast ve miyotüp) özgül miyojenik bir belirteç olan desmin ve mitokondri belirteci olan ve organel dış membranında yerleşik Tom20 translokazını tanıyan antikorlarla eş IF boyama yapılmış ve mitokondri ağ yapısı/morfolojisi Megakoniyal KMD hastası ve kontrol miyotüpleri arasında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Preparatlar hem immünfloresan mikroskopta hem de konfokal mikroskopta incelenmiştir. Kontrol miyotüplerde mitokondri ağının korunduğu ve mitokondrilerin uzun, tübüler yapıda oldukları saptanmıştır. Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde ise, mitokondri ağında bozulmalar, kopmalar olduğu ve literatürde hasta dokusunda saptanmış olan bulgulara benzer şekilde aşırı büyük ve yuvarlak (megakoniyal) mitokondriler olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3).

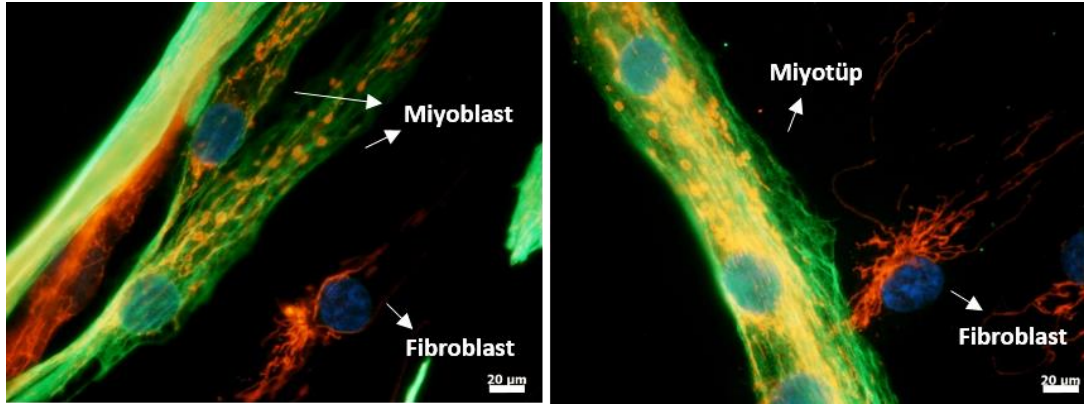


Şekil 4.2. Kontrole (A, B, C) ve Megakoniyal KMD hastasına (D, E, F) ait miyotüplerde mitokondri morfolojisinin ve ağ yapısının floresan mikroskopu görüntüleri; (A ve D) Kırmızı/Texas Red:Tom20/mitokondri; (B ve E) Yeşil/FITC: Desmin/miyotüp; (C ve F) Mavi: DAPI (Ölçek: 10 μ m, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).



Şekil 4.3. Kontrole ve Megakoniya KMD hastasına ait miyotüplerde mitokondri morfolojisinin ve ağ yapısının konfokal mikroskobu görüntüleri, Kırmızı/Texas Red:Tom20/mitokondri; Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 10 μ m, Mikroskop: Leica DMI 4000).

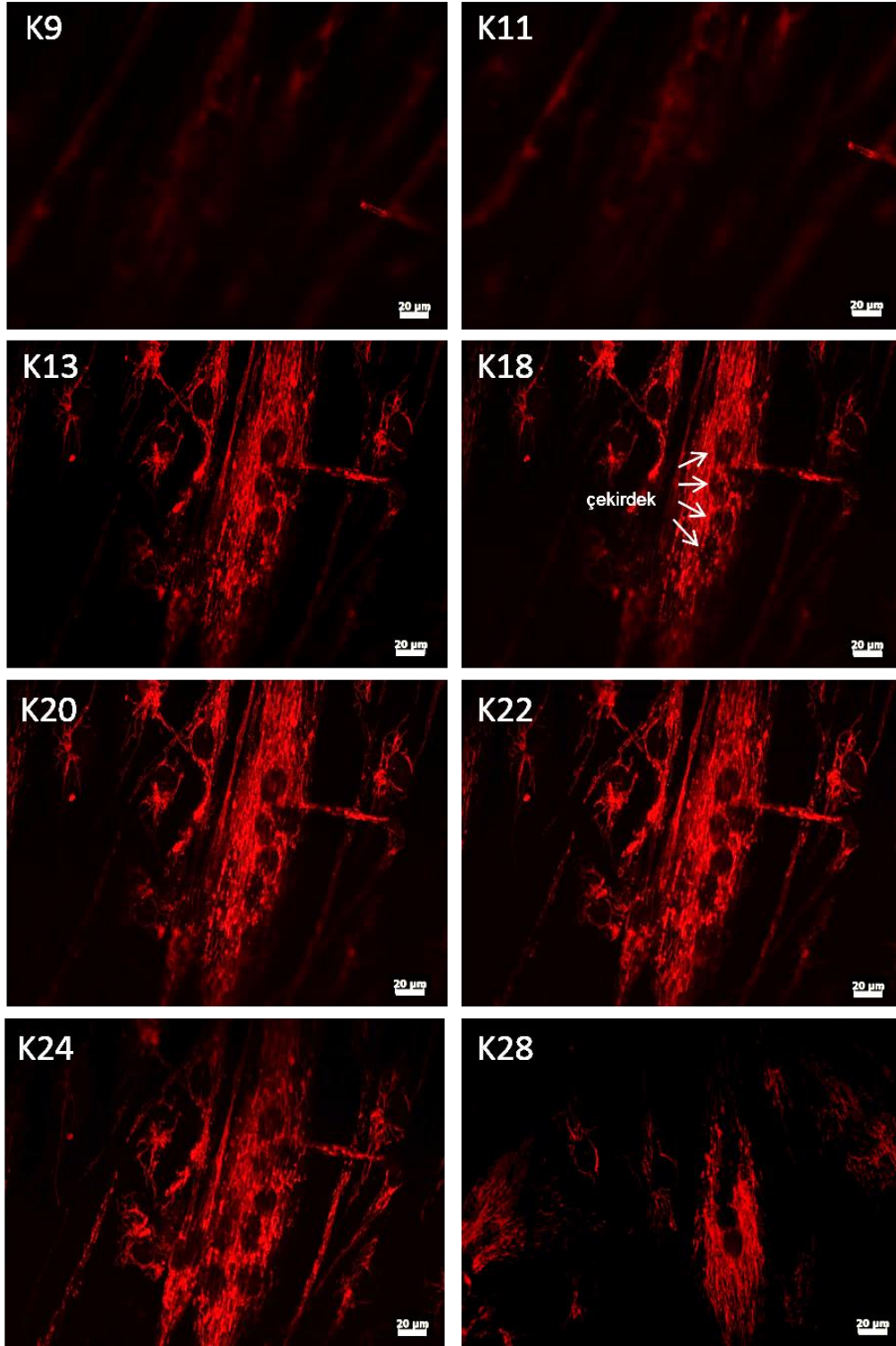
Primer miyoblast hücre kültürleri fibroblastlarla birlikte bulunan heterojen kültürler olmalarının yanı sıra, kültür ortamında miyojenik farklılaşma indüklenmiş olduğunda bile tüm hücreler senkronize olarak miyotüplere farklılaşmamakta ve hücre kültüründe bir miktar miyoblastlar da bulunabilmektedir. Bu nedenle, Megakoniya KMD miyotüplerinde gözlemlenmiş olduğumuz hasarlı mitokondri morfolojisinin ve bozulmuş ağ yapısının, kültür ortamında bulunan miyoblast ve fibroblast hücrelerinde de gözlenip gözlenmediği araştırılmıştır. Analizlerimiz sonucunda, Megakoniya KMD miyoblast ve miyotüplerinde benzer mitokondri morfolojisi bulguları olduğu gözlenirken, desmin boyaması gözlenmeyen fibroblast hücrelerindeki organel morfolojisinin ve tübüler ağ yapısının bozulmadığı saptanarak, organel dinamiğindeki hasarın kas hücresine özgü olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Megakoniyal KMD hastasına ait miyoblast, miyotüp ve fibroblast hücrelerinde mitokondri morfolojisinin ve ağ yapısının iki farklı alan görüntüsü; Yeşil/FITC: Desmin/ miyoblast-miyotüp; Kırmızı/ Texas Red: Tom20/ mitokondri ve Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 20µm, Mikroskop: Nikon Eclipse E400).

4.3. Megakoniyal KMD Hastasına Ait Primer Hücrelerde Hasarlı Mitokondri Yerleşiminin Konfokal Mikroskobu ile Analizi

Megakoniyal KMD hastalığının en önemli histopatolojik bulgusu, kas lifleri periferinde sayıca yoğunlaşmış olarak bulunan ve hücre merkezinde seyrek olarak gözlenen megakoniyal şekilli büyük mitokondrilerdir. Morfolojik bulgulara ek olarak, hücre kültüründeki hasta bireye ait miyotüplerde hasarlı mitokondrilerin yerleşimi araştırılmıştır. Bu amaçla, primer hücrelerde mitokondriye özgül Tom20 antikoruyla immünfloresan boyama yapılmış ve konfokal mikroskopta Z düzleminde optik kesitler alınarak hasarlı organelin hücre içindeki yerleşimi incelenmiştir. Analizler sonucunda, Megakoniyal KMD hastasına ait primer hücrelerde, mitokondrilerin hücrenin periferinden uzak şekilde merkez bölgesinde ve çekirdeğe yakın yerleşim gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 4.5).

