

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

“SURVIVAL MOTOR NÖRON” PROTEİNİ EKSİKLİĞİNİN
MİKROTÜBÜL POZİTİF UÇ PROTEİNLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dila KOYUNOĞLU

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2019

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

“SURVIVAL MOTOR NÖRON” PROTEİNİ EKSİKLİĞİNİN
MİKROTÜBÜL POZİTİF UÇ PROTEİNLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dila KOYUNOĞLU

Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hayat YURTER

ANKARA

2019

ONAY SAYFASI

“Survival Motor Nöron” Proteini Eksikliğinin Mikrotübül Pozitif Uç Proteinleri

Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Öğrenci: Dila KOYUNOĞLU


Danışman: Prof. Dr. Hayat YURTER

Bu tez çalışması 30.07.2019 tarihinde jürimiz tarafından “Tıbbi Biyoloji Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Şükriye Ayter TOBB ETÜ Tıp Fakültesi	
Tez Danışmanı:	Prof. Dr. Hayat YURTER Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Serap DÖKMECİ Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Çetin KOCAEFE Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Burcu HAYTA Hacettepe Üniversitesi	

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

09 Ağustos 2019


Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

30/07/2019



Dila KOYUNOĞLU

i

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

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

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

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

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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



Dila KOYUNOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve eğitimim süresince bilgisini deneyimini ve fikirlerini benimle paylaşarak bana her konuda destek olan, sevgi ve anlayışını esirgemeyen her zaman yanımda olan danışmanım Prof. Dr. Hayat YURTER'e,

Değerli fikir ve katkılarıyla ile tez çalışmamın her aşamasında yol gösterici ve destekleyici olan hocam Dr. Öğr. Üyesi Gamze BORA'ya,

Tez savunma sınavımda değerli katkılarını sunan jüri üyeleri Prof. Dr. Serap DÖKMECİ, Prof. Dr. Çetin KOCAEFE, Prof. Dr. Şükriye AYTER, Doç. Dr. Burcu HAYTA, Doç. Dr. Yunus Kasım TERZİ'ye,

Sevgili arkadaşım Çimen Göz'e ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimi her zaman desteğini hissettiğim aileme, sevgisi ve hoşgörüsüyle bana güç veren canım babama ithaf ediyorum.

ÖZET

Koyunoğlu, D., “Survival Motor Nöron” Proteini Eksikliğinin Mikrotübül Pozitif Uç Proteinleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019. Kalıtsal nöromusküler hastalıklarından olan Spinal müsküler atrofi (SMA), Survival of motor neuron 1 (SMN1) genindeki mutasyonlar nedeniyle oluşmakta ve SMN proteini eksikliğinden en fazla motor nöronlar etkilenmektedir. Nöron farklılaşması ve işleyişi için mikrotübül dinamiğinin ve stabilitesinin kontrolü önemli olup SMN eksikliğinde mikrotübül polimerizasyonunun bozulmasına ilişkin mekanizmalar bilinmemektedir. Mikrotübüller nöronlarda akzon ve dendrit yapılarının kurulmasını sağlayan, akzonun ucuna doğru mRNA, protein ve organel transportunda görevli hücre iskeleti elemanlarıdır. Mikrotübül stabilitesinin ve polimerizasyonunun düzenlenmesinde mikrotübül asosiye proteinler (MAP) ve mikrotübülün pozitif ucunda bulunan uç proteinleri (+TIP) görev almaktadır. Pozitif uç proteinlerinden olan EB1 ve EB3 (*End Binding Protein*) mikrotübülün uzayan ucundaki tübülünlere bağlanarak, pozitif uca bağlanan diğer proteinlerin birbirleriyle ilişki kuracağı moleküler bir platform oluşturmaktadır. MAP proteinlerinden olan MAP1B'nin ise EB proteinlerine bağlanıp sitoplazmada tutulmalarını sağladığı ve mikrotübüle bağlanmalarını engellediği bilinmektedir. Anabilim Dalı'mızda gerçekleştirilen önceki çalışmalarda SMN eksikliğinde MAP1B proteininde saptanan artışın EB proteinlerini etkileyebileceği düşünülerek bu tez çalışmasında, EB1 ve EB3 proteinlerinin ifade ve yerleşimleri motor nöron benzeri NSC34 hücre hattında araştırılmıştır. NSC34 hücrelerinde SMN ifadesi siRNA yöntemi ile baskılanarak in vitro SMA modeli oluşturulmuş EB1 ve EB3 proteinlerinin ifade düzeyi Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. EB1 proteininin NSC34 hücrelerinde endojen ifadesinin bulunmadığı, EB3 proteinin ise SMN eksikliğine bağlı olarak %44 oranında azaldığı saptanmıştır. SMN eksikliğinde EB3 proteinlerinin nörit başlangıcındaki ve ucundaki olası yerleşim değişikliğini araştırmak üzere immünfloresan boyama çalışmaları gerçekleştirilmiş, SMN eksikliğinde nörit başlangıcında EB3 proteinlerinin uzayan mikrotübül ucunda oluşturdukları komet yapılarının sayısında kontrol hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma, bir kometin mikrotübül üzerinde kapladığı alanda ise azalma saptanmıştır. Kometlerin kapladığı toplam alan, komet floresan yoğunluğu ve toplam (serbest ve mikrotübül ile ilişkili) EB3 floresan yoğunluğunda bir değişiklik saptanmamıştır. Sonuçlarımız, SMN eksikliğinde nöritlerin başlangıç kısmında yerleşim gösteren mikrotübüllerin kontrole göre daha dinamik yapıda olduklarına ve SMA patomekanizmasında EB3 proteinlerinin rolü olabileceğine işaret etmektedir. Bu konuda gerçekleştirilecek ileri araştırmalar ile SMN eksikliğinin mikrotübül dinamiğindeki rolünün açıklanması mümkün olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: SMN, mikrotübül, +TIP, MAP1B, EB1 ve EB3

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Tez Destek, Yüksek Lisans Proje Numarası: TYL-2018-17434 tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Koyunoğlu, D., Investigation of the Effect of “Survival Motor Neuron” Protein Deficiency on Microtubule Plus-End Proteins. Hacettepe University Graduate School Health Sciences, M. Sc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2019. Spinal muscular atrophy (SMA) is one of the hereditary neuromuscular disease, which is caused by mutations in the Survival of motor neuron 1 (*SMN1*) gene. SMN deficiency primarily affects motor neurons and regulation of microtubule dynamics and its stability is important for differentiation and functions of neuronal cells. Loss of SMN causes alterations in microtubule polymerization, however, the molecular mechanisms are largely unknown. Microtubule cytoskeleton plays role in establishment of dendrite and axon morphology as well as mRNA, protein and organelle transport to axonal terminals in neurons. Microtubule stability is regulated by both microtubule-associated proteins (MAPs) and plus-end tracking proteins (+TIPs), which localizes plus-end of microtubules. Among +TIPs, *End Binding Protein 1* (EB1) and EB3 proteins bind to tubulins in plus ends and form a molecular platform for the interaction of other +TIP proteins. MAP1B, a microtubule-associated protein, binds to EB proteins and prevents their binding to microtubule plus ends by keeping them into cytoplasm. Previously we showed that SMN deficiency causes MAP1B upregulation. Therefore, in this study we investigated whether expressions and/or localizations of EB1 and EB3 proteins are altered in motor neuron like NSC34 cell line. To establish *in vitro* SMA model, SMN was knocked-down by siRNA, then EB1 and EB3 protein levels were analyzed by Western blot. We found that EB1 is not endogenously expressed in NSC34 cells. In addition, we determined 44% downregulation in EB3 protein level in SMN depleted cells. To analyze localization of EB3 proteins at the beginning and tip of neurites, immunofluorescence stainings were performed in SMN knock-down cells. Increased number of comets, as well as decreased comet area was found at the beginning of neurites in SMN depleted cells compared to controls. We did not find significant alterations neither in total comet area nor floresan intensities of comets and also total EB3 proteins. Our results suggested that microtubules at the beginning of neurites are more dynamic in the absence of SMN and EB3 proteins may be involved in SMA pathomechanisms. Further studies will help to explain the role of SMN protein in microtubule dynamics.

Keywords: SMN, microtubule, +TIP, MAP1B, EB1 and EB3

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit (Project Number: TYL-2018-17434)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Spinal Müsküler Atrofi'nin Moleküler Biyolojik Özellikleri	3
2.2. Hücre İskeleti	4
2.3. Mikrotübüllerin Yapısı ve Organizasyonu	5
2.4. Mikrotübül Dinamiğini Düzenleyen Proteinler	7
2.5. Pozitif Uç proteinleri (+TIP)	8
2.6. EB Proteinleri	8
3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER	15
3.1. Gereçler	15
3.1.1. NSC34 Hücre Hattında SMN Gen İfadesinin Baskılanması	15

3.1.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	16
3.1.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofözezi	16
3.1.4. Western Blot	18
3.1.5. İmmünfloresan Boyama	22
3.2. Yöntemler	24
3.2.1. NSC34 Hücre Hattında SMN Gen İfadesinin Baskılanması	24
3.2.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	25
3.2.3. Western Blot Yöntemi	26
3.2.4. İmmünfloresan Boyama Yöntemi	28
3.2.5. Floresan Yoğunluk (<i>Intensity</i>) Analizi	29
3.2.6. Komet Analizi	29
3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	30
4. BULGULAR	31
4.1. Western Blot Yöntemi ile EB1 ve EB3 Proteinlerinin İfade Analizi	31
4.2. EB3 Yerleşim Analizi	32
4.2.1. EB3 Floresan Yoğunluk (<i>Intensity</i>) Analizi	34
4.2.2. EB3 Komet Analizi	35
4.3. Nörit Uzunluklarının Ölçülmesi	39
4.4. SMN ve MAP1B Gen İfadeleri Baskılanan Hücrelerde EB3 Protein Miktar Analizi	40
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
7. KAYNAKLAR	47

8. EKLER

EK-1: Tez çalışması için gerekli Etik Kurul İzni

EK-2: Orjinallik Raporu

EK-3: Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	Amonyum persülfat
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
γ tübülün	Gamma tübülün
α tübülün	Alfa tübülün
β tübülün	Beta tübülün
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Sığır serum albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CO₂	Karbondioksit
CLIP-170	<i>Cytoplasmic linker protein 170</i>
CLASP2	<i>CLIP-associated proteins 2</i>
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoksiribonükleik asit
dH₂O	Distile su
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EB	<i>End Binding Protein</i>
EB1	<i>End Binding Protein 1</i>
EB2	<i>End Binding Protein 2</i>
EB3	<i>End Binding Protein 3</i>
ESS	<i>Exonic splicing silencer</i>
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
kDa	Kilo dalton

MAPs	<i>Microtubule associated proteins</i>
MAP1B	<i>Microtubule associated protein 1B</i>
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i>
NaCl	Sodyum klorür
mM	Milimolar
µm²	Mikrometre kare
µm	Mikrometre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PD	Parkinson
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
p150glued	<i>Protein 150 kDa dynein associated dynactin 1</i>
SMA	Spinal Müsküler Atrofi
SMN1	<i>Survival of motor neuron 1</i>
SMN	<i>Survival of motor neuron protein</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
TEMED	N,N,N,N' Tetrametilendiamin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
+ TIPs	<i>Plus end tracking proteins</i>