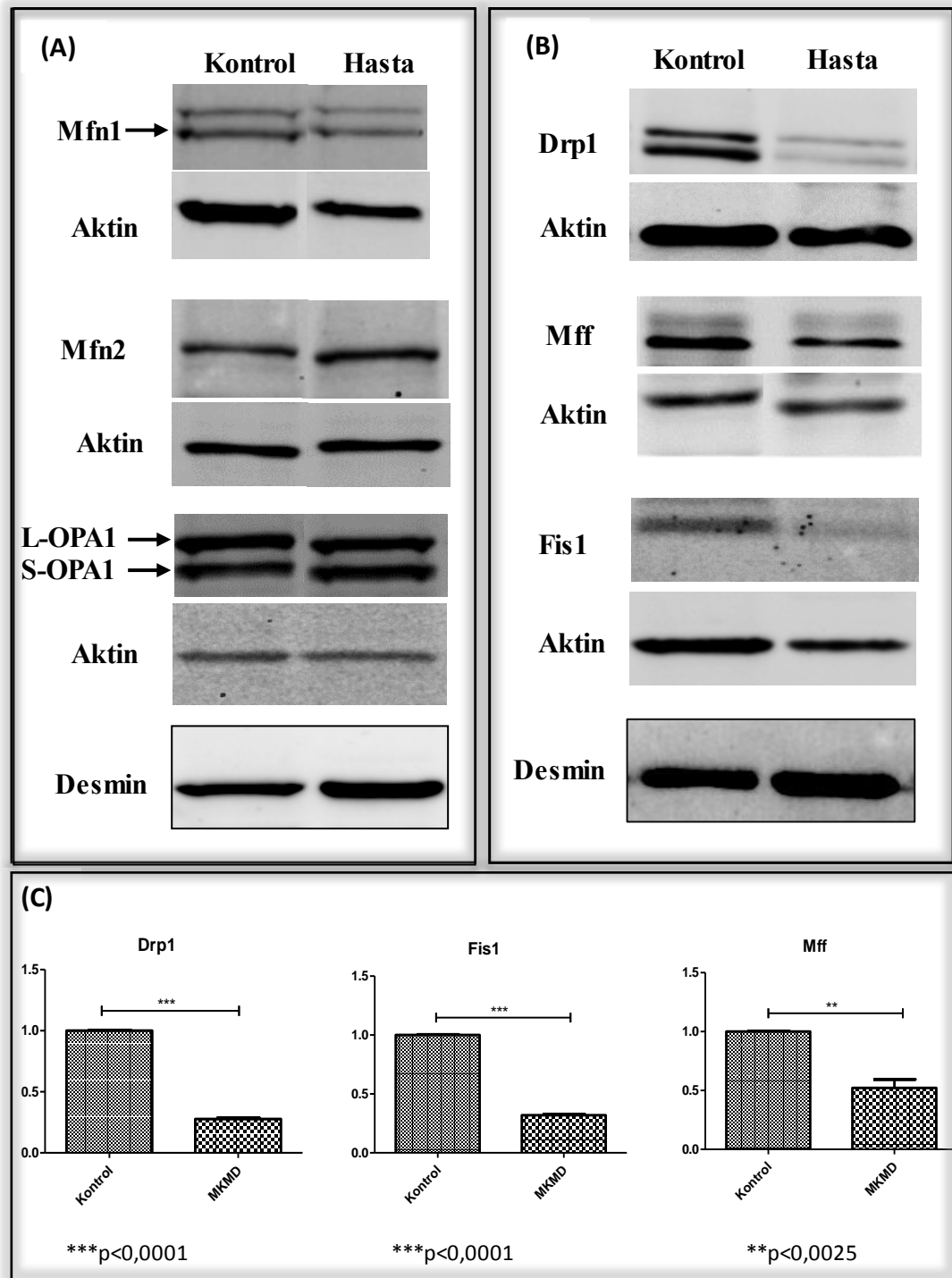


Şekil 4.5. Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde hasarlı mitokondrilerin yerleşiminin konfokal mikroskobu görüntüleri. Z düzleminde yukarıdan aşağıya 8 mikronluk optik kesitler alınmış olup şekil üzerinde optik kesit numaraları belirtilmiştir. Kırmızı/Texas Red: Tom20/mitokondri, K: Kesit numarası (Ölçek: 20µm, Mikroskop: Leica DMI 4000).

4.4. Megakoniyal KMD Hastasına Ait Primer Hücrelerinde

Mitokondriyal Füzyon/Fisyon Proteinlerinin Western Blot Analizi

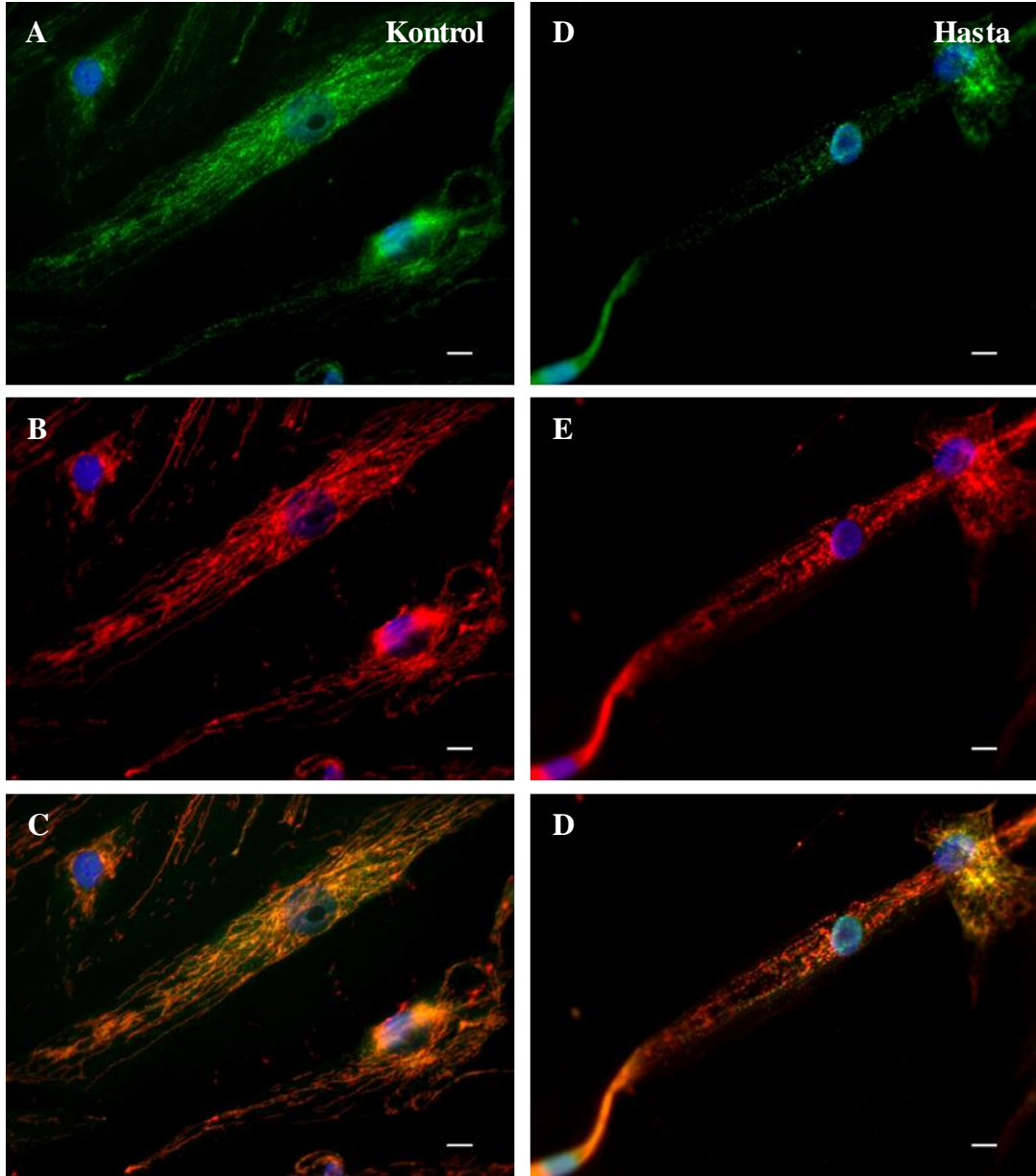
Bu sonuçlara bağlı olarak, farklılaşmanın 13. günündeki hasta ve kontrol bireylere ait primer hücrelerden protein izolasyonu yapılmış ve miyotüplerde mitokondriyal füzyon (Mfn1, Mfn2, OPA1) ve fisyon (Drp1, Mff, Fis1) görevli temel proteinlerin ifade düzeyleri karşılaştırmalı olarak Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Eşit yükleme kontrolü için aktin kullanılırken, ilgilenilen proteinlerin ifade miktarları desmin proteinine oranlanarak, sadece kas hücrelerindeki protein ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. Analizlerimiz sonucunda, mitokondriyal füzyonda görevli Mfn1, Mfn2 ve OPA1 proteinlerinin ifade seviyelerinde hasta ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, mitokondriyal fisyon görevli Drp1, Mff ve Fis1 proteinlerinin ifade seviyelerinin Megakoniyal KMD hastasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 3.6 (**p<0,0001), 2.1 (**p<0,0001) ve 3 kat (**p<0,0025) azaldığı sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.6). Aynı deney setleri en az üç defa tekrarlanmış ve analizler sonucunda birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.



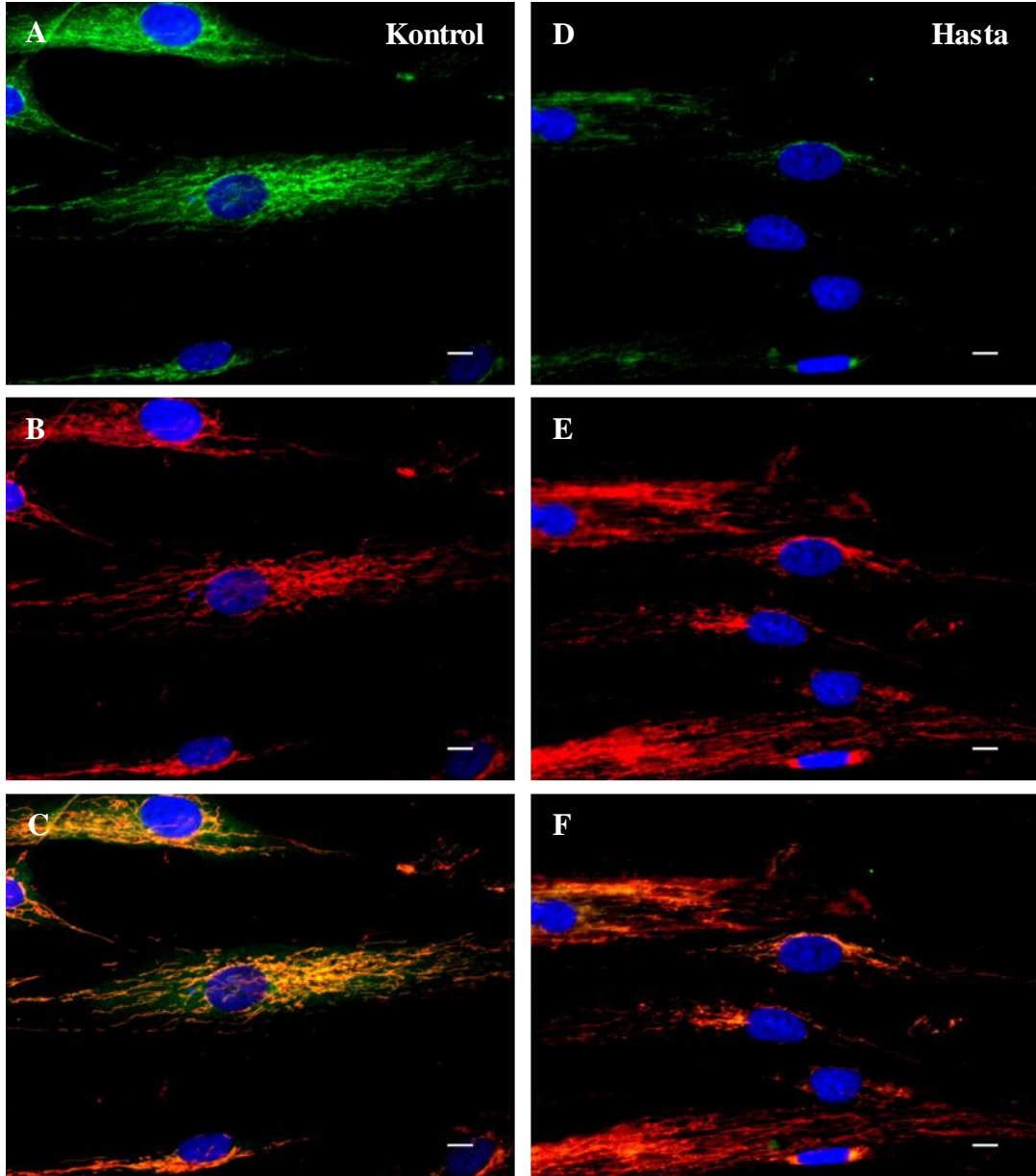
Şekil 4.6. Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde (A) mitokondriyal füzyon (Mfn1 (84kDa), Mfn2 (86kDa), OPA1 (80-100kDa)) ve (B) fisyonda (Drp1 (79-84kDa), Mff (25-38kDa), Fis1 (15kDa)) görevli temel proteinlerin Western Blot analizi. (C) Farklı deney setlerindeki hasta örneğinin ifade ortalaması, kontrol örneğindeki ifade ortalaması ile karşılaştırılmıştır. Eşit yükleme kontrolü için Aktin kullanılırken, ilgilenilen proteinlerin ifade miktarları desmin proteinine oranlanarak, sadece kas hücrelerindeki protein ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. (Grafikte belirtilen yıldız işareti *Student's t-test* sonucunda elde edilen anlamlı p değerini, hata çubuğu ise standart sapma değerlerini göstermektedir).

4.5. Megakoniyal KMD ve Kontrol Primer Hücrelerinde Mitokondriyal Fiyon Proteinlerinin IF Boyama ile Analizi

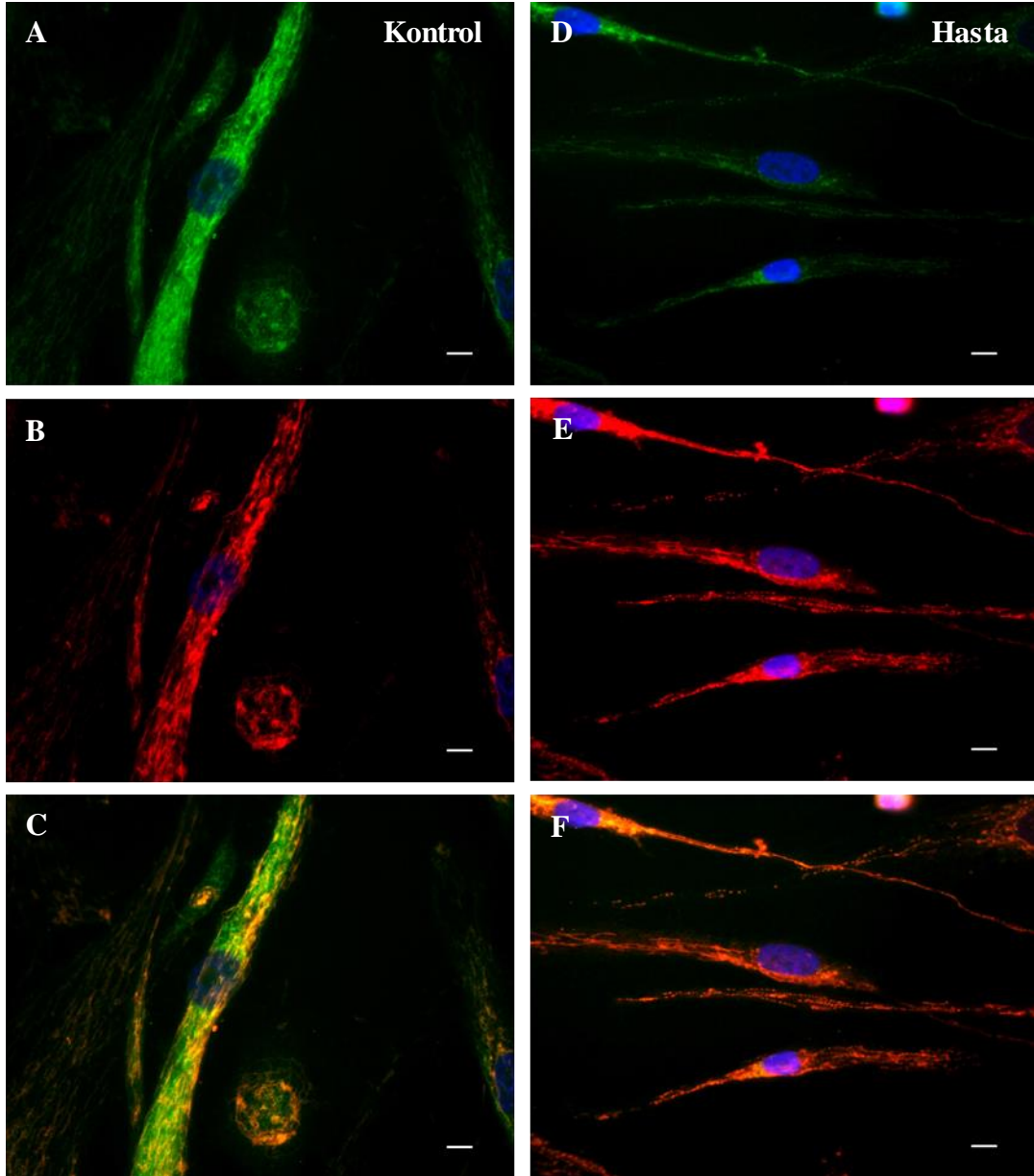
Western Blot analizi ile ifade seviyesinde azalma saptanan mitokondriyal fiyonda görevli üç proteini (Drp1, Mff, Fis1) tanıyan antikorlar ve Tom20 antikorunu ile hasta ve kontrol primer hücrelerinde eş immünfloresan boyama yapılmıştır. Floresan mikroskopta aynı pozlama süresinde çekilen fotoğraflar yardımıyla, Megakoniyal KMD hastasına ait primer hücreler kontrol hücrelerle karşılaştırılmaları olarak analiz edilmiştir. IF boyamaları sonucunda, Western Blot analizi ile uyumlu şekilde üç proteinin ifade seviyesinde de azalma gözlenmiştir. Ayrıca, Drp1, Mff ve Fis1 proteinlerinin kontrol hücrelerde çoğunlukla mitokondride olacak şekilde sitoplazmada da yerleşim gösterdikleri gözlenirken, Megakoniyal KMD hastasına ait hücrelerde her üç proteinin de sadece bozulmuş mitokondri ağının belirli bölgelerinde (çoğunlukla çekirdeğe yakın mitokondrilerde) yerleşim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.7, 4.8, 4.9).



Şekil 4. 7. Kontrole (A, B, C) ve Megakoniyal KMD hastasına (D, E, F) ait primer miyoblast hücrelerinde mitokondriyal fisyonla görevli Drp1 proteininin IF boyama görüntüsü; Yeşil/FITC (A ve D): Drp1, Kırmızı/Texas Red (B ve E): Tom20/mitokondri, (C ve F): Çakıştırılmış görüntü, Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 10 μ m, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).



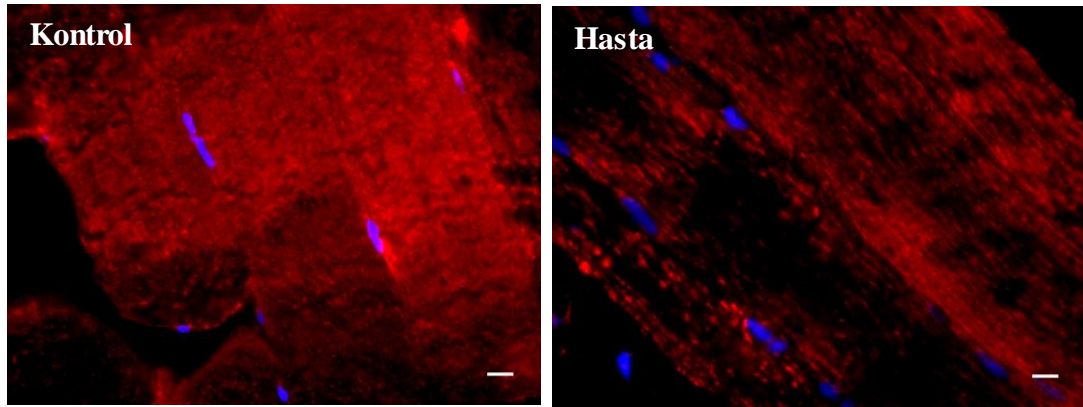
Şekil 4.8. Kontrole (A, B, C) ve Megakoniyal KMD hastasına (D, E, F) ait primer miyoblast hücrelerinde mitokondriyal fisyonda görevli Fis1 proteininin IF boyama görüntüsü; Yeşil/FITC (A ve D): Fis1, Kırmızı/Texas Red (B ve E): Tom20/mitokondri, (C ve F): Çakıştırılmış görüntü, Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 10µm, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).



Şekil 4.9. Kontrole (A, B, C) ve Megakoniyal KMD hastasına (D, E, F) ait primer miyoblast hücrelerinde mitokondriyal fisyonla görevli Mff proteininin IF boyama görüntüsü; Yeşil/FITC (A ve D): Mff, Kırmızı/Texas Red (B ve E): Tom20/mitokondri, (C ve F): Çakıştırılmış görüntü, Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 10µm, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).

4.6. Megakoniyal KMD ve Kontrol İskelet Kas Dokusunda Mitokondri Ağının IF Boyama ile Analizi

Megakoniyal KMD hastası ve herhangi bir patolojik bulgu saptanmamış olan kontrol bireye ait iskelet kası biyopsi örneklerinden alınan boyuna kesitlerde, mitokondri ağ yapısı Tom20 proteinini tanıyan antikor yardımıyla IF boyama ile analiz edilmiştir. Kontrol kesitlerde mitokondrielerin hücre kültürü bulgularımızla uyumlu olarak uzun, tübüler ve kas lifinin tamamını kaplayacak şekilde bir ağ yapısında olduğu gözlenirken, Megakoniyal KMD hastasına ait kesitlerde mitokondri ağında bozulmalar olduğu ve kas liflerinin merkezinde mitokondrielerin olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.10).