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Nöronlarda SMN proteininin yerleşimi.	3
2.2.	Mikrotübül yapısı ve oluşumu.	6
2.3.	Mikrotübül polimerizasyonu ve depolimerizasyonu.	7
2.4.	İnsandaki EB1 proteininin yapısı.	9
2.5.	Mikrotübül dinamiğinde görevli mikrotübül pozitif uç proteinleri ve mikrotübül üzerindeki taşınmadan sorumlu mikrotübül motor proteinleri.	12
2.6.	EB proteinlerinin MAP1B tarafından düzenlenmesi.	13
4.1.	NSC34 hücrelerinde siRNA yöntemi ile SMN gen ifadesi baskılanması.	31
4.2.	NSC34 hücrelerinde SMN gen ifadesi baskılandığında A) EB3 protein miktarlarını gösteren örnek Western Blot Sonuçları, B) EB1 proteininin ifadesinin olmadığını gösteren sonuçlar.	32
4.3.	NSC34 kontrol hücrelerinde EB3 ve Tirozin α tübülün eş boyamasına ait fotoğraflar A) Tirozin α tübülün boyaması B) EB3 boyaması, C) EB3-Tirozin α tübülün eş boyamasına ait çakıştırılmış fotoğraflar.	33
4.4.	SMN ifadesi baskılanan NSC34 hücrelerinde EB3 floresan <i>intensity</i> analizi sonuçları. A) Nörit başlangıcında ve nörit ucunda seçilen 200 μm^2 'lik sabit alana ait fotoğraflar, B) Nörit başlangıcı ve ucundan gelen EB3 floresan sinyalinin yoğunluğu ve nörit başlangıcı/nörit ucu oranını gösteren sonuçlar	34
4.5.	NSC34 kontrol hücrelerinde EB3 proteinlerinin A) komet yapılarına ve B) analiz görüntülerine ait örnek fotoğraflar.	36
4.6.	SMN gen ifadesi baskılanan NSC34 hücrelerinde komet analizi sonuçları. A) 200 μm^2 'lik sabit alanda eşik değeri belirlenmesi sonrası kometlerin görüntüsüne ait örnek fotoğraflar	

- B)** komet sayısı, **C)** bir kometin mikrotübül üzerinde kapladığı alan, **D)** kometlerin mikrotübül üzerinde toplam kapladıkları alan **E)** kometlerin toplamından gelen floresan yoğunluğa ait sonuçlar. 37
- 4.7.** SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerde comet analizlerinden elde edilen sonuçların şematik gösterimi. 38
- 4.8.** NSC34 hücrelerinde nörit boyu analizleri. **A)** Nörit ölçümüne ait örnek fotoğraf, **B)** Nörit boyu analiz sonuçları. 39
- 4.9.** SMN ve MAP1B gen ifadeleri baskılanan hücrelerde EB3 protein miktarını gösteren Western Blot sonuçları. 40

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
3.1. SDS poliakrilamid jel elektroforezi solüsyonları	17
3.2. Protein miktar tayininde standart eğri çizilmesi için BSA derişimleri	25

1. GİRİŞ

Çocukluk çağı kalıtsal nöromusküler hastalıkları arasında en sık görülen ve omurilikteki motor nöronların kaybı ile karakterize olan *Spinal müsküler atrofi* (SMA) *Survival of motor neuron 1* (SMN1) geninde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle oluşmaktadır. SMN proteini eksikliğinde hücrelerde splicing, mRNA trafiği, endositoz, otofaji, hücre iskeleti dinamiği gibi birçok temel mekanizmanın bozulduğu bilinmektedir. SMN “housekeeping” bir protein olmasına karşın SMN eksikliğinden en fazla motor nöronlar etkilenmektedir. Sağlıklı nöritlerde ve büyüme konilerinde yerleşim göstermesi, ayrıca eksikliğinde nörit uzamasının bozulduğuna ilişkin bulgular, SMN proteininin hücre iskeleti dinamiğinde rolü olduğunu düşündürmüştür. Bu konuda yapılan araştırmalar, SMN eksikliği durumunda hücre iskeleti elemanlarından olan aktin ve düzenleyici proteinlerde değişiklikler olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan SMN eksikliğinde mikrotübül polimerizasyonunun bozulduğu gösterilmişse de neden olan mekanizma detaylı olarak açıklanamamıştır. Mikrotübüller gelişmekte olan ve olgun nöronlarda nöronal mimarinin korunmasını, akzonun ucuna doğru mRNA, protein ve organel transportunu sağlamaktadır. Ayrıca nöronlarda akzon ve dendrit yapılarının kurulması, bu sayede hücre içi taşıma ve sinyal iletiminin sağlanmasında görevlidir. Nöronların doğru bir şekilde farklılaşması ve işleyişi için mikrotübül dinamiğinin ve stabilitesinin kontrolü önemlidir. Mikrotübül ile ilişkili olan MAP proteinleri (*microtubule-associated proteins*) ve mikrotübülün pozitif ucunda bulunan +TIP proteinleri (*plus end tracking proteins*) mikrotübül stabilitesini doğrudan düzenlemektedir.

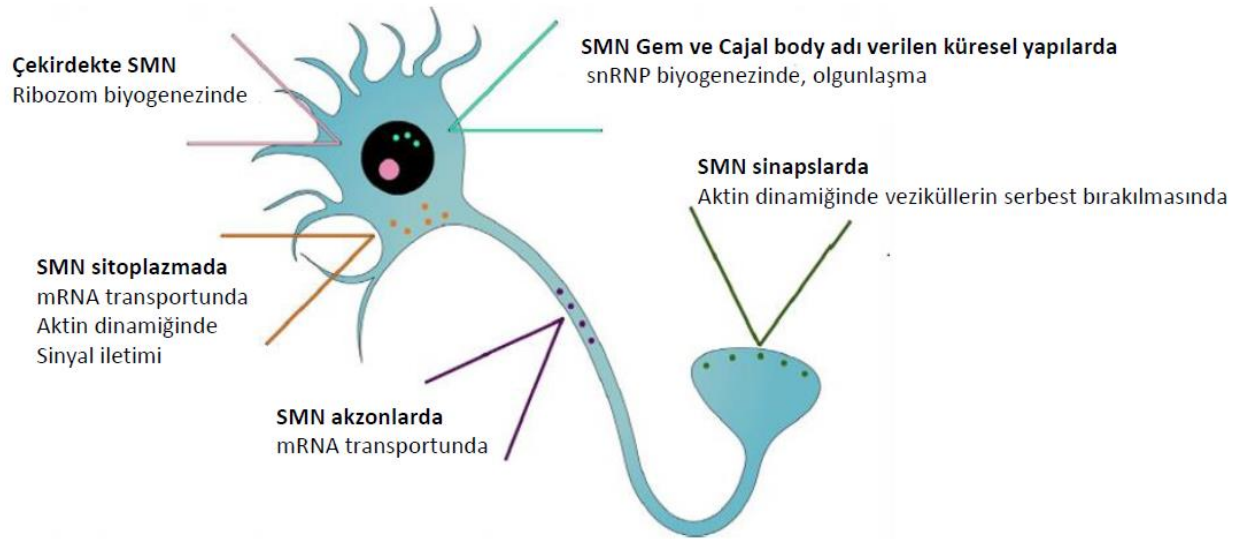
Anabilim Dalı’ımızda SMA hastalığının moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik temel araştırmalar yürütülmektedir. Çalışmalarımız son dönemde mikrotübül dinamiğinin düzenlenmesinden sorumlu olan, mikrotübül polimerizasyonunda ve aktin bağlantısının kurulmasında görev alan mikrotübül-asosiyasyon protein 1B (MAP1B) üzerinde yoğunlaşmıştır. MAP1B’nin, mikrotübül pozitif uç proteinlerinden olan *End Binding Protein* (EB) proteinlerine bağlanıp sitoplazmada tutulmalarını sağladığı ve EB’lerin mikrotübüle bağlanmalarını engelleyerek mikrotübül stabilitesi ve polimerizasyonunu etkilediği bildirilmiştir(1). +TIP proteinleri grubuna giren EB protein ailesinin üç üyesi bulunmaktadır. EB1 ve EB3 sitoplazmada homodimer veya heterodimer formunda bulunmakta mikrotübül

uçlarına eşit etkinlikte bağlanmakta ve nöronlarda mikrotübül dinamiğini kontrol etmektedir. EB2'nin ise dimer yapısına katılmadığı ve mikrotübül ucuna bağlanmadığı bilinmektedir. EB1 tüm dokularda, EB3 proteini özellikle beyin ve iskelet kasında ifade edilmektedir. EB1 ve EB3 mikrotübülün uzayan ucundaki tübülünlere bağlanarak, farklı pozitif uç proteinlerinin birbirleriyle ilişki kuracağı moleküler bir platform oluşturmaktadır. Bu nedenle EB proteinlerinin ifade düzeyi ve yerleşiminde oluşacak değişiklikler mikrotübül ile ilişkili mekanizmaları olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Önceki çalışmalarımızda, SMN eksikliğinde mikrotübül dinamiğini düzenleyen bir protein olan MAP1B'nin artmış olduğunu göstermiş olmamız, mikrotübül stabilizasyonunu düzenleyen, uzamasını sağlayan ve pozitif uç proteinlerine platform oluşturan EB proteinlerinin de SMN eksikliğinden etkilenmiş olabileceğini düşündürmüştür. Literatür araştırmamızda bu konuda bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle tez kapsamında, motor nöron benzeri NSC34 hücre hattında SMN eksikliğinin mikrotübül pozitif uç proteinlerine olası etkisini açıklamak üzere EB1 ve EB3 proteinlerinin ifade düzeyi ve olası yerleşim değişikliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Müsküler Atrofi'nin Moleküler Biyolojik Özellikleri

Spinal müsküler atrofi (SMA), otozomal resesif olarak kalıtılan nörodejeneratif bir hastalıktır (2). Genellikle çocukluk çağı hastalığı olarak kabul edilmekle birlikte erişkin dönemde de ortaya çıkmaktadır. SMA, *Survival of Motor Neuron 1* (SMN1) geninde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle omurilikteki alfa motor nöronların dejenere olması sonucunda oluşmaktadır. Hastalarda en çok görülen mutasyon tipi 7. ve 8. ekzonlardaki homozigot delesyonlardır (3, 4). SMN geninden sentezlenerek hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında yerleşim gösteren SMN proteini 38 kDa ağırlığındadır (Şekil 2.1). SMN proteininin eksikliğinde hücrelerde splicing, mRNA trafiği, endositoz, otofaji, hücre iskelet dinamiği gibi birçok temel mekanizmanın bozulduğu bilinmektedir. SMN proteini *housekeeping* bir protein olmasına rağmen eksikliğinden en fazla motor nöronlar etkilenmekte, hastalarda simetrik kas zayıflığı ve atrofi görülmektedir (5).



Şekil 2.1. Nöronlarda SMN proteininin yerleşimi.

SMA hastalığından sorumlu olan SMN1 geni 5q11.2-13.3 kromozom bölgesinde bulunmaktadır (6). SMN1 geninin SMN2 olarak adlandırılan homolog kopyası bulunmakta ve bu iki gen arasında 5 nükleotide farklılık bulunmaktadır (7-9). Bu farklılıklardan en önemlisi 7. ekzondaki sitozin nükleotidinin timine transisyonudur.