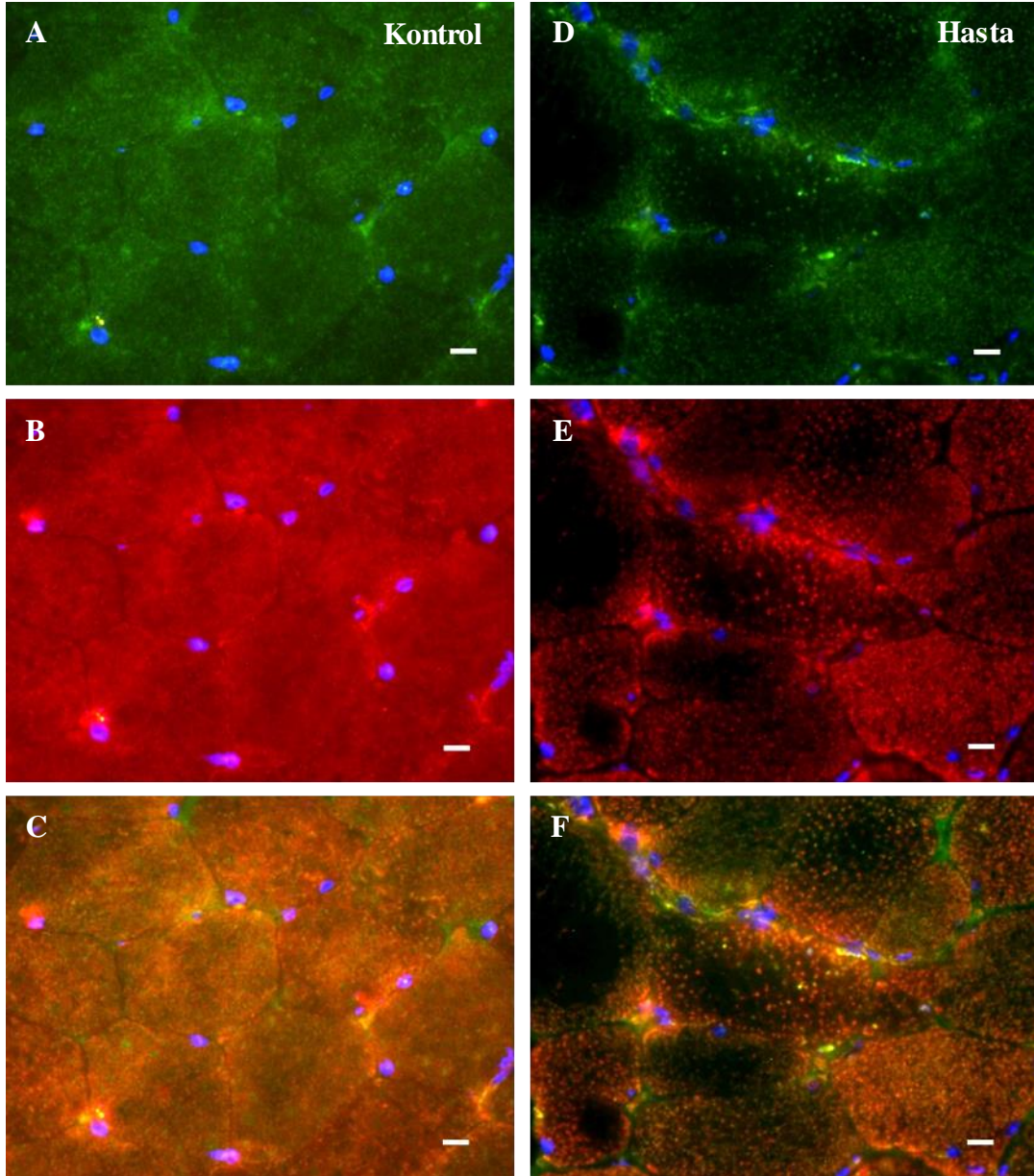


Şekil 4.10. Kontrole ve Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsi örneklerinden alınan boyuna kesitlerde mitokondri ağ yapısının floresan mikroskop görüntüsü; Kırmızı/Texas Red:Tom20/mitokondri ve Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 10µm, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).

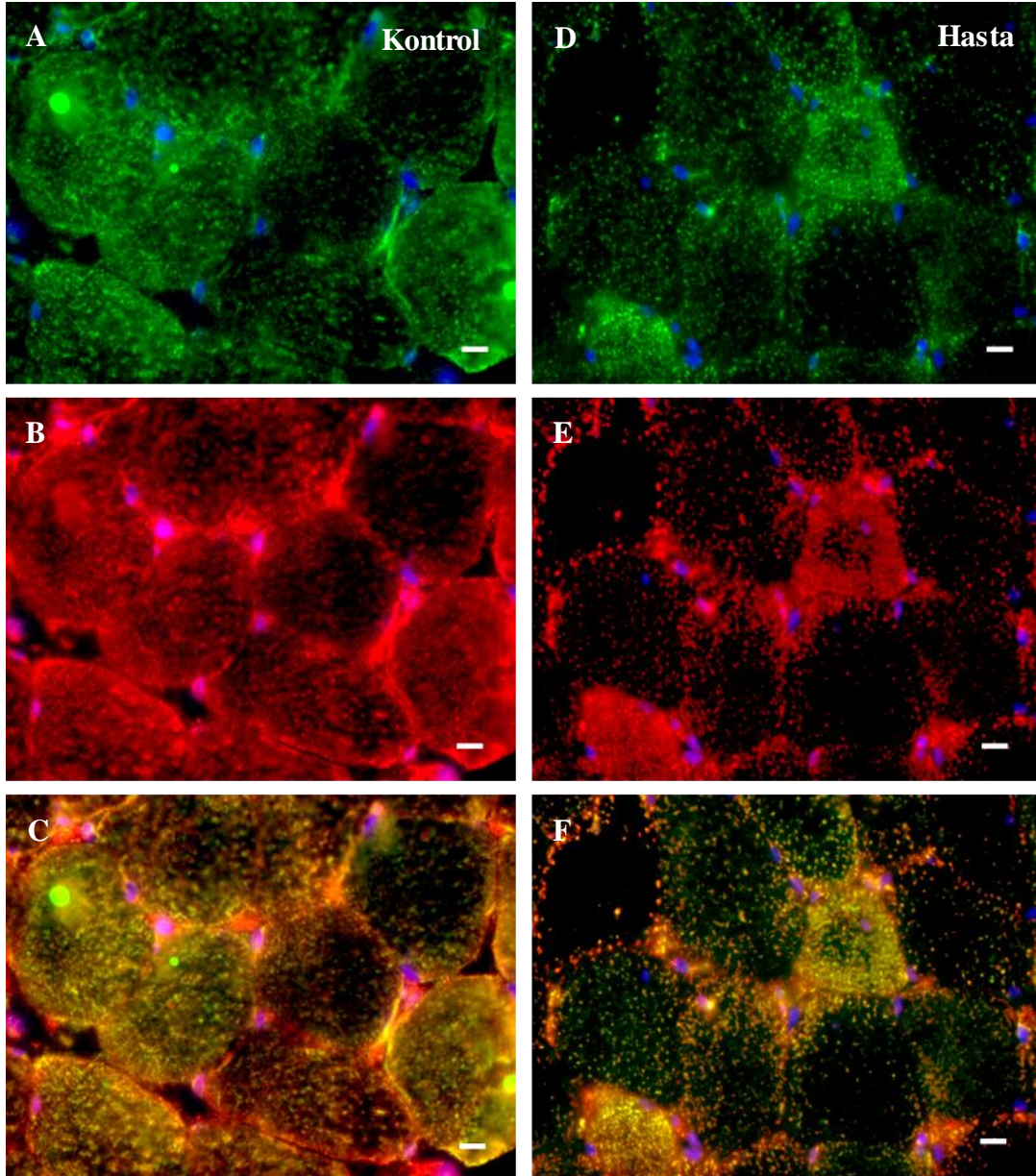
4.7. Megakoniyal KMD ve Kontrol İskelet Kas Biyopsi Örneklerinden Alınan Kesitlerde Mitokondriyal Fisyon Proteinlerinin IF Boyama ile Analizi

Megakoniyal KMD hücrelerinde kontrole oranla ifade azalışı saptanmış olan fisyon proteinlerini (Drp1, Fis1, Mff) tanıyan antikorlar ile hasta ve kontrol iskelet kas biyopsi dokularından alınan enine kesitlerde IF boyama yapılmış ve hücre kültüründe elde etmiş olduğumuz sonuçlar hasta dokuları ile doğrulanmıştır. Floresan mikroskopta aynı pozlama süresinde çekilen fotoğraflar yardımıyla, hasta ve kontrol kesitleri karşılaştırılmalı olarak analiz edilmiştir. Analizlerimiz sonucunda, kontrole ait tip 1 kas liflerinde (yavaş kasılan) fazla mitokondri bulunması nedeniyle, tip 2

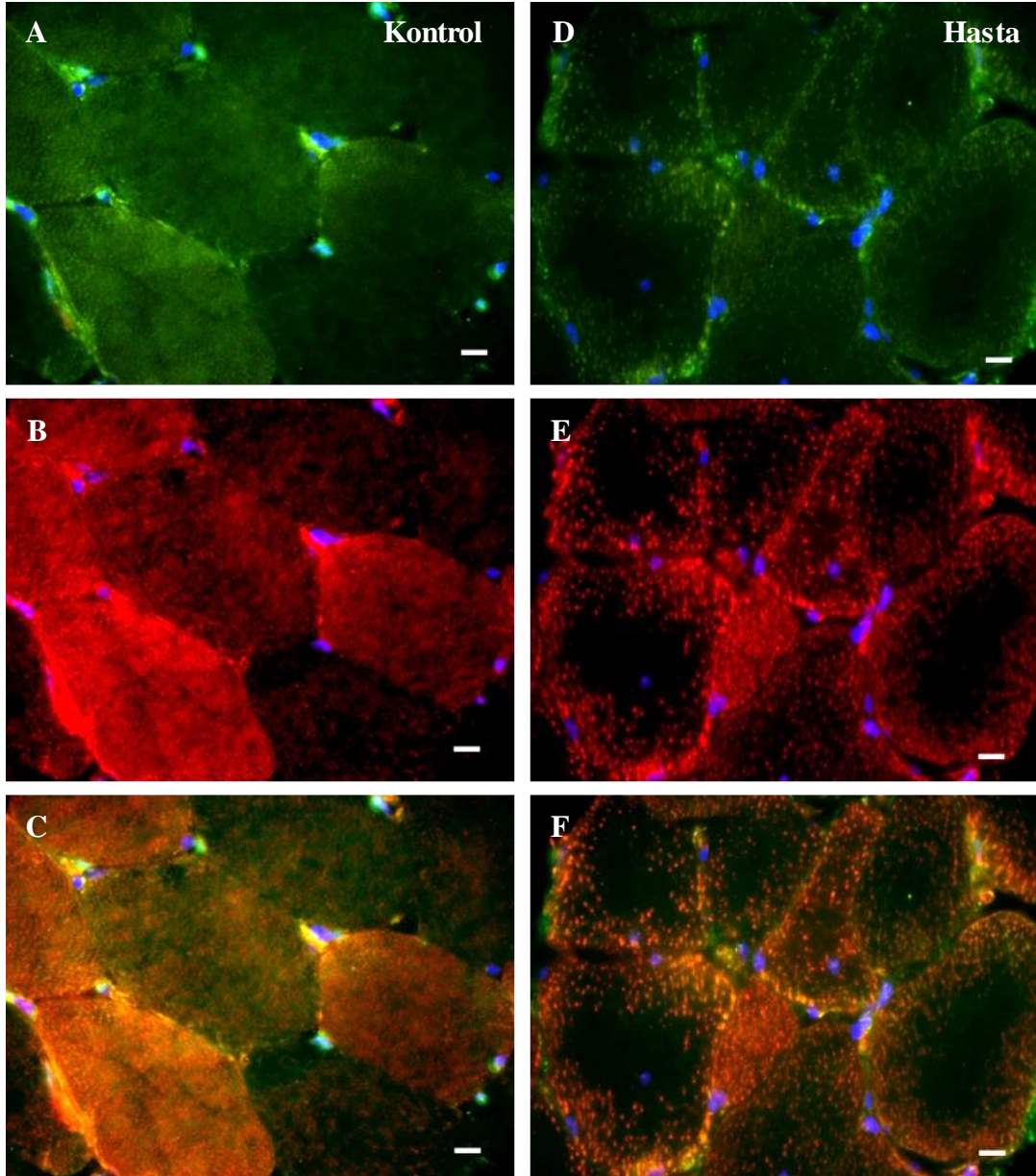
liflerine (hızlı kasılan) oranla daha yaygın mitokondri/Tom20 ve Drp1, Fis1 ve Mff boyamaları gözlenmiştir. Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsi kesitlerinde ise, mitokondrielerin hücrenin periferinde yerleşim gösterdiği ve merkezden uzaklaşarak yuvarlaklaştığı gözlenmiştir. Ayrıca, Drp1, Fis1 ve Mff boyamalarının kontrole kıyasla belirgin olarak azaldığı ve mitokondri belirteci olan Tom20'nin ifade edildiği her bölgede söz konusu üç proteinin ifadesinin gözlenmediği saptanmıştır (Şekil 4.11, 4.12, 4.13).



Şekil 4.11. Kontrole (A, B, C) ve Megakoniyal KMD hastasına (D, E, F) ait iskelet kas biyopsi örneklerinden alınan enine kesitlerde mitokondriyal fisyonunda görevli Drp1 proteininin IF boyama görüntüleri; Yeşil/FITC (A ve D): Drp1, Kırmızı/Texas Red (B ve E): Tom20/mitokondri, (C ve F): Çakıştırılmış görüntü, Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 10 μ m, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).



Şekil 4.12. Kontrole (A, B, C) ve Megakoniyal KMD hastasına (D, E, F) ait iskelet kas biyopsi örneklerinden alınan enine kesitlerde mitokondriyal fisyonda görevli Fis1 proteininin IF boyama görüntüleri; Yeşil/FITC (A ve D): Fis1, Kırmızı/Texas Red (B ve E): Tom20/mitokondri, (C ve F): Çakıştırılmış görüntü, Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 10 μ m, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).



Şekil 4.13. Kontrole (A, B, C) ve Megakoniyal KMD hastasına (D, E, F) ait iskelet kas biyopsi örneklerinden alınan enine kesitlerde mitokondriyal fisyonunda görevli Mff proteininin IF boyama görüntüleri; Yeşil/FITC (A ve D): Mff, Kırmızı/Texas Red (B ve E): Tom20/mitokondri, (C ve F): Çakıştırılmış görüntü, Mavi: DAPI çekirdek boyası (Ölçek: 10 μ m, Mikroskop: Zeiss Axioplan 2).

5. TARTIŞMA

Nöromüsküler hastalıklar, doğrudan ya da dolaylı olarak iskelet kas yapısı ve işlevinin etkilendiği çok geniş bir hastalık grubunu içermektedir. Bu gruptaki hastalıkların çoğu nadir genetik hastalıklar içerisinde yer almaktadır. Günümüze kadar tanımlanmış 780 farklı nöromüsküler hastalık tipi ve 417 hastalıktan sorumlu gen bilgisi mevcut olmakla beraber, tüm nöromüsküler hastalıkların toplu olarak insidansı 1/3000 olarak saptanmıştır (100, 101). Bu hastalıklar için ortak ve etkin bir tedavi yaklaşımı olmamasının yanı sıra, tedavi seçenekleri çoğunlukla tek gen-tek hedef yaklaşımını benimsemekte ve ortak tedavi seçeneklerinin önünü açacak klinik öncesi çalışmalar sadece belirli hastalıklardaki belirli mutasyon grupları için bulunmaktadır.

Mitokondriyal veya nükleer genomdaki mutasyonlara bağlı olarak oluşan primer mitokondriyal solunum zinciri hataları, hücredeki enerji üretimini doğrudan etkilemekte ve öncelikli olarak iskelet kası ve sinir sistemi bulguları ile karakterize olan mitokondriyal sitopatilerin patogeneğinde önemli bir role sahip olmaktadır (102). Bu hastalıklarda gözlenen mitokondri işlev ve morfoloji kaybı beklenen primer bir bulgudur. Ancak, mitokondriyal sitopatiler dışında kalan genetik ve patolojik olarak farklı birçok nöromüsküler hastalıkta da, ortak bir bulgu olarak kas dokusunun idamesi için hayati öneme sahip olan mitokondrielerde hasar gözlenmektedir. Son yıllarda, organel seviyesindeki kalite kontrolün önemli bileşenlerinden olan mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarının mitokondri işlevinin regülasyonunda önemli rolleri olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir (37). Hücre içerisinde dinamik bir mitokondri ağı oluşumunu sağlayan bu iki zıt mekanizma, nöromüsküler hastalıkların patogeneğinde gözlenen mitokondriyal hasara etki eden ortak faktörlerden biri olabilir (103).

Tez çalışması kapsamında, lipit biyosentez hatası ile karakterize ilk KMD tipi olan ve nadir hastalıklar kategorisinde yer alan Megakoniyal KMD hastalığının patogeneğinde mitokondri dinamiğinin olası işlevi araştırılmıştır.

Megakoniyal KMD, *CHKB* genindeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan ve histopatolojik bulgularında kas liflerinin orta kısmında mitokondri yokluğu, periferik bölgelerde ise az sayıda fakat çok büyük ve megakoniyal görünümlü mitokondri

yapısıyla karakterize olan KMD tipidir (15). Fare modelinde yapılan çalışmalarda, Megakoniyal KMD hastalığının patogeneğinde PC seviyesinin azalmasına bağılı olarak, mitokondriyal zar potansiyelinin azaldığı, biyoenerjetik işlev kaybı olduğu, ROS üretiminin arttığı ve bu bulgulara ek olarak mitofaji yolağının aktive olduğu gözlenmiştir (19). Mitokondriyal kalite kontrol mekanizmaları incelendiğinde, mitofajinin organel seviyesindeki son kalite kontrol mekanizması olduğu ve öncesinde mitokondri dinamiğini oluşturan füzyon ve fisyon mekanizmalarının devreye girdiğı bilinmektedir (33). Fakat günümüze kadar, Megakoniyal KMD hastalığında mitokondriyal işlev ve morfoloji kaybının mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmaları ile ilişkisini araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır. *CHKB* genindeki mutasyonlara bağılı olarak hücredeki temel PC biyosentez yolağı olan *Kennedy* yolağının işlevsiz hale gelmesi nedeniyle, alternatif PC biyosentez yolağı olan MAM'ın devreye girebileceğı ve PC sentezini telafi edebilmek için MAM'da işlev kaybı meydana gelebileceğı öne sürülmüştür (20). Mitokondri dinamiğinde görevli *Mfn2* ve *Fis1* gibi bazı temel proteinlerin MAM ile ilişkili olduğu bilinmektedir (21, 22). Bu nedenle, Megakoniyal KMD hastalığında gözlenen PC biyosentez hatasının hücrede dolaylı yoldan mitokondri dinamiğı hasarı oluşturmaları beklenen bir sonuç olarak gözlenebilir. Ayrıca, mitokondrilerde fosfolipit içeriğinin azalması veya değışmesinin lipit-protein etkileşimlerinin bozulmasına sebep olduğu bilinmektedir (104, 105). Dolayısıyla Megakoniyal KMD hastalarında *CHKB* genindeki mutasyonlara bağılı olarak mitokondri membranındaki PC seviyesinin azalması lipit-protein etkileşimlerinin bozulmasına yol açarak mitokondriyal fisyon seviyesinin azalmasına sebep olabilir.

Tez çalışması kapsamında, Megakoniyal KMD hastasına ait primer miyoblast hücreleri uygun koşullar altında miyotüplere farklılaştırılmış ve mitokondriler morfolojik açıdan kontrol ile karşılaştırıldığında dinamik ağı yapısının bozulduğu ve literatürde hastalara ait iskelet kas dokusunda saptanmış olan bulgulara benzer şekilde aşırı büyük ve megakoniyal yapıda organeller olduğu gözlenmiştir. Konfokal mikroskopu ile Z düzleminde optik kesitler alınarak hasarlı organelin hücre içindeki yerleşimi incelenmiş ve hastaya ait miyotüplerde, literatürde hasta dokusundan elde edilmiş bulgulardan farklı olarak mitokondrilerin hücrenin periferinden uzak ve hücre merkezinde yerleşim gösterdikleri saptanmıştır. Ancak ilginç bir bulgu olarak, hasta