SMN2 geninde bulunan timin *splicing*'in doğruluğunu kontrol eden ve yer aldığı ekzonun RNA içerisinde bulunmasını sağlayan *exonic splicing silencer* (ESS) dizisinin meydana gelmesine sebep olmaktadır. Bu durumda *exonic splicing enhancer* (ESE) dizilerine bağlanması gereken serin ve arjinin amino asitlerince zengin SR proteinlerinin yeni oluşan ESS dizilerine bağlanması bozulmaktadır. Sonuç olarak *splicing* hatası oluşmakta ve transkriptlerin % 90'ında 7. ekzon atlanmaktadır. 7. ekzonu bulunmayan kısa SMN proteini oligomerizasyon özelliğini yitirip kararsızlaşmakta ve yıkılmaktadır. SMN2 geninden % 10 oranında sentezlenen doğru uzunluktaki SMN proteini ise hastalığı engelleyecek düzeyde değildir (10). Hastalar arasında klinik ciddiyet farklılık göstermekte, hastalığın en ciddi formu olan Tip I hastaları genellikle ilk iki yıl içinde kaybedilirken, hastalığın hafif formu olan Tip IV'de belirtiler 30 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır (3).

SMN proteininin sağlıklı nöritlerde ve büyüme konilerinde bulunmasına ve eksikliğinde nörit uzamasının bozulduğuna ilişkin bulgular SMN proteininin hücre iskeleti dinamiğinde rolü olduğunu düşündürmüştür. Bu konuda yapılan araştırmalar, SMN eksikliği durumunda aktin iskeleti ve düzenleyici proteinlerinde değişiklikler olduğunu göstermiştir. SMA modelleri ile yapılan çalışmalarda hücre iskeletini düzenleyen ROCK ve onunla bağlantılı AKT-ERK yolaklarında yer alan proteinlerde fosforilasyonların değiştiği, aktine bağlanan proteinlerden profilinIIa ve plastin3'ün ifadelerinin arttığı, hücre iskeletinin kurulmasında görevli olan F-aktin miktarının ve yerleşiminin değiştiği belirlenmiştir (11-13). SMN eksikliğinde mikrotübül polimerizasyonunun bozulduğu gösterilmişse de neden olan mekanizma detaylı olarak açıklanamamıştır.

2.2. Hücre İskeleti

Ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında yer alan protein yapıdaki çeşitli filamentler ve tübüller tarafından oluşturulan ağısı yapı hücre iskeleti olarak adlandırılmaktadır. Hücre iskeleti elemanlarının hücre bütünlüğünün sağlanması ve korunması, hücre bölünmesi, hücre ve organel hareketi, organel ve veziküllerin hücre içinde taşınması, kas kasılması ve sinyal iletimi gibi önemli görevleri bulunmaktadır. Hücre iskeleti elemanları yapısal ve işlevsel olarak değerlendirildiğinde mikrofilamentler, ara filamentler ve mikrotübüller olarak üçe ayrılmaktadır. Aktin

iskeleti olarak da adlandırılan mikrofilamentler (5-7 nm çapında) en ince elemanlar olup aktin proteininden oluşmaktadır. Hücrenin hareketini ve şeklini sağlamakta olan aktinin kas kasılmasında önemli görevleri bulunmaktadır. Ara filamentler ise 8-10 nm çapında, boyut olarak mikrotübül ve mikrofilament arasında bulunan, hücre ve dokulara mekanik destek sağlamada görevli olan iskelet elemanlarıdır. Hücre iskeleti elemanları birbirlerini koordine eden bir sistem olarak çalışmaktadır. Özellikle aktin ve mikrotübül arasındaki bağlantılar hücre göçü ve bölünmesi sırasında hücre şeklinin ve polaritesinin düzenlenmesi açısından önemlidir (14).

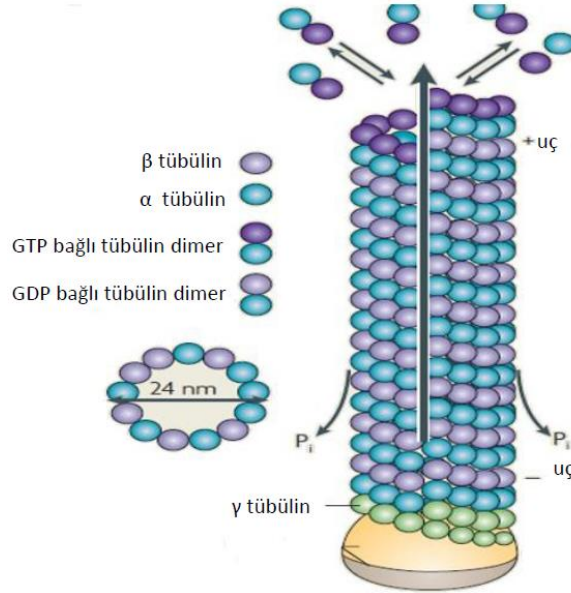
Mikrotübüller sentrozomda nükleasyona uğrayarak serbest bırakılmakta, daha sonra dentritlere ve akzonlara iletilmektedir. Nörofilamentler akzonlarda bol miktarda bulunmaktadır. Mikrofilamentler ise hücre içinde dağınık olarak yerleşmekte ve çoğunlukla plazma zarının yakınında bulunmaktadır (15).

SMN eksikliğinde hücre iskelet elemanlarından mikrotübüllerin depolimerizasyona bağlı uzama süreci bozulmakta ve dinamizm olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu süreçte yer alan mekanizmaların tam olarak açıklanamamış olması nedeni ile konu ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

2.3. Mikrotübüllerin Yapısı ve Organizasyonu

Ökaryotik hücrelerin tümünde bulunan mikrotübüller alfa (α) ve beta (β) tübülün proteinlerinin biraraya gelmesiyle oluşan içi boş silindirik polimerlerdir. α ve β tübülün proteinleri heterodimer oluşturmakta, bu heterodimerler belirli yönde birbiri ardına eklenerek protofilamentleri meydana getirmektedir. 13 adet lineer protofilamentin bir araya gelmesiyle mikrotübül yapısı oluşmaktadır. Mikrotübüller çoğunlukla sentrozomda bulunan *Microtubule organizing center* (MTOC)'dan oluşarak hücrenin içerisine dağılım gösteren 25 nm çapında en büyük hücre iskeleti elemanıdır. Çeşitli protein kompleksleri tarafından kurulan MTOC'un temel proteini gamma (γ) tübülindir. γ tübülün bir ring kompleksi olan (γ -TuRC) içerisinde yer almakta ve MTOC'daki diğer proteinlerle etkileşerek mikrotübüllerin oluşumunu sağlamaktadır. Bununla birlikte negatif uçların kapatılarak stabilizasyonunu sağlamaktadır. Mikrotübüller hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılması, hücre içi taşıma, hücre polaritesinin sağlanması, nöronlarda akzon ve dendrit morfolojilerinin oluşması, akzonal iletim gibi birçok temel biyolojik süreçte rol

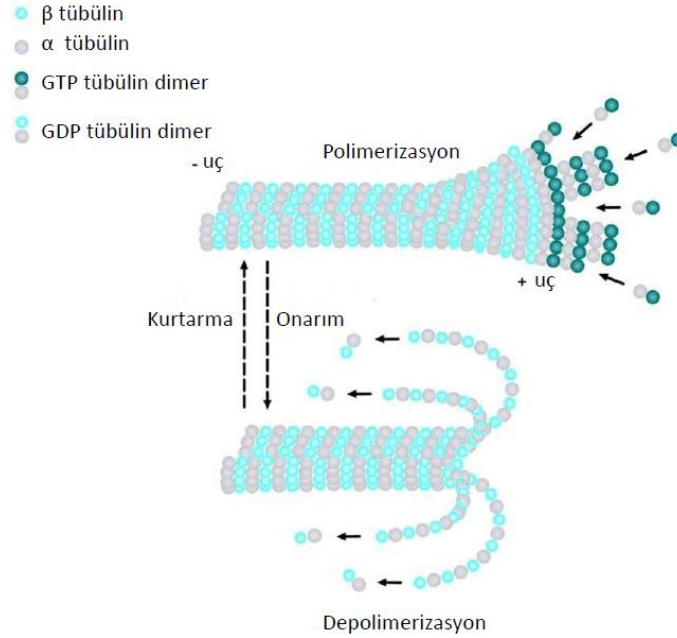
oyunmaktadır. Mikrotübüllerin yapısına katılan α ve β tübülün proteinlerinin belirli bir yönde yerleşimi mikrotübüllere polar özellik kazandırmakta ve α tübülün proteinleri negatif uçta, β tübülün proteinleri pozitif uç yönünde yerleşim göstermektedir (Şekil 2.2.) (16, 17).



Şekil 2.2. Mikrotübül yapısı ve oluşumu.

Mikrotübül yapısı dinamik olup sürekli yenilenen/yeniden inşa edilen bir ağ halinde düzenlenmektedir. Mikrotübülün pozitif uçları genellikle hücrenin çevresine yönelik olup, hücrenin merkezine bakan negatif uçlarından daha dinamiktir (18). Dinamizm polimerizasyon ve depolimerizasyon ile düzenlenmektedir. Yeni tübülün proteinlerinin mikrotübüle katılması polimerizasyon ve ayrılması depolimerizasyon olarak adlandırılmakta, negatif uçla karşılaştırıldığında pozitif uçta daha fazla gerçekleşmektedir. GTP hidrolizi dinamizmin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Polimerizasyonda mikrotübülün uzayan ucuna GTP- β tübülün içeren heterodimerler bağlanmakta ardından GTP hidrolizi başlamaktadır. Hidroliz sonucu oluşan GDP- β tübülünün kararsız ve depolimerizasyona eğilimli olmasından dolayı mikrotübülün kafes (*lattice*) kısmında kalmaktadır (18, 19). Mikrotübüller polimerizasyon sonucu uzama (*growth*) ve depolimerizasyon sonucu kısalma (*shrinkage*) fazları arasında geçiş yapmakta ve bu olay *dinamik instabilite* olarak adlandırılmaktadır. Mikrotübüllerin dinamik instabilitesi mitoz sırasında kromozomların hareketi açısından önemlidir. Uzama aşamasından kısalmaya geçiş

yıkım (*catastrophe*) ve bu olayın geri dönüşü ise kurtarma (*rescue*) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.3.) (18, 20).



Şekil 2.3. Mikrotübül polimerizasyonu ve depolimerizasyonu.