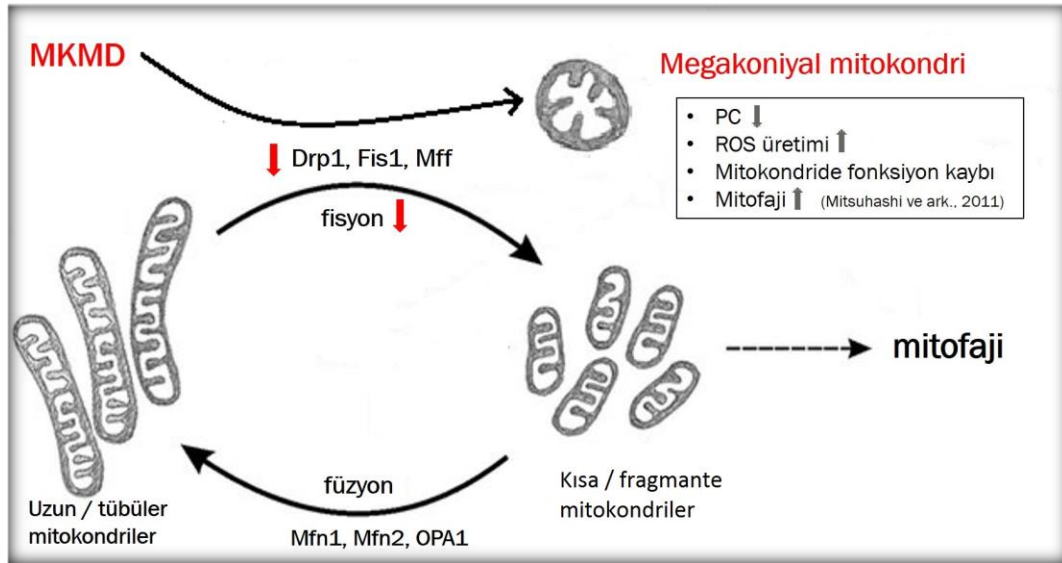
dokusundakine benzer şekilde çekirdeğe yakın yerleşim gösterdikleri gözlenmektedir. Mitsuhashi ve Nishino'nun yaptığı bir araştırmada, Megakoniyal KMD hastalarının iskelet kas biyopsi örneklerinde mitofaji bulguları olarak PINK1 ve Parkin proteinlerinin ifadelerinin arttığı saptanmıştır (106). Parkinson hastalığına yönelik yapılan bir başka çalışmada ise, PINK1 ve Parkin proteinlerinin birlikte aşırı ifadelerinin mitokondrilerin hücre içindeki yerleşimlerini değiştirdiği ve organellerin çekirdek etrafında toplandıkları gözlenmiştir (107). Bu bulgular beraber değerlendirildiğinde, mitokondrilerin hem hücre kültüründe hem de iskelet kas dokusunda çekirdeğe yakın yerleşimde bulunmaları beklenen bir bulgu olarak düşünülebilir. Bunun yanı sıra, *rmd* fare modelinde kas dokusunda saptanmış olan mitokondri hasarı ve mitofaji aktivasyonuna bağlı olarak azalmış olan mitokondri sayısının, hücredeki enerji üretimini azalttığı bilinmektedir (106). Bu nedenle, Megakoniyal KMD hasta kas dokusunda çekirdeğe yakın yerleşim gösteren mitokondrilerin, çekirdeğe enerji transferini kolaylaştırabilmek adına çekirdek ile aralarındaki mesafeyi azalttıkları düşünülebilir.

Tanımlanmış olan Megakoniyal KMD hastalarının çoğunda iktiyoz benzeri deri bulguları olduğu bilinmektedir (89). Bu nedenle, primer miyoblast hücre kültürü ortamında bulunan fibroblastlarda da mitokondriyal hasar olması beklenebilir. Ancak, iskelet kası ile ilişkili interstisyel fibroblastların deri biyopsisi yoluyla elde edilen kutanöz fibroblastlardan farklı olup olmadığı ile ilgili bir bilgi literatürde mevcut değildir. Bu tez çalışmasında, miyotüplerin aksine fibroblast hücrelerindeki organel morfolojisinin ve tübüler ağ yapısının bozulmadığı saptanmış ve organel dinamiğindeki hasarın kas hücresine özgül olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuca bağlı olarak, mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmasında görevli temel 6 proteinin ifade düzeyleri kontrol örnek ile karşılaştırmalı olarak Western Blot ile kantitatif olarak analiz edilmiş ve ilgilenilen proteinlerin ifade miktarları desmin ifadesine oranlanarak, sadece kas hücrelerindeki protein ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda, hastaya ait miyotüplerde mitokondriyal füzyonda görevli temel proteinlerin (Mfn1, Mfn2, OPA1) seviyesinde bir değişim saptanmazken, mitokondriyal fisyonda görevli temel proteinlerin (Drp1, Mff, Fis1) ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı (sırasıyla 3.6, 2.1 ve 3 kat) sonucuna ulaşılmıştır. Ek olarak, primer hücrelerde mitokondriyal fisyon proteinlerini

tanıyan antikorlar ile IF boyamalar gerçekleştirilmiş ve proteinlerinin ifade seviyelerinin Western Blot analizi ile uyumlu şekilde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, kontrol hücrelere kıyasla Megakoniyal KMD hastasına ait hücrelerde her üç proteinin de sadece bozulmuş mitokondri ağının belirli bölgelerinde ve çekirdeğe yakın mitokondrielerde yerleşim gösterdiği saptanmış olup, sitoplazmik boyama gözlenmemiştir. Drp1, Mff ve Fis1 proteinleri, nükleer DNA tarafından kodlanmakta ve sitoplazmadaki serbest ribozomlarda sentezlenerek mitokondriye aktarılmaktadır. Kontrol hücrelerde gözlenen sitoplazmik boyamanın hasta hücrelerinde olmaması da fisyon proteinlerinin sentezinin azaldığının bir göstergesidir.

Mitokondriyal füzyon ve fisyonda görevli temel araçların hem post-transkripsiyonel (alternatif *splicing*), hem de post-translasyonel (fosforilasyon, ubiquitinasyon, sumolasyon, nitrosilasyon ve proteolitik kesim) mekanizmalar ile düzenlenerek hücre içinde işlevselliği sağlanmaktadır (10, 48). Dolayısıyla, bu proteinleri kodlayan genlerin mRNA ifade seviyelerinin analiz edilmesi işlevsel protein miktarını doğru olarak yansıtmayabilir. Ayrıca, bu proteinlere yönelik olarak yapılan son çalışmalarda protein miktar analizlerinin öne çıktığı görülmektedir. Bu nedenle, mitokondri dinamiğinde görevli proteinlerin analizi protein seviyesinde Western Blot yöntemi ve IF boyamalar ile gerçekleştirilmiştir.

Megakoniyal KMD hastasının iskelet kas biyopsilerinden alınmış olan kesitlerde ifade azalışı saptanmış olan Drp1, Fis1 ve Mff proteinlerini tanıyan antikorlar ile IF boyama yapılmış ve hücre kültüründe elde edilen sonuçlar hastaya ait dokuda doğrulanmıştır. Bu sonuçlara bağlı olarak, Megakoniyal KMD hastalığının patogeneğinde iskelet kasında gözlenen mitokondriyal işlev ve morfoloji kaybı bulguları mitokondriyal fisyon azalışı ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Megakoniyal KMD hastalığının patogenezinde mitokondriyal fisyon mekanizmasının olası rolü.

Mitokondriyal fisyonunda görevli proteinler için yapılan Western Blot analizleri sonucunda, üç temel proteinin ifade seviyesi de azalmış olmakla beraber, hastaya ait örnekte en fazla azalma (3.6 kat) Drp1 proteininde saptanmıştır. Drp1, fisyon mekanizmasının gerçekleşmesi için mitokondri etrafında oligomerize olarak, boğumlanmayı ve organelin bölünmesini sağlayan temel proteindir. Lee ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada, Drp1'in RNAi aracılığıyla baskılandığı memeli hücrelerinde, Megakoniyal KMD miyotüplerinde tespit ettiğimize benzer şekilde, tübüler mitokondriler arasında aşırı büyük ve balon benzeri mitokondriler gözlenmiştir. Aynı yöntemle Fis1 ifadesi baskılandığında ise böyle bir morfolojik değişim saptanmamıştır (108). Kageyama ve arkadaşlarının fare modeli ile yaptığı çalışmada ise, seçici olarak nöronlardaki Drp1 yokluğunun, mitokondriyal fisyonun baskılanması sebebiyle organelin uzayıp şişmesine, hücresel solunum aktivitesinin bozulmasına ve artan ROS birikimiyle birlikte yaşa bağlı olarak nörodejenerasyona sebep olduğu gösterilmiştir (109). Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise sporadik Alzheimer hastalarının fibroblastlarında Drp1 ifadesinin azaldığı ve buna bağlı olarak mitokondri morfolojisinin bozulduğu tespit edilmiştir (110). Bunun yanı sıra, PINK1 mutasyonu taşıyan Parkinson hastalarının fibroblastlarının mitokondrilerinde de anormal organel morfolojisi gözlenmiş ve bu bulgular Drp1 işlevinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (111, 112). Bu çalışmalar, Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde gözlenen anormal mitokondri

morfolojisinin primer olarak azalan Drp1 ifadesiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Mitokondriyal fisyonunda, Drp1'in organel dış zarındaki reseptörü olarak görev yapan Fis1 ve Mff proteinlerinin hastadaki ifade seviyesinde de kontrole oranla sırasıyla 3 ve 2,1 kat azalma saptanmıştır. Memeli hücrelerinde Fis1 ifadesi artırıldığında, küçük ve yuvarlak mitokondriler gözlenirken, Fis1 ifadesi baskılandığında uzun ve tübüler mitokondri morfolojisi gözlenmiştir (64, 65). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, Drp1'in mitokondri dış zarına getirilmesinde Mff'nin kilit protein olduğu yönünde sonuçlara varılmıştır. Söz konusu çalışmalarda, memeli hücrelerinde Mff ve Fis1 proteinlerinin ifadeleri ayrı ayrı baskılanmış ve Fis1'in baskılandığı hücrelerde mitokondri morfolojisinde belirgin bir değişim gözlenmezken, Mff'nin baskılandığı hücrelerde Drp1'in mitokondri dış zarına getirilmesinin engellendiği ve buna bağlı olarak belirgin seviyede fisyon azalışı tespit edilmiştir (66, 113). Bu durumda, Megakoniyal KMD hastasında saptanmış olan anormal mitokondri morfolojisine, Drp1'e ek olarak Mff seviyesindeki azalışın da sekonder olarak etki edebileceği düşünülebilir.

Bunun yanı sıra, yapılan bir araştırmada azalan Fis1 ve Drp1 ifadesi artan PINK1 ifadesiyle ilişkilendirilmiştir. Yaşlanmış hücrelerde oksidatif stresten korunmak için Drp1 ve Fis1 ifadesinin azaldığı, buna bağlı olarak PINK1 ifadesinin ve PINK1 aracılı TRAP1 fosforilasyonunun arttığı şeklinde bir mekanizma öne sürülmüştür. TRAP1 fosforilasyonunun hücreyi oksidatif stresin sebep olduğu apoptozdan koruduğu ve hücrenin hayatta kalımını kolaylaştırdığı bilinmektedir (114, 115). Bu nedenle, Megakoniyal KMD hastalarında mitofajiye uğramamış mitokondrilerde Drp1 ve Fis1 ifadelerinin azalması hücreyi apoptozdan korumak için başvurulan bir yol olarak düşünülebilir.

Mitokondriyal fisyon mekanizmasına yönelik olarak yapılan yapısal analiz çalışmalarında, ortalama mitokondri çapının Drp1'in oluşturduğu spiralin çapından daha büyük olduğu gözlenmiştir. Bunun üzerine Drp1'den önce organelin başka faktörler tarafından boğumlanmaya başladığı düşünülmüş (116, 117) ve Drp1'in organel üzerinde birikip boğumlanmayı başlatmadan önce ER tübüllerinin mitokondriyi sarıp sıkılaşmaya başladığı ortaya konmuştur. Böylece, ER'nin

mitokondriyal fisyonun başlayacağı yeri belirlemede görevi olduğu tespit edilmiştir (118). Buna ek olarak, bu iki organelin yakın temas halinde bulunduğu bölge olan MAM'da fisyonu görevli Fis1 proteinin de yer alması ER ve mitokondri dinamiği arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (22). MAM ile mitokondriyal fisyonun ilişkisi net olarak bilinmese de iki organel arasındaki lipid alışverişi ile oluşturulan mikroçevrenin fisyonu tetikleyen bir faktör olabileceği öne sürülmüştür (119). Dolayısıyla, Megakoniyal KMD hastalarında saptadığımız mitokondriyal fisyon azalışında ER'nin de etkin işlevi olabileceğini düşünülebilir.

Bozulmuş mitokondri dinamiğinin, farklı hastalıkların patogeneğinde gözlenen hücresel işlev kaybına sebep olan genel bir yolak olabileceği düşünülmektedir (110). Tez çalışması sonucunda da, Megakoniyal KMD hastalığında özgül olarak kas hücrelerinde saptanmış olan mitokondriyal fisyon seviyesi azalışının, hastalığın patogeneğine etki eden faktörlerden biri olabileceği ve kas dejenerasyon yolağında rolü olabileceği yönünde ilk bulgular elde edilmiştir. Tez çalışması devamında yapılacak araştırmalarla, fisyon mekanizmasında görevli proteinlerin seviyelerindeki azalışın nedenlerinin açıklanabilmesi Megakoniyal KMD hastalığında gözlenen mitokondriyal hasar yolağının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır. Megakoniyal KMD hastalığının patomekanizmasında gözlenen mitokondriyal işlev kaybının ve yapısal değişikliklerinin nedenlerinin anlaşılması, mitokondriyal hasar ile ilişkilendirilen farklı nöromusküler ve nörodejeneratif hastalıkların patogeneğine de ışık tutma potansiyeline sahiptir. Günümüzde birçok araştırma grubu tarafından kas dejenerasyonunun görüldüğü farklı hastalıklarda genetik etmenlere özgül tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Elde etmiş olduğumuz bulgular ileri dönemde, mitokondriyal sitopatilerinin dışında tutulan patolojik ve genetik açıdan farklı iskelet kası hastalıkları için de mitokondri dinamiğine ilişkin tedavi yöntemlerine farklı bir seçenek sunulmasını sağlayacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

- Primer miyoblast hücre kültüründe çok çekirdekli miyotüp oluşumunun en iyi gözlemlendiği gün farklılaşmanın 13. günü olarak belirlendi.
- Hücre kültüründe, Megakoniyal KMD hastasına ait miyoblast ve miyotüplerde mitokondri ağında bozulmalar ve kopmalar olduğu, megakoniyal yapılı aşırı büyük ve yuvarlak organel yapısı gözlemlendi. Buna karşılık, desmin boyaması gözlenmeyen fibroblast hücrelerindeki mitokondri morfolojisinin ve tübüler ağ yapısının korunduğu saptanarak, organel dinamiğindeki hasarın sadece kas hücresine özgü olduğu sonucuna ulaşıldı.
- Megakoniyal KMD hastasına ait miyotüplerde megakoniyal mitokondrilerin hücrenin periferinden uzak ve hücre merkezinde ve çekirdeğe yakın yerleşim gösterdikleri saptandı.
- Megakoniyal KMD hastası ve kontrol primer hücre kültürleri ile yapılan Western Blot analizleri sonucunda; mitokondriyal fizyonda görevli Mfn1, Mfn2 ve OPA1 proteinlerinin ifade seviyelerinde hasta ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, mitokondriyal fizyonda görevli Drp1, Mff ve Fis1 proteinlerinin ifade seviyelerinin Megakoniyal KMD hastasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla 3.6, 2.0 ve 3.1 kat azaldığı sonucuna ulaşıldı. Organel dinamiğindeki hasarın kas hücresine özgü olduğu saptandığından, mitokondri dinamiğinde görevli proteinlerin ifadeleri desmin proteinine oranlanarak, sadece kas hücrelerindeki (miyoblast ve miyotüp) protein ifade seviyeleri değerlendirilmiştir.
- IF boyamalar sonucunda, Megakoniyal KMD hastasına ait primer hücrelerde Western Blot analizi ile uyumlu şekilde mitokondriyal fizyonda görevli üç temel proteinin (Drp1, Mff, Fis1) ifade seviyesinde azalma gözlemlendi. Ayrıca, üç fisyon proteininin sadece bozulmuş mitokondri ağında çekirdeğe yakın

mitokondrilerde yerleşim gösterdikleri ve sitoplazmik yerleşimlerinin olmadığı saptandı.

- Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsisinden alınan boyuna kesitlerde mitokondri belirteci olan Tom20 antikoru ile IF boyamalar yapıldı ve kontrol ile karşılaştırıldığında dinamik mitokondri ağında bozulmalar olduğu ve kas liflerinin merkezinde mitokondrilerin olmadığı saptandı.
- Megakoniyal KMD hastasına ait iskelet kas biyopsi dokularından alınan enine kesitlerde mitokondriyal fisyon proteinlerini (Drp1, Fis1, Mff) tanıyan antikolar ile IF boyama yapılmış ve kontrole kıyasla hem sitoplazmik hem de mitokondride yerleşim gösteren fisyon proteinlerinin ifade seviyelerinde WB analiziyle uyumlu olacak şekilde azalmalar olduğu gözlenmiştir.

6.2. Öneriler

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

- Kontrol ve Megakoniyal KMD primer hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli analizi ve mitokondriyal solunum zinciri kompleks aktivitelerinin ölçümü yapılarak, hastalıkta gözlenen mitokondriyal hasar ile ilişkili daha detaylı bilgi elde edilebilir.
- Megakoniyal KMD primer hücrelerinde mitokondriyal fisyon proteinlerinin aşırı ifadesi sağlanarak, mitokondri morfolojisi ve dinamik ağ yapısının düzeliş düzelmediği analiz edilebilir. Bu şekilde, Megakoniyal KMD hastalığında kas hücrelerinde saptanmış olan mitokondriyal fisyon azalışının organel hasarı üzerindeki potansiyel etkisini doğrudan incelemek mümkün olabilir.
- Mitokondriyal fisyonda görevli proteinlerin hücre içerisindeki regülasyonları (post-transkripsiyonel, post-translasyonel ve miRNA aracılı) analiz edilerek, hastalığın patogeneğinde gözlenen mitokondriyal fisyon azalışının nedenleri aydınlatılabilir.

- Megakoniyal KMD hastalığının patomekanizmasının daha iyi aydınlatılması ve iskelet kasında mitofajiye uğramamış mitokondrilerin hücreyi apoptozdan korumak için TRAP1 fosforilasyonuna başvurup başvurmadığı sorusunu yanıtlamak adına, PINK1 ve Parkin ifade seviyeleri ile PINK1 aracılı TRAP1 fosforilasyon seviyesi kontrol hücreleriyle karşılaştırmalı olarak analiz edilebilir.
- ER, hem fisyon mekanizmasında mitokondri boğumlanma sürecinde görev alması, hem de MAM aracılığıyla lipid alışverişinde bulunması sebebiyle mitokondri ile doğrudan ilişkili bir organeldir. Bu nedenle, mitokondride meydana gelen hasarın ve fisyon azalışının dolaylı yoldan ER'yi de etkileyebileceği düşünülerek, Megakoniyal KMD patogenezinde ER işlevini araştırmaya yönelik çalışmalar yapılabilir.
- Hücre iskelet elemanlarından septinlerin hem Drp1 hem de miyozin II ile etkileşime girerek fisyonda gözlenen organel boğumlanma sürecinde temel işlevi olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hücredeki septin miktarı ve yerleşimi analiz edilebilir.
- PC seviyesi azalışına bağlı olarak Megakoniyal KMD hastasına ait primer hücre/kas dokusunda değiştiği öngörülen lipid ve protein profili kontrol ile karşılaştırmalı olarak analiz edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Brault C, Levy P, Bartosch B. Hepatitis C Virus-Induced Mitochondrial Dysfunctions. *Viruses*. 2013;5(3):954.
2. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C817-33.
3. 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.
4. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 4):807-15.
5. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-5.
6. Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*. 1994;27(3):198-219.
7. Lewis MR, Lewis WH. Mitochondria in Tissue Culture. *Science*. 1914;39(1000):330-3.
8. Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*. 1953;1(4):188-211.
9. Archer SL. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med*. 2013;369(23):2236-51.
10. van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(6).
11. Fischer F, Hamann A, Osiewacz HD. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(7):284-92.
12. Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:751-80.
13. DiMauro S, Bonilla E, Davidson M, Hirano M, Schon EA. Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):199-210.
14. Katsetos CD, Koutzaki S, Melvin JJ. Mitochondrial dysfunction in neuromuscular disorders. *Semin Pediatr Neurol*. 2013;20(3):202-15.
15. 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.
16. 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.

17. Shy GM, Gonatas NK, Perez M. Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy. *Brain*. 1966;89(1):133-58.
18. 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. *Hum Mol Genet*. 2011;20(19):3841-51.
19. Sher RB, Aoyama C, Huebsch KA, Ji S, Kerner J, Yang Y, et al. A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *J Biol Chem*. 2006;281(8):4938-48.
20. 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.
21. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008;456(7222):605-10.
22. Iwasawa R, Mahul-Mellier AL, Datler C, Pazarentzos E, Grimm S. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J*. 2011;30(3):556-68.
23. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012;148(6):1145-59.
24. 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.
25. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*. 2009;138(4):628-44.
26. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):655-67.
27. Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol*. 1988;136(3):507-13.
28. Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res*. 1991;196(1):137-40.
29. Schumann U, Subramani S. Special Delivery From Mitochondria to Peroxisomes. *Trends Cell Biol*. 2008;18(6):253-6.
30. Sena Laura A, Chandel Navdeep S. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol Cell*. 48(2):158-67.
31. Livnat-Levanon N, Glickman MH. Ubiquitin-proteasome system and mitochondria - reciprocity. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1809(2):80-7.
32. Held NM, Houtkooper RH. Mitochondrial quality control pathways as determinants of metabolic health. *Bioessays*. 2015;37(8):867-76.