2.4. Mikrotübül Dinamiğini Düzenleyen Proteinler

Mikrotübüller gelişmekte olan ve olgun nöronlarda önemli hücre iskeleti elemanıdır. Mikrotübül yapılanması nöronal gelişim sırasında meydana gelen morfolojik değişikliklerin temelini oluşturmaktadır. Nöron hücreleri mikrotübülün dinamik yapısı sayesinde hücre dışından gelen uyarılara cevap olarak hızla morfolojik değişimler geçirirler. Mikrotübüller nöronal mimarinin kurulmasına ve korunmasına katkıda bulunmakta, hücre içi taşınmayı mümkün kılmakta ve sinyal moleküllerinin iletimi için temel yapı görevi görmektedir. Bu nedenlerle nöronların doğru bir şekilde farklılaşması ve işleyişi için mikrotübül dinamiği ve kararlılığı çok önemlidir (21). Mikrotübüllerin dinamik yapısı mikrotübüllere bağlanan bir grup protein tarafından kontrol edilmektedir. Bu proteinler pozitif uç proteinleri (*+TIP microtubule plus-end tracking proteins*), mikrotübül asosiyasyon proteinleri (*MAP microtubule-associated proteins*), mikrotübül motor proteinleri (dinein, kinesin) ve

mikrotübülü destabilize eden proteinler (katanin, spastin, statmin) olarak gruplandırılmaktadır. (20).

Özellikle nöronal farklılaşma sırasında mikrotübül boyunca bağlanarak mikrotübülü stabilize eden MAP'lar ve +TIP'ler mikrotübüllerin dinamiklerinin düzenlenmesine önemli katkı sağlamaktadır (22). MAP ailesinin üyesi olan MAP1B nöronal gelişim sırasında oldukça fazla ifade edilen bir proteindir. Mikrotübül stabilitesini ve dinamiğini etkileyerek nörit uzamasında, nöronal migrasyonda, büyüme konisinin yönlendirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Kültüre edilen kortikal nöronlarda RNA interferans ile baskılandığı durumda akzonlarda mikrotübül uzama hızının düştüğü ve akzon uzamasının yavaşladığı görülmüştür (21, 23). Tau, MAP1B ve MAP2 gibi nöronal MAP'lar mikrotübül nükleasyonunu, polimerizasyonunu ve stabilizasyonunu sağlamaktadır (22).

2.5. Pozitif Uç proteinleri (+TIP)

Mikrotübül pozitif ucunun dinamiği tübülün veya mikrotübül ile etkileşime giren bir grup protein ile düzenlenmektedir. Pozitif uçla etkileşimli proteinler olarak bilinen bu protein grubu mikrotübülün uzayan uçlarına yerleşen yapı ve fonksiyonları farklı olan mikrotübül regülatörleridir (18). Hücrelerde uzayan mikrotübülün pozitif uç bölgesine bağlanan proteinler (+TIP) mikrotübül dinamiğini düzenleyerek hücre zarı, organeller ve kromozomların kinetokor bölgesi gibi yapılarla etkileşim içindedir. Bu nedenle +TIP'ler mikrotübül iskeletinin hücre bölünmesi, polarizasyon ve farklılaşmadaki rolü için önemlidir (24). Mikrotübülün pozitif ucunda bulunan +TIP proteinleri (EB1, EB2, EB3, CLIP-170, SKAP, CLASP, APC, AMER2) pozitif uçtaki polimerizasyon ve depolimerizasyonunu kontrol ederek mikrotübül dinamiğini düzenlemekte ve stabilitesini sağlamaktadır. +TIP proteinleri grubunda yer alan EB proteinleri diğer uç proteinlerinin bölgede toplanmasını düzenleyen ve mikrotübüllerin uzamasında kilit görevi olan platform proteinlerdir (25).

2.6. EB Proteinleri

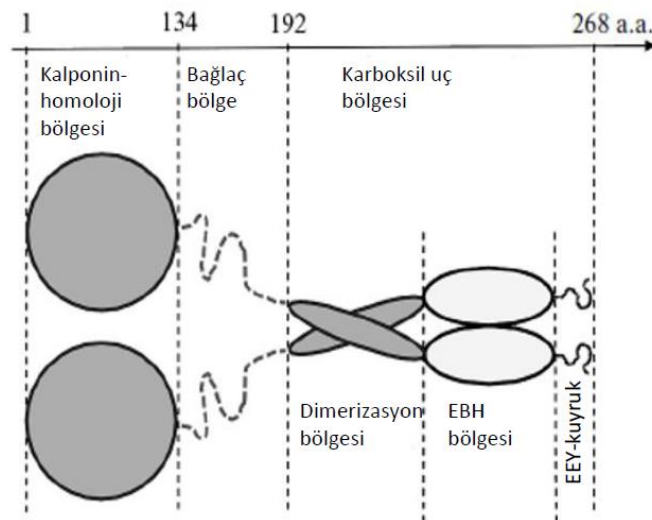
EB1, EB2 ve EB3 olmak üzere üç üyesi bulunan EB proteinleri yaklaşık 300 aminoasitten oluşan, üç fonksiyonel bölgeye sahip evrimsel olarak korunmuş ve

birbirleriyle yüksek dizi homolojisi gösteren proteinlerdir (18) EB proteinleri mikrotübülün pozitif ucuna bağlanarak mikrotübülü depolimerizasyondan koruyan ve stabilitesini sağlayan önemli bir protein grubudur (24). EB proteinleri; amino ucundaki kalponin-homoloji bölgesi, bağlaç bölge (*linker*) ve karboksil uç bölgesi olmak üzere üç yapısal bölgeden oluşmaktadır (18). İnsandaki EB proteinlerine örnek olarak EB1 proteinin yapısı Şekil 2.4’de gösterilmiştir.

Amino ucundaki kalponin-homoloji bölgesi: 133 aminoasitten oluşan ve mikrotübülün uzayan uçları ile ilişki kuran kısmıdır. Bu bölge aktine ve sinyal proteinlerine bağlanma özelliğindeki benzerlikten dolayı kalponin-homoloji bölgesi olarak adlandırılmaktadır.

Bağlaç bölge (*linker*): Proteinin 134-192 aminoasitleri arasında yer alan bu bölge amino ve karboksil bölgeleri arasında bağlantı oluşturmakta ve moleküle esneklik kazandırmaktadır.

Karboksil uç bölgesi: 192-268 aminoasitler arasındaki bu bölgede bulunan EB-homoloji dizisi, EB proteinlerinin çok sayıda pozitif uç proteini ile ilişki kurmasını sağlamaktadır. Bu bölgenin diğer bir önemi de bulundurduğu “*coiled coil*” motif sayesinde proteinin dimerizasyonundan sorumlu olmasıdır. Karboksil ucunda ise asidik aminoasitlerden oluşan ve proteine esneklik kazandıran kısa bir kuyruk bölgesi bulunmaktadır.



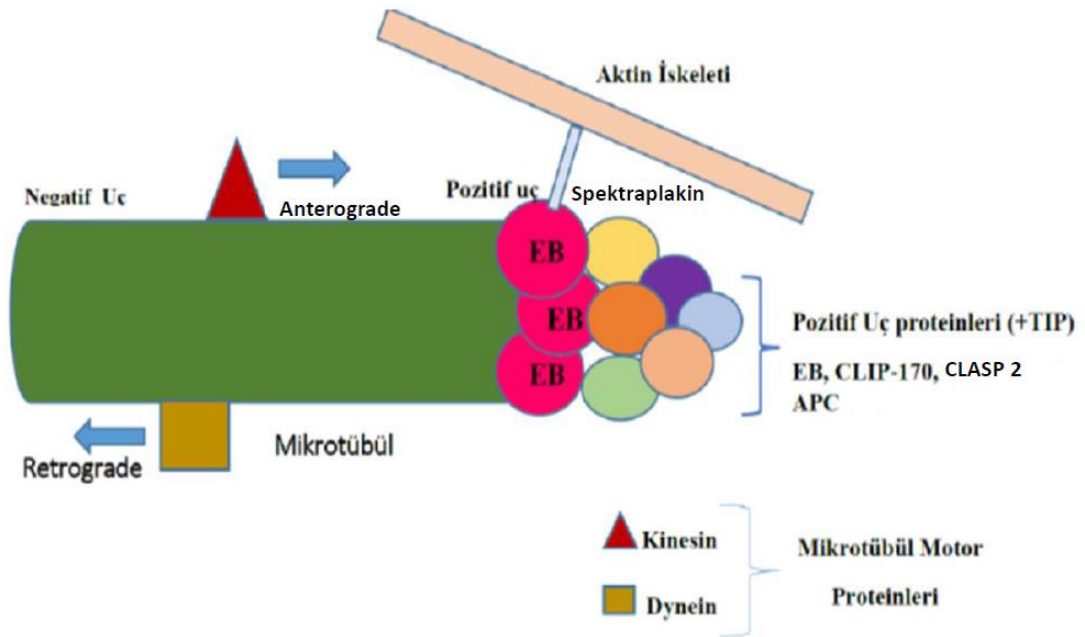
Şekil 2.4. İnsandaki EB1 proteininin yapısı.

Mikrotübüllerin birçok fonksiyonu büyüme hızlarına, pozitif ve negatif uçlarına dayanmaktadır. Mikrotübülün pozitif uçları hızlı bir şekilde polimerize olan ve mikrotübül uzamasının gerçekleştiği yerlerdir. Hücre döngüsünün tüm evrelerinde buldukları gösterilen EB proteinleri mikrotübülün pozitif ucunu etkileyerek uzamasını düzenleyen ve diğer +TIP proteinlerinin pozitif uca toplanması için kilit görevi olan protein grubudur (25, 26). EB protein ailesinin üyeleri homodimer ve heterodimer yapabilme özelliğindedir. İnsanda EB1 ve EB3 heterodimer, EB2 ise homodimer yapısı oluşturmaktadır. Yapılan in-vitro çalışmalar, EB proteinlerinin mikrotübül pozitif ucuna bağlanması için dimerizasyon gerekmediğini göstermiştir. (16) Yavaş büyüme gösteren negatif uçlar ise genellikle MTOC bölgesine bağlı bulunmaktadır. EB1 ve EB3 proteinlerinin mikrotübülün pozitif ucunda yer almasına ve fonksiyon göstermesine rağmen negatif ucunda da bulunduğu ayrıca golgi cisimciğinin morfolojisinin kurulmasında da etkin rol aldığı bilinmektedir. EB1 ve EB3 golgi membranı üzerinde bulunan miyomegalin proteinine bağlanarak mikrotübül ve golgi membranı arasındaki koordinasyonu sağlayan EB-miyomegalin kompleksini oluşturmaktadır (27). Bu kompleks golgi membranı ile mikrotübül bağlantısını kurarak golgi katmanlarının sıkı bir şekilde kümelenmesini önlemektedir. EB protein ailesinin diğer proteinlerle etkileşime giren karboksil uç bölgesi CRISPR/Cas9 tekniği ile *knock-out* edildiğinde mikrotübüllerin golgi membranından ayrıldığı ve golgi kompleksinin daha kompakt olduğu gösterilmiştir (28).

EB proteinleri mikrotübülün pozitif uç kısmını düzenleyici ve kendisiyle etkileşime giren partner proteinlerinden oluşmaktadır. Bu gruplar sırasıyla SxIP veya Cap-Gly bölgeleri içermektedir. Bu bölgelerden SxIP motifinin farklı proteinler arasında oldukça geniş bir şekilde temsil edildiği bilinmektedir. Bu motif *serine-x-isoleucine-proline polipeptidine* sahiptir. Bu motifin proteinlerde olması EB proteinleri ile etkileşim halinde olmasını sağlayarak mikrotübül pozitif ucuna bağlanma yeteneği kazandırmaktadır. EB partner proteinleri çok sayıdadır. Bu proteinlerden önemli olanlarından bazıları *adenomatous polyposis coli* (APC), *protein 150 kDa dynein associated dynactin 1* (protein p150glued) ve XMAP215'dir. APC proteini tümör baskılayıcı proteindir. Mitotik ağ dinamiklerini düzenleyerek hücre göçü, hücre çoğalması, akzon ve dentritlerin gelişimi ve nörogenezde rol

almaktadır. p150glued proteini dinein/dinaktin mikrotübül motor kompleksinin bir parçasıdır ve mikrotübül üzerindeki taşınımı düzenlemektedir. XMAP215 proteini tübülün polimerazdır ve EB1 proteini ile birlikte mikrotübül polimerizasyonunu arttırmaktadır (18).