33. Baker MJ, Tatsuta T, Langer T. Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7).
34. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 2000;26(2):211-5.
35. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):870-9.
36. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* 2000;26(2):207-10.
37. Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:79-99.
38. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(12):872-84.
39. Dorn GW, Kitis RN. The Mitochondrial Dynamism-Mitophagy-Cell Death Interactome. Multiple Roles Performed by Members of a Mitochondrial Molecular Ensemble. 2015;116(1):167-82.
40. Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, et al. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol.* 2005;567(Pt 1):349-58.
41. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science.* 2005;310(5746):314-7.
42. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:321-34.
43. Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacin M, Zorzano A. Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes.* 2006;55(6):1783-91.
44. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999;98(1):115-24.
45. Benard G, Karbowski M. Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(3):365-74.
46. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell.* 2013;155(1):160-71.
47. Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell.* 2009;20(15):3525-32.

48. Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.* 2012;46:265-87.
49. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science.* 2004;305(5685):858-62.
50. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, et al. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet.* 2001;109(6):584-91.
51. Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombes A, et al. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 2005;6(9):853-9.
52. Aksu E, Balci-Hayta B. An overview of the recent knowledge about mitochondrial fusion and fission and related neurodegenerative diseases. *Acta Medica.* 2016;47(3):71-8.
53. Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem.* 2003;134(3):333-44.
54. Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 26):6535-46.
55. Hoppins S, Edlich F, Cleland MM, Banerjee S, McCaffery JM, Youle RJ, et al. The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol Cell.* 2011;41(2):150-60.
56. Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell.* 2006;126(1):177-89.
57. Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem.* 2003;278(10):7743-6.
58. Chen H, Chan DC. Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1201:21-5.
59. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26185-92.
60. Otera H, Miyata N, Kuge O, Mihara K. Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling. *J Cell Biol.* 2016;212(5):531-44.
61. Pernas L, Scorrano L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:505-31.

62. Pitts KR, Yoon Y, Krueger EW, McNiven MA. The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 1999;10(12):4403-17.
63. Griffin EE, Detmer SA, Chan DC. Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(5-6):482-9.
64. Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 7):1201-10.
65. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol*. 2003;23(15):5409-20.
66. Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*. 2013;24(5):659-67.
67. Hatch AL, Gurel PS, Higgs HN. Novel roles for actin in mitochondrial fission. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 21):4549-60.
68. Klecker T, Bockler S, Westermann B. Making connections: interorganelle contacts orchestrate mitochondrial behavior. *Trends Cell Biol*. 2014;24(9):537-45.
69. Pagliuso A, Tham TN, Stevens JK, Lagache T, Persson R, Salles A, et al. A role for septin 2 in Drp1-mediated mitochondrial fission. *EMBO Rep*. 2016;17(6):858-73.
70. Cervený KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE, Sesaki H. Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol*. 2007;17(11):563-9.
71. Eura Y, Ishihara N, Oka T, Mihara K. Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 23):4913-25.
72. Hajek P, Chomyn A, Attardi G. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5670-81.
73. Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*. 2006;443(7112):658-62.
74. Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep*. 2006;7(10):1019-22.
75. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*. 2007;178(5):749-55.
76. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, et al. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol*. 2009;187(7):1023-36.

77. Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2009;187(7):959-66.
78. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 2006;25(13):2966-77.
79. Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, et al. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 2009;28(11):1589-600.
80. Chang CR, Blackstone C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* 2007;282(30):21583-7.
81. Han XJ, Lu YF, Li SA, Kaitsuka T, Sato Y, Tomizawa K, et al. CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol.* 2008;182(3):573-85.
82. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem.* 2007;282(15):11521-9.
83. Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol.* 2007;178(1):71-84.
84. Braschi E, Zunino R, McBride HM. MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep.* 2009;10(7):748-54.
85. Zunino R, Schauss A, Rippstein P, Andrade-Navarro M, McBride HM. The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 7):1178-88.
86. Aoyama C, Yamazaki N, Terada H, Ishidate K. Structure and characterization of the genes for murine choline/ethanolamine kinase isozymes alpha and beta. *J Lipid Res.* 2000;41(3):452-64.
87. Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem.* 1956;222(1):193-214.
88. Mitsuhashi S, Nishino I. Megaconial congenital muscular dystrophy due to loss-of-function mutations in choline kinase beta. *Curr Opin Neurol.* 2013;26(5):536-43.
89. 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.
90. Ishidate K. Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1348(1-2):70-8.
91. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life.* 2010;62(6):414-28.

92. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):81-8.
93. Schon EA, Area-Gomez E. Is Alzheimer's disease a disorder of mitochondria-associated membranes? *J Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 2:S281-92.
94. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* 2004;36(5):449-51.
95. Merlini L, Nishino I, Consortium for Autophagy in Muscular D. 201st ENMC International Workshop: Autophagy in muscular dystrophies--translational approach, 1-3 November 2013, Bussum, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2014;24(6):546-61.
96. Quinlivan R, Mitsuaahashi S, Sewry C, Cirak S, Aoyama C, Mooore 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.
97. Rao N, Evans S, Stewart D, Spencer KH, Sheikh F, Hui EE, et al. Fibroblasts influence muscle progenitor differentiation and alignment in contact independent and dependent manners in organized co-culture devices. *Biomed microdevices.* 2013;15(1):161-9.
98. Bolton W, Barranco S. Characterization of the cell kinetics and growth properties of cystic fibrosis diploid fibroblasts in vitro. *Am J Hum Genet.* 1975;27(3):394.
99. Owens J, Moreira K, Bain G. Characterization of primary human skeletal muscle cells from multiple commercial sources. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013;49(9):695-705.
100. Akhmadeeva LR, Magzhanov RV, Bashkatov SA, Sharipova AV. [Glycosaminoglycans and their fractions in patients with hereditary neuromuscular disorders]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova.* 2003;103(5):60-5.
101. Long C, Amoasii L, Bassel-Duby R, Olson EN. Genome Editing of Monogenic Neuromuscular Diseases: A Systematic Review. *JAMA neurology.* 2016;73(11):1349-55.
102. Schmiedel J, Jackson S, Schafer J, Reichmann H. Mitochondrial cytopathies. *J Neurol.* 2003;250(3):267-77.
103. Yu-Wai-Man P, Carelli V, Chinnery PF. 197th ENMC international workshop: Neuromuscular disorders of mitochondrial fusion and fission-*OPA1* and *MFN2* molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Neuromuscul Disord.* 2013; 24(8):736-42.
104. Lee AG. Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1612(1):1-40.
105. Lu YW, Claypool SM. Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front Genet.* 2015;6:3.

106. Mitsuhashi S, Nishino I. Phospholipid synthetic defect and mitophagy in muscle disease. *Autophagy*. 2011;7(12):1559-61.
107. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RLA, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *PNAS*. 2010;107(1):378-83.
108. Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2004;15(11):5001-11.
109. Kageyama Y, Zhang Z, Roda R, Fukaya M, Wakabayashi J, Wakabayashi N, et al. Mitochondrial division ensures the survival of postmitotic neurons by suppressing oxidative damage. *J Cell Biol*. 2012;197(4):535-51.
110. Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol*. 2008;173(2):470-82.
111. Exner N, Treske B, Paquet D, Holmstrom K, Schiesling C, Gispert S, et al. Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci*. 2007;27(45):12413-8.
112. Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1638-43.
113. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2010;191(6):1141-58.
114. Mai S, Klinkenberg M, Auburger G, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci*. 2010;123(6):917-26.
115. Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS biology*. 2007;5(7):e172.
116. Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingerman E, Nunnari J, Hinshaw JE. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(1):20-6.
117. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001;12(8):2245-56.
118. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 2011; 334(6054):358-62.
119. Lee H, Yoon Y. Mitochondrial Fission: Regulation and ER Connection. *Mol Cells*. 2014;37(2):89-94.

8. EKLER

EK 1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



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

Sayı : 16969557-716

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24.06.2015 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2015/13
Proje No : GO 15/421 (Değerlendirme Tarihi: 24.06.2015)
Karar No : GO 15/421- 31

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Burcu HAYTA'nın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Nuhan PURALI, Yrd. Doç. Dr. Beril TALİM ve Evrim AKSU ile birlikte çalışacakları GO 15/421 kayıt numaralı ve "Megakoniyal Konjenital Müsküler Distrofi Hastalığında Mitokondri Dinamiğinin İncelenmesi" başlıklı proje önerisi araştırmının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| İZİNLİ | 11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye) | 12. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye) | İZİNLİ |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmenster (Üye) | 13 Prof. Dr Leyla Dinç (Üye) |
| İZİNLİ | 14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | İZİNLİ |
| 7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye) | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye) |
| 8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) | |

9. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Evrim AKSU

Doğum Yeri ve Tarihi: Kocaeli / 05.09.1990

Uyruğu: T.C.

İletişim Adresi ve Telefonu: Huzur Mahallesi, Cevizlidere Caddesi, 1117.Sokak,
No:8/7 Balgat-Ankara / +90 554 321 28 26

II- Eğitim Bilgileri

2015 – 2017 Yüksek Lisans, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
Hacettepe Üniversitesi, Ankara
AGNO: 3.97/4.00

2009 – 2014 Lisans, Biyolojik Bilimler Bölümü
Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara
AGNO: 3.55/4.00

III- Bilimsel Faaliyetler

Kasım 2015 – Kasım 2016 - Hacettepe Üniversitesi BAP Projesi - “Megakoniyal Konjenital Mütisküler Distrofi Hastalığında Primer Miyoblast Hücre Kültürünün Oluşturulması” (8892), Yardımcı Araştırmacı

Ağustos 2015 – Aralık 2016 – Hacettepe Üniversitesi BAP Projesi - “Megakoniyal Konjenital Mütisküler Distrofi Hastalığında Mitokondri Dinamiğinin İncelenmesi” (7717), Yardımcı Araştırmacı

Şubat 2015 – Ocak 2016 – Tübitak Projesi - “C2C12 miyoblast hücre hattında mitokondriyal katlanmamış protein cevabının (UPRmt) oluşturulması” (114S876), Proje Bursiyeri

Nisan 2014 – Haziran 2014 – Yaşam Bankası- Kordon Kanı Bankası, Yarı zamanlı iş

Haziran 2013- Eylül 2013 - University of Würzburg, Yaz Stajı

IV- Akademik Yayınlar

E. Aksu, B. Talim, B. Balci-Hayta. “Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in an *in-vitro* model of mitochondrial unfolded protein response” (Poster). The

European Human Genetics Conference 2017. Kopenhag, Danimarka, Mays 26-30, 2017.

E. Aksu, B. Talim, P. Dincer, B. Balci-Hayta. "Activation of the mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}) pathway in C2C12 myoblast cell line". 2016; Eur J Hum Genet, Vol. 24 E-Supp. 1, May 2016, p.221-222.

E. Aksu, B. Balci-Hayta. "An overview of the recent knowledge about mitochondrial fusion and fission and related neurodegenerative diseases". Acta Medica. 2016(5), 71-78.