EB proteinleri mikrotübül polimerizasyonuna etki ederek nöronal mimarinin kurulmasını sağlamaktadır. Her hücrede ifade edildiği bilinen EB1 proteini nöronlarda akzonun distalinde bulunmakta ve hücredeki motor komplekslere (dinein/dinektin) bağlanarak mikrotübül üzerinde organel ve veziküllerin retrograde taşınmasını sağlamaktayken, EB3 proteini çoğunlukla beyin ve nöronlarda ifade edilmekte ve aktin iskeletini düzenleyen spektraplaklin proteini ile ilişki kurarak mikrotübül ve mikrofilament arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır(21, 29). EB2 proteini hakkında diğer proteinlere göre daha az bilgi bulunmakta olup, epitel farklılaşmanın ilk aşamalarında mikrotübül hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağladığı bilinmektedir. (Şekil 2.5.) (25, 30).



Şekil 2.5. Mikrotübül dinamiğinde görevli mikrotübül pozitif uç proteinleri ve mikrotübül üzerindeki taşınmadan sorumlu mikrotübül motor proteinleri.

EB1 ve EB3 proteinlerinin nörit uzamasında rol aldığı bilinmektedir. Nöroblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda EB1'in mikrotübül uzama hızını ve süresini kontrol ettiği, baskılandığı durumda nörit boyunun kısa kaldığı gösterilmiştir. Büyüme konisinde yoğun olarak bulunduğu gösterilen EB3 ise F-

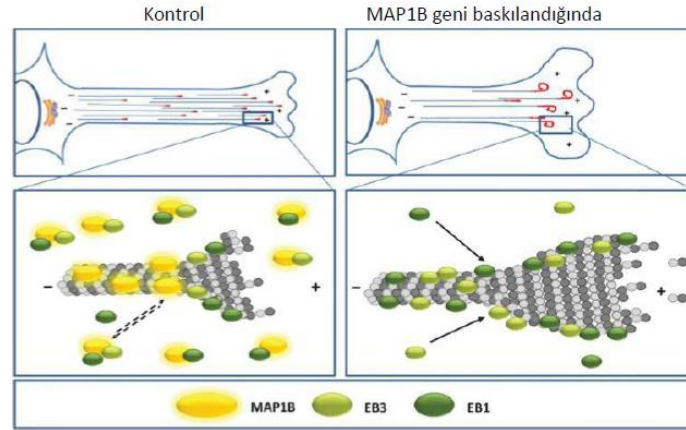
aktin ile ilişki kurarak nörogenez sırasında mikrotübül dinamiğini sağlamaktadır. (21).

Tau proteini nöron gelişiminin, polaritesinin ve nörit uzamasının sağlanmasında çok önemli bir protein olarak bilinmektedir. Bu fonksiyonlarının yanı sıra akzonlarda mikrotübül stabilite regülatörü olarak iş görmekte, EB1 ve EB3 proteinlerinin yerleşimini kontrol etmektedir. Çalışmalar Tau ve EB proteinlerinin eş yerleşim gösterdikleri ve akzon uzamasında birlikte görev aldıklarını göstermiştir. Farklılaşan primer nöronlarda akzonun medial ve distal bölgelerinde EB proteinlerinin birikimi için tau proteini gereklidir. Bununla birlikte EB3 proteininin mikrotübül üzerinde düzenlenmesinde Tau proteini önemli rol oynamaktadır. Nöroblastoma hücreleriyle yapılan bir çalışmada Tau protein ifadesinin shRNA ile baskılandığı durumda EB1 ve EB3 proteinlerinin ifade düzeylerinin ve komet uzunluklarının azaldığı gösterilmiştir (22). EB1, EB3 ve MAP1B proteinlerinin farklılaşmakta olan nöron hücrelerinin nöritlerinde ve büyüme konilerinde bulunarak mikrotübül dinamiğini ve stabilitesini sağladığı bilinmektedir. Özellikle EB3 proteini büyüme konilerinde yoğun miktarda bulunmakta, nörit uzaması sırasında F-aktin ve dinamik mikrotübüller arasındaki etkileşimin koordinasyonunda rol oynamaktadır (26). Tüm bu bilgiler doğrultusunda EB3'ün nörit uzaması sırasında mikrotübül, aktin iskeleti ve dendrit morfolojilerinin düzenlenmesinde önemli olduğu bilinmektedir (21).

Büyüme konisinin gelişimine paralel olarak akzonların uzaması da mikrotübül organizasyonundaki düzenlemeye bağlıdır. MAP ve EB proteinlerinin mikrotübül üzerindeki yerleşimi farklıdır. EB proteinleri mikrotübülün pozitif uçlarında comet adı verilen kuyruklu yıldız şeklindeki yapılarda birikirken, MAP proteinleri mikrotübül boyunca bağlanmaktadır (21). EB1 ve EB3 comet sayı ve uzunluklarının mikrotübüllerin sayısı ve uzama hızlarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir.

EB1 ve EB3 proteinlerinin hücre içerisindeki yerleşimleri MAP1B, MAP2 ve Tau proteinleri tarafından düzenlenmektedir. MAP1B proteininin ifadesinin baskılandığı durumda mikrotübül yoğunluğunda azalma ve mikrotübül büyüme hızındaki artış ile bağlantılı olarak az fakat daha uzun EB kometleri gözlenmektedir. Mikrotübül yoğunluğunun azalması nedeni ile tübülün miktarı artırılarak

mikrotübülün polimerizasyonu sağlanmakta ve mikrotübül büyümesi hızlandırılmaktadır. MAP1B protein ifadesinin arttırıldığı durumda ise MAP1B proteini EB proteinine bağlanıp onu sitoplazmada tutarak mikrotübülün pozitif uçlarına yerleşmesini engellemektedir (Şekil 2.6.) (1, 23).



Şekil 2.6. EB proteinlerinin MAP1B tarafından düzenlenmesi.

MAP2 proteini dendritlerde EB3'ün dağılımı için önemlidir (31). MAP2 ve Tau proteinlerinin ifadelerinin artması EB1 proteininin mikrotübüllere bağlanmasını sağlamaktadır (1, 26).

Partner protein olarak adlandırılan bazı proteinler EB proteinlerine bağlanarak fonksiyon göstermektedir. Örneğin, +TIP proteinlerinden olan APC proteini SxIP motifi aracılığı ile EB proteinlerine bağlanarak MT stabilitesinin düzenlenmesinde ve hücre göçünün gerçekleştirilmesinde rol oynamaktadır. EB proteinleri ile ilişki kurarak mikrotübülün pozitif ucunda yerleşen pozitif uç proteinlerinden bir diğeri olan CLIP-170 (*Cytoplasmic linker protein 170*) hücre içerisindeki vezikülleri mikrotübüllere bağlayan ve dinein-dinaktin kompleksini mikrotübülün pozitif ucuna çeken protein olarak bilinmektedir (32). Hücre döngüsü sürecinde mikrotübül dinamiğini düzenleyen ve mitoz sırasında kinetokorla ilişki kuran pozitif uç proteinlerinden bir başkası olan CLASP2 (*CLIP-associated proteins*) proteininin hücre bölünmesinin metafaz evresinde EB proteinlerine bağlanarak kinetokor mikrotübül bağlantılarının kurulmasını sağladığı ve stabilizasyonu koruduğu gösterilmiştir (33).

Anabilim Dalı'mızda SMA hastalığının moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik temel araştırmalarımız son dönemde MAP1B proteini üzerine yoğunlaşmıştır. SMN ifadesi baskılanan motor nöron benzeri NSC34 hücre

hattı ve fare modeline ait omurilik dokusunda MAP1B protein miktarında artış saptanmıştır. Literatürde MAP1B'nin ifadesinin arttığı durumda EB proteinlerine bağlanarak EB'lerin mikrotübülün uç kısmına bağlanmasını engellediği bildirilmiştir (1). Bu nedenle SMN eksikliği durumunda artan MAP1B proteininin EB proteinlerine etkisi olabileceği düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında, SMN eksikliğinin EB1 ve EB3 proteinlerinin ifade düzeylerine ve hücre içi yerleşimlerine etkisi araştırılmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. NSC34 Hücre Hattında SMN Gen İfadesinin Baskılanması

Coğaltma Ortamı

DMEM 4,5 g/l D-glukoz Glutamax (Gibco) :94 ml

Fetal dana serumu (Biochrom): 5 ml

Penisilin/streptomisin: (Biochrom): 1 ml

Farklılaştırma Ortamı

DMEM 4,5 g/l D-glukoz Glutamax (Gibco) :98 ml

Fetal dana serumu (Biochrom): 1 ml

Penisilin/streptomisin: (Biochrom): 1 ml

Transfeksiyon

Optimem (Gibco) : 100 µl

Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher Scientific) : 7 µl

siRNA Dizileri (Europhins) :3 µl

SMN siRNA : 5' CAGAAGUAAAGCACACAGCAA-dTdT 3'

MAP1B siRNA-1: 5'-GCUCAACUCAGCUUCAUC-dTdT-3'

Scrambled siRNA kontrol : 5' AUACGAACGGAACGAACAACA-dTdT 3'

Vakumlu filtre sistemi (Jet Biofil)

Yuvarlak Lamel No.1 (0.13-0.16 mm), 18mm (100 adet/paket) (Marienfeld)

Mattek

3.1.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

RIPA Tamponu

RIPA base + proteaz inhibitör tablet (50X) + fosfataz inhibitör tablet (20X)

RIPA base; Tris- HCL pH: 7.5 (20 mM), NaCl (137 mM), B-glucofosfat (25 mM)

EDTA (2 mM), Sodyum ortovanadat (1 mM), TritonX-100 (%1), Deoksikolat (%1)

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

3.1.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Akrilamid-Bisakrilamid karışımı, %40

Akrilamid: 19,56 g

Bisakrilamid: 0,54 g

dH₂O ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Ayırıcı Jel, pH 8.8

Tris Baz: 13,6 g

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 0,3 g

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Toplayıcı Jel, pH 6.8

Tris Baz:4,54 g

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS):0,6 g

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Amonyum Persülfat (APS), %10

Temed

dH₂O

İzopropanol

Tablo 3.1. SDS poliakrilamid jel elektroforezi solüsyonları

	Ayırıcı Jel %12	Toplayıcı Jel %5
dH ₂ O	6,35 ml	4,25 ml
Ayırıcı Jel Solusyonu	6 ml	-
Toplayıcı Jel Solusyonu	-	1 ml
%40 Akrilamid/Bisakrilamid	5,65 ml	750µl
Temed	10 µl	10 µl
APS	100 µl	60 µl

Yükleme Tamponu:

NuPAGE Reducing Agent, 10X (Invitrogen) : 2 µl

NuPAGE LDS Buffer, 4X (Invitrogen) : 5 µl

5X Laemmlı Solusyonu

1M Tris Baz, pH 8 : 5ml

Gliserol:5ml

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS):1,5 g

Brom Fenol Mavisi : 5 mg

2-Merkaptoetanol: 2,5 ml

5X Elektroforez Tamponu

Tris-Baz: 15.15 g

Glisin : 72 g

SDS: 5g

200 ml stoktan alınarak, dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanmıştır.

Protein Moleküler Ağırlık İşaretleyici:

ColorBurst™ Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich)

3.1.4. Western Blot

Nitroselüloz Membran (Thermo Scientific)

Coomassie Brilliant Mavisi(Sigma)

Ponceau-S (Sigma)

SuperSignal™ West Femto Kemilüminesans Substrat Kiti (ThermoFisher)

İmmubilon (Millipore)

GeneGnome5 Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı (Syngene)

5X Yürütme Tamponu

Tris Baz : 15.15 g

Glisin: 72 g

SDS: 5 gr

1X için 200 ml stoktan alınır, dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

5X Transfer Tamponu

Tris Baz : 15.15 g

Glisin: 72 g

Metanol: 200 ml

1X için 200 ml stoktan alınır, dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

10X TBS pH7.6:

Tris Baz: 24.4 g

NaCl: 80 g

dH₂O ile 1 litreye tamamlanır.

Yıkama Tamponu (TBS-T) %0,1:

Tween 20 (Sigma): 1 ml

10XTBS'den 200 ml alınır, dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

% 5 Bloklama Cözeltisi:

Süt tozu: 2 g

BSA: 2 g

TBS-T, % 0,1: 40 ml

Antikor Cözeltisi:

- **EB3 (tavşan, Abcam), birincil antikor**

% 5 Süt Tozu: 6 ml

1 µl antikor

- **EB3 (anti-tavşan, Amersham), ikincil antikor**

% 5 Süt Tozu: 8 ml

1 µl antikor

- **EB1 (fare, BD Transduction), birincil antikor**

% 5 BSA: 2700 µl

% 0,1-% 0,3 Tween 20

3 µl antikor

- **MAPRE1/EB1 (sıçan, Abcam), birincil antikor**

% 5 BSA: 2000 µl

1 µl antikor

- **EB1 (anti-fare, HRP, Sigma), ikincil antikor**
% 5 BSA: 8 ml
1 µl antikor
- **EB1 (goat-anti-sıçan, HRP, Abcam), ikincil antikor**
% 5 BSA: 10 ml
1 µl antikor

- **Alfa Tübülin, (fare, Sigma) birincil antikor**
% 5 Süt Tozu: 4 ml
4µl antikor
- **Alfa Tübülin (anti-fare, Sigma), ikincil antikor**
% 5 Süt Tozu: 8 ml
1µl antikor

- **GAPDH (fare, Applied Biosystems), birincil antikor**
% 5 Süt Tozu: 5 ml
1µl antikor
- **GAPDH (anti-fare, Sigma), ikincil antikor**
% 5 Süt Tozu: 8 ml
1µl antikor

- **SMN (fare, BD Transduction), birincil antikor**

% 5 Süt Tozu: 4 ml

4µl antikor

- **SMN (anti-fare, Sigma), ikincil antikor**

% 5 Süt Tozu: 8 ml

1µl antikor

Bağlanan Antikoru Uzaklaştırma (*Stripping*)

dH₂O: 4,15 ml

Tris HCl: 312µl

2-Merkaptoetanol: 37,5 µl

%20 SDS pH:7.2

3.1.5. İmmünfloresan Boyama

EB3 Tirozin Alfa Tübülün Eş Boyama

- Konfokal mikroskop (100X, Leica)

Fiksasyon: % 100 Metanol

- **EB3 Bloklama Çözeltisi**

%20 BSA

BSA: 1 g

TBS-T: 5 ml

%1 hazırlamak için %20 BSA'dan 50 µl alındı.

%10 Triton™ X-100 (Thermo Scientific)

Triton™ X-100: 2 ml

PBS: 18 ml

%0.3 hazırlamak için %10 BSA'dan 30 µl alındı.

- **EB3 (tavşan, Abcam), birincil antikor**

Bloklama Çözeltisi: 500µl

1 µl antikor

- **EB3 (anti-tavşan Alexa flour 568), ikincil antikor**

Bloklama Çözeltisi: 500 µl

1µl antikor

- **Tirozin α Tübülün Bloklama Çözeltisi**

%1 BSA : 50 µl

% 10 Goat Serum :100 µl

%0,1 PBS- Tween 20: 10 µl

840 µl PBS ile 1 ml'ye tamamlanmıştır.

- **Tirozin α Tübülün, (sıçan, Abcam) birincil antikor**

Bloklama Çözeltisi: 1000 µl

1µl antikor

- **Tirozin α Tübülün, (Anti-sıçan, Alexa flour 488), ikincil antikor**

Bloklama Çözeltisi: 1000 µl

1µl antikor

Mounting, Prolong Anti-Fade Solüsyonu (DAPI'li) (Thermo Fisher Scientific)

5µl

3.2. Yöntemler

3.2.1. NSC34 Hücre Hattında SMN Gen İfadesinin Baskılanması

NSC34, fare nöroblastoma ve omurilik motor nöron füzyonu ile oluşturulmuş hücre hattıdır. Bu hücre hattı kültür ortamındaki serum oranının azaltılmasıyla motor nöron benzeri hücrelere farklılaştırılabilmektedir (34). Hücreler çoğaltılarak farklılaştırılmış ve gen ifadesinin baskılanması amacıyla siRNAtansfekte edilmiştir. Bu amaçla:

- İlk olarak sıvı azotta dondurulmuş olan NSC34 hücreleri hızlıca çözülerek çoğaltma ortamı içeren 75 cm²'lik kültür kaplarına aktarılmıştır.
- Hücrelerin çoğaltma ortamı taze ortam ile değiştirilmiştir.
- Kültür ortamı atılarak 5 ml PBS eklenmiştir.
- Hücrelerin pasajlanması amacı ile 5 ml Tripsin/EDTA eklenmiş ve hücreler 8 dk 37 °C, %5 CO₂ içeren etüve kaldırılmıştır.
- Tripsinin inaktivasyonu amacıyla 7 ml çoğaltma ortamı koyularak hücreler (1000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Pellet 3 ml çoğaltma ortamı ile resüspanse edilerek 1:2 oranı korunacak şekilde yeni kültür kabına aktarılmıştır.
- Hücreler transfeksiyon ve farklılaştırma deneyleri amacıyla hemositometre yardımıyla sayılarak Western Blot çalışmaları için 6 kuyucuklu kültür kaplarına 200.000 hücre, immünfloresan boyama çalışmaları için 12 kuyucuklu kültür kaplarına 25.000, mattek adı verilen kültür kaplarına ise 65.000 hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. 1 gece 37 °C, %5 CO₂ içeren etüve kaldırılarak hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra farklılaştırma ortamı koyulmuş ve transfeksiyon karışımı eklenerek 72 saat farklılaştırılmıştır.
- Transfeksiyon amacıyla SMN, scrambled dizilerine ait ana stoklar hazırlanmış ve Lipofectamin 2000 ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Western Blot çalışmaları için 72 saatlik farklılaşma sonrasında hücreler RIPA tamponu içerisine toplanarak protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Hücreler dondurulacağı zaman ise santrifüj sonrasında dondurma ortamına alınarak -80 °C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2.2. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

siRNA ile transfekte edilen hücreler kültür ortamında 72 saat farklılaştırıldıktan sonra proteaz ve fosfataz içeren koruyucu tampon içerisine toplanmış ve sonike edilmiştir. Örnekler 14.000 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek, süpernatant temiz tüpe aktarılmıştır. İzole edilen proteinler miktar tayini yapılabildiği kadar -20 °C'de saklanmıştır.

BCA Protein Assay kiti kullanılarak izole edilmiş protein miktarları belirlenmiştir. %1 SDS içerisinde farklı BSA derişimlerine sahip standartlar kullanılarak standart eğri çizilmiştir.

Tablo 3.2. Protein miktar tayininde standart eğri çizilmesi için BSA derişimleri.

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

Protein örnekleri %1 SDS ile 10 kat dilüe edilmiştir. 1ml 50A:1B oranında hazırlanmış olan çözelti (*working reagent*) eklenerek ve 37°C'deki inkübatör içerisinde 30 dk. bekletilmiştir.

Örnekler Nanodrop cihazına üçlü tekrarlar şeklinde yüklenerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ardından standart eğri çizilmiş ve izole edilen proteinlerin miktarları saptanmıştır.

3.2.3. Western Blot Yöntemi

SMN geninin baskılandığı durumda EB1 ve EB3 protein miktarlarının analizi ve SMN ifadesindeki baskılanmanın doğrulanması amacıyla Western Blot çalışmaları gerçekleştirilmiştir. SMN 38 kDa, EB3 32 kDa ve EB1 proteininin 30 kDa molekül ağırlığında olmaları nedeniyle ve %5 ve 12,5'lük SDS poliakrilamid jeller hazırlanarak protein örnekleri elektroforeze edilmiştir. Eşit yüklemenin kontrolü ve kantitasyonu amacıyla housekeeping proteinlerden alfa-tübülin proteini (55 kDa) her deneyde analiz edilmiştir. Proteinler 30µg olacak şekilde aşağıda içerikleri belirtilen jellere yüklenmiş ve elektroforez gerçekleştirilmiştir.

SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

- Proteinler farklı yoğunluktaki iki tabakalı ayırıcı ve toplayıcı jel sisteminde %5 / %12 SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır.
- Camlar etanol ile temizlenerek arasına ayırıcı jel dökülmüştür. Ayırıcı jel polimerizasyonunu takiben toplayıcı jel dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir. Jelin polimerleşmesini takiben taraklar çıkartılıp jel Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad) tankına yerleştirilmiştir.
- Örneklerin üzerine 2 µl indirgeyici ajan (*SampleReducing Agent*) ve 5 µl LDS yükleme tamponu eklenip son hacim 20 µl olacak şekilde distile su eklenmiştir. Kaynama derecesindeki suda indirgeyici ajanının (*SampleReducing Agent*) kullanıldığı örnekler 5 dk, edildikten sonra doğrudan buz üzerine konulmuştur. 10 µl protein moleküler ağırlık işaretleyici ile örnekler jelle yüklenmiştir. 100 V 'da 1,5-2 saat boyunca proteinlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir.

Islak (Wet) Transfer

Elektroforez sonrasında toplayıcı jel kesilip atılarak ayırıcı jel kesilmiş nitroselüloz membran, 4 adet *Whatmann* kağıdı ve süngerler transfer tamponunun içinde 5 dakika bekletilmiştir. Kasetin siyah kapağından başlayarak sırasıyla sünger, 2 *Whatmann* kağıdı, jel, membran, 2 adet *Whatmann* kağıdı, sünger konulduktan

sonra kaset kapatılmıştır. Ardından ıslak transfer tamponunu içeren tanka aktarılarak 100 V'da 1 saat boyunca buz kalıbı içerisinde proteinlerin jelden membrana transfer edilmiştir. Transfer sonrasında jeli kontrol etmek için *Coomassie Brilliant Mavisi*, membranı kontrol etmek için Ponceau S boyası kullanılmıştır.

Hibridizasyon

- Transferin ardından özgül olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla membran %0,1 TBS-T içerisinde hazırlanmış olan %5 süt tozlu solüsyon içerisinde çalkalayıcıda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama gerçekleştirilmiştir. Birincil antikor, bloklama solüsyonu içerisinde 1:6000 oranında seyreltilmiştir ve +4 °C'de 16 saat süre ile çalkalanarak inkübe edilmiştir. Daha sonra membran yıkama tamponu 3 defa 10 dk. aralıklarla yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır. Sekonder antikor bloklama solüsyonu içerisinde 1:8000 oranında dilüe edilmiş ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında yıkama tamponu ile 4 defa 10 dk aralıklarla yıkanmıştır.
- EB1 analizi için ise membran %5 BSA içeren bloklama solüsyonu içinde çalkalayıcıda bir gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ertesi gün membran üzerine antikor eklemeye önce bloklama solüsyonu içerisine % 0,1-% 0,3 oranında Tween 20 eklenmiştir ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hedef proteine özgül birincil antikor dilüsyonu, % 0,1-% 0,3 oranında Tween 20 eklenen %5 BSA'nın %10'u alınarak bloklama solüsyonu içerisinde 1:9000 oranında seyreltilerek ve 1 saat süre ile çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Ardından yıkama tamponu ile 3 defa 10 dk. aralıklarla yıkanmıştır. Sekonder antikor da bloklama tamponu 1:8000 oranında seyreltilmiş ve 45 dk. çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında yıkama tamponu kullanılarak 8 defa 5 dk. aralıklarla yıkanmıştır.

- İfadesi değişmeyen *housekeeping* protein olarak alfa túbülin kullanılmış ve bu proteini görüntülemek için önceden membran üzerine uygulanan antikorlar *stripping* işlemi ile kaldırılmıştır. Bu işlemdede membran hibridizasyon fırınının içinde 65 °C’de 30dk. bekletilmıştir. Ardından üç defa hızlı, üç defa da 10’ar dk. ara ile %0,1 TBS-T ile yıkanmıştır.
- SMN geninin baskılandığını kontrol etmek amacı ile SMN protein ifadesi incelenmiştir. SMN primer antikor 1:1000, anti-mouse sekonder antikor ise 1:8000 oranında bloklama tamponu içerisinde seyreltilmiş ve membrana uygulanmıştır. Proteinlere ait bantlar *West Femto* ve *Immubilon* kemilüminesans kiti kullanılarak görüntülenmiştir. Membranlar karanlıkta görüntüleme karışımı ile 5dk. inkübe edilerek, GeneGnome görüntüleme cihazında 5 dakikalık poz süreleri ile görüntülenmiştir.

3.2.4. İmmünfloresan Boyama Yöntemi

EB3-Tirozin Alfa Túbülin Eş Boyama

NSC34 hücrelerinde dinamik mikrotúbül belirteci olan tirozin alfa túbülin proteini üzerinde EB3 proteininin hücre içi yerleşimi immünfloresan boyama yöntemi ile araştırılmıştır.

- Hücreler SMN siRNA veya scrambled siRNA ile transfekte edilip 72 saat farklılaştırdıktan sonra %100 metanol ile fikse edilmiştir.
- Hücelere 1 saat oda sıcaklığında bloklama solusyonu uygulanmıştır.
- NSC34 hücreleri üzerine EB3 proteinini tanıyan rabbit birincil antikor ile bloklama çözeltisi içinde 1:500 oranında seyreltilerek +4 °C’de 16-18 saat boyunca inkübe edilerek daha sonra 3 defa 1X PBS ile 5 dk. yıkanmıştır.
- Ardından hücreler üzerine Anti rabbit Alexa flour 568 (kırmızı) ikincil antikor 1:500 oranında bloklama çözeltisi içinde seyreltilerek bir saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek daha sonra 4 defa 1X PBS ile 5 dk. yıkanmıştır.

- Tirozin α túbülin bloklama solusyonu için %1 (50 μ l) BSA, % 10 (10 μ l) Tween 20, % 10 (100 μ l) Goat Serum, PBS (840 μ l) içeren 1 ml bloklama solusyonu hazırlanmıştır.
- Tirozin α túbülin proteinini tanıyan birincil antikor bloklama çözeltisi içinde 1:1000 oranında seyreltilerek +4 °C’de 16-18 saat boyunca inkübe edilerek daha sonra 3 defa 1X PBS ile 5 dk. yıkanmıştır.
- Ardından hücreler üzerine Anti rat Alexa flour 4888 (yeşil) ikincil antikor ile 1:1000 oranında bloklama çözeltisi içinde seyreltilip bir saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 4 defa 1X PBS ile 5 dk. yıkanmıştır.
- Hücreler bu aşamadan itibaren ışıktan korunmuştur ve 4 kez 5 dk. 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine çekirdek boyamasını görüntüleyebilmek için içerisinde DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) bulunduran *Prolong anti-fade* solüsyonu damlatılarak +4 °C’ye kaldırılmıştır.

3.2.5. Floresan Yoğunluk (*Intensity*) Analizi

Hücreler konfokal mikroskopta görüntüledikten sonra fotoğraflar “Image J” analiz programına aktarılmış nörít başlangıcı ve nörít uç bölgesini alacak şekilde 200 μ m² alan belirlenmiştir. Bu alanda mikrotübüllerin kapladıkları alan belirlenmiş ve mikrotübülün 1 μ m²’indeki EB3 floresan sinyalin yoğunluğu (*floresan intensity*) hesaplanmıştır. SMN ifadesi baskılanan hücrelerden elde edilen sonuçlar kontrol hücreler ile karşılaştırılmıştır.

3.2.6. Komet Analizi

EB proteinleri de mikrotübülün pozitif uç kısmında kuyruklu yıldız (*comet*) şeklinde görüntüler oluşturmaktadır. Komet analizi amacıyla hücreler transfekte edildikten sonra %100 metanol ile fikse edilmiştir. EB3 proteini ile birlikte, uzayan mikrotübüllerin belirteci olan tirozin alfa túbülin eş boyamaları gerçekleştirilmiştir. Boyamalar sonrası örnekler konfokal mikroskopta 100X objektif kullanılarak incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Uzayan mikrotübüller üzerinde EB3 proteinlerinin

yerleşim yerleri olan komet bölgeleri görüntülenmiştir. Komet analizi için nörin başlangıcı ve ucunda 200 μm^2 'lik alan belirlenmiştir. Bu alana giren mikrotübül alanı belirlenmiş ve mikrotübülün 1 μm^2 sindeki komet sayısı, ortalama komet büyüklüğü, EB3 komet floresan yoğunluğu analiz edilmiştir. SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerden elde edilen sonuçlar kontrol hücreler ile karşılaştırılmıştır.

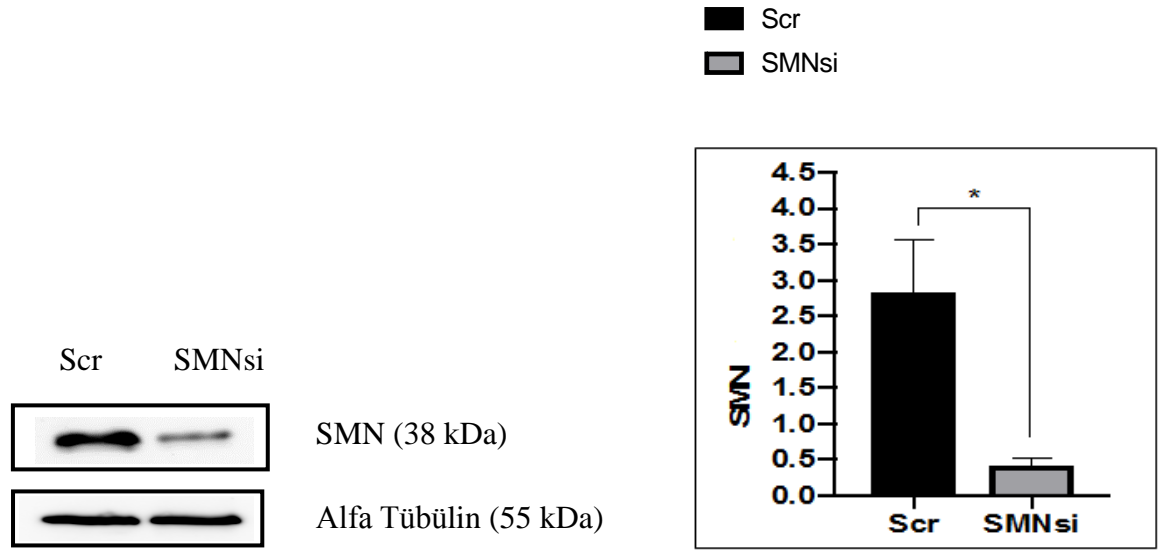
3.2.7 Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Western Blot ve immünfloresan boyama çalışmalarından elde edilen sonuçlar ImageJ programıyla analiz edilmiştir. Grafiklerin çiziminde ve gruplar arasındaki istatistiksel analizlerin değerlendirilmesinde GraphPadPrism7 programı kullanılmıştır. $p < 0.05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

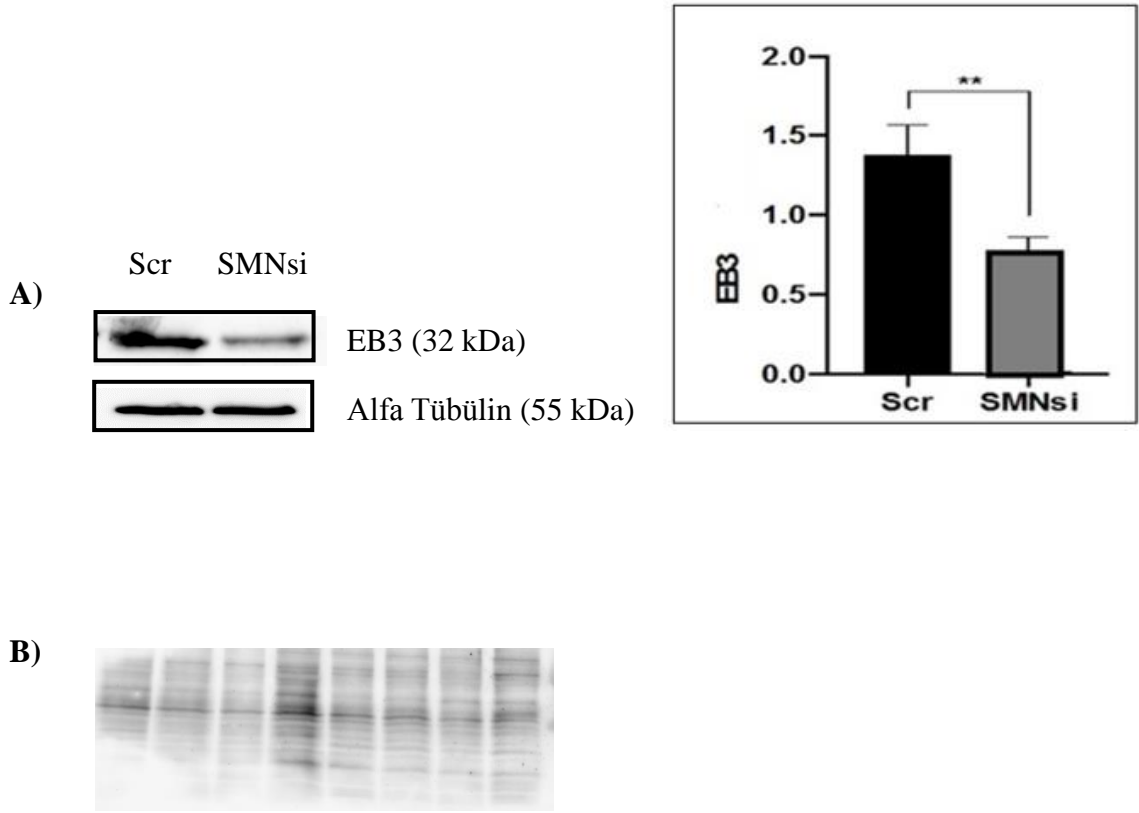
4. BULGULAR

4.1. Western Blot Yöntemi ile EB1 ve EB3 Proteinlerinin İfade Analizi

NSC34, fare nöroblastoma ve omurilik motor nöron füzyonu ile oluşturulmuş bir hücre hattı olup, çoğaltma ortamındaki serum oranının azaltılmasıyla motor nöron benzeri karakter kazanmaktadır. Bu hücrelerde SMN gen ifadesi yöntem kısmında belirtildiği gibi siRNA ile baskılanmış ve Western blot çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlarımız, SMN gen ifadesinin NSC34 hücrelerinde yaklaşık % 86 oranında baskılandığını ve SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerde EB3 protein miktarının kontrole göre %44 oranında azaldığını göstermiştir. Ancak EB1 proteininin NSC34 hücrelerinde endojen olarak ifade olmadığı saptanmıştır. Western blot sonuçları Şekil 4.1. ve 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. NSC34 hücrelerinde siRNA yöntemi ile SMN gen ifadesi baskılanması.



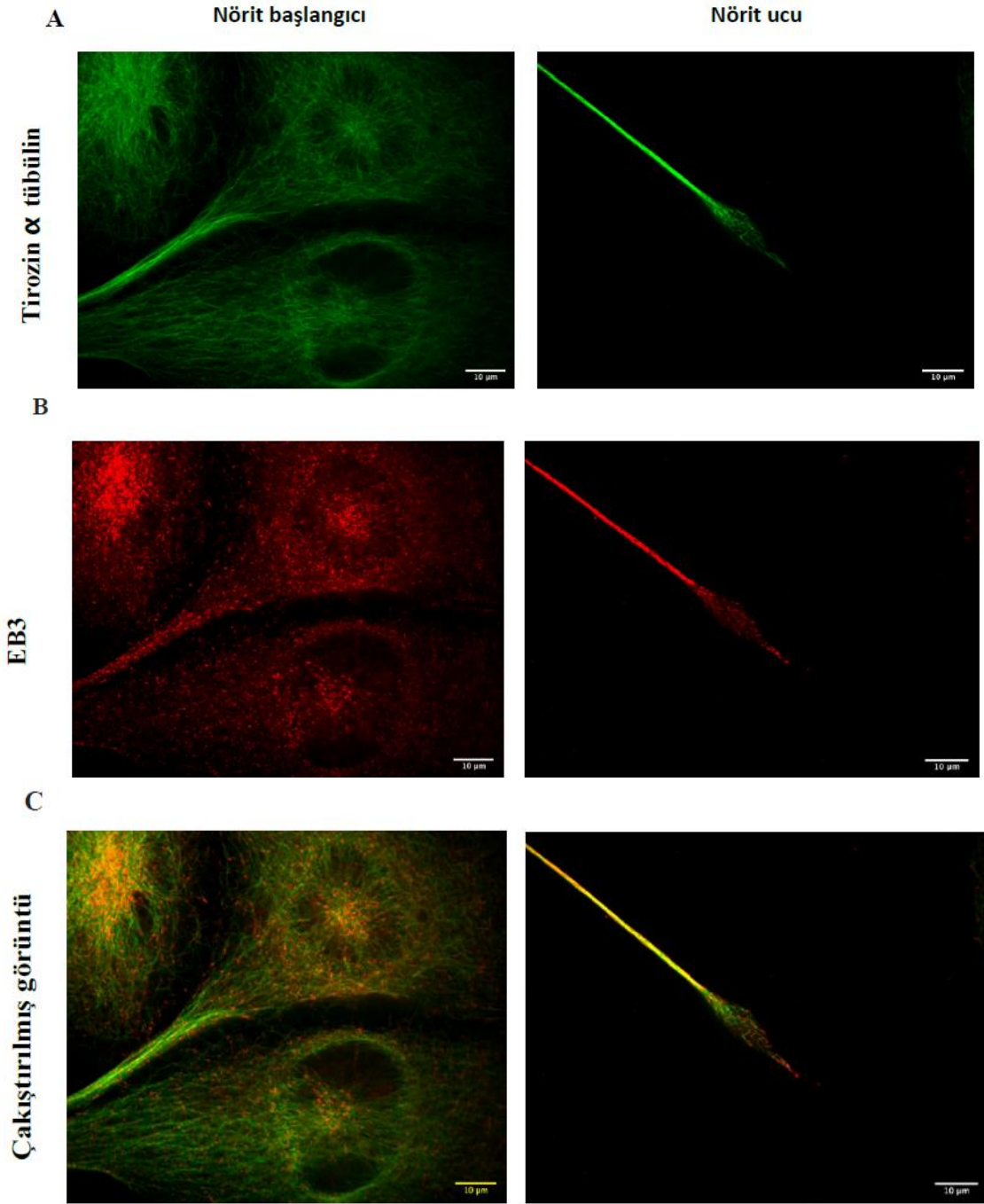
Şekil 4.2. NSC34 hücrelerinde SMN gen ifadesi baskılandığında **A)** EB3 protein miktarlarını gösteren örnek Western Blot Sonuçları n=5 biyolojik replika, *Mann-Whitney U*, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, \pm Standart hata **B)** EB1 proteininin ifadesinin olmadığını gösteren Western Blot Sonuçları

NSC34 hücrelerinde EB1 ifadesinin bulunmaması nedeniyle sonraki çalışmalarda EB3 proteini üzerine odaklanılarak yerleşim analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2. EB3 Yerleşim Analizi

SMN eksikliğinin EB3 proteinlerinin yerleşimine etkisinin araştırılması için NSC34 hücrelerinde SMN gen ifadesi siRNA ile baskılanmış ve immunfloresan boyama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. EB3 proteini ile birlikte, uzayan mikrotübüllerin görüntülenmesi amacıyla dinamik mikrotübül belirteci olan tirozin alfa tübülün eş boyamaları gerçekleştirilmiştir. Boyamalar sonrası örnekler konfokal mikroskopta yüksek büyütmede (100X) incelenmiş, nörit başlangıçları ve nörit ucundaki büyüme bölgeleri fotoğraflanmıştır. Ardından iki ayrı fotoğraf

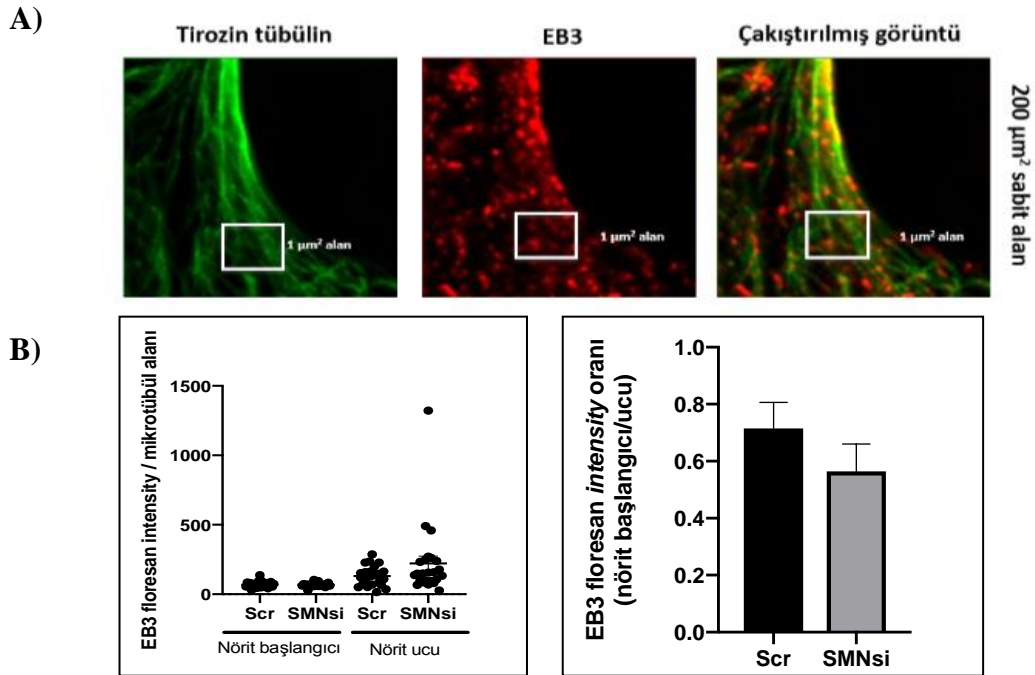
çakıştırılarak uzayan mikrotübüller üzerinde EB3 proteinlerinin yerleşim yerleri olan comet bölgeleri görüntülenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. NSC34 kontrol hücrelerinde EB3 ve Tirozin α tübülün eş boyamasına ait örnek fotoğraflar. A) Tirozin α tübülün boyaması, B) EB3 boyaması, C) EB3- Tirozin α tübülün eş boyamasına ait çakıştırılmış fotoğraflar. Bar: 10 μ m

4.2.1. Floresan Yoğunluk (*Intensity*) Analizi

Nöritlerin başlangıcında ve uç kısımlarında yerleşen EB3 proteinlerinin miktarının belirlenebilmesi amacıyla floresan yoğunluk (*intensity*) analizleri gerçekleştirilmiştir. Nörit başlangıcından ve ucundan çekilen fotoğraflar Image J analiz programına aktarılmış, her iki bölgeyi içerisine alacak şekilde $200 \mu\text{m}^2$ 'lik alan belirlenmiştir. Bu alanda EB3 proteinlerinden gelen floresan sinyalin yoğunluğu ölçülmüştür. Tirozin α tübülün boyaması sayesinde ölçüm yapılan alanda ($200 \mu\text{m}^2$) dinamik mikrotübüllerin kapladığı alan belirlenmiş ve EB3 proteinlerinden gelen sinyal mikrotübül alanına oranlanarak mikrotübülün $1 \mu\text{m}^2$ 'lik alanından gelen EB3 sinyali belirlenmiştir. SMN ifadesi baskılanan hücrelerden elde edilen sonuçlar kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bir hücreye ait nörit başlangıcından ve ucundan gelen EB3 sinyali oranlandığında da değişiklik saptanmamıştır. Sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

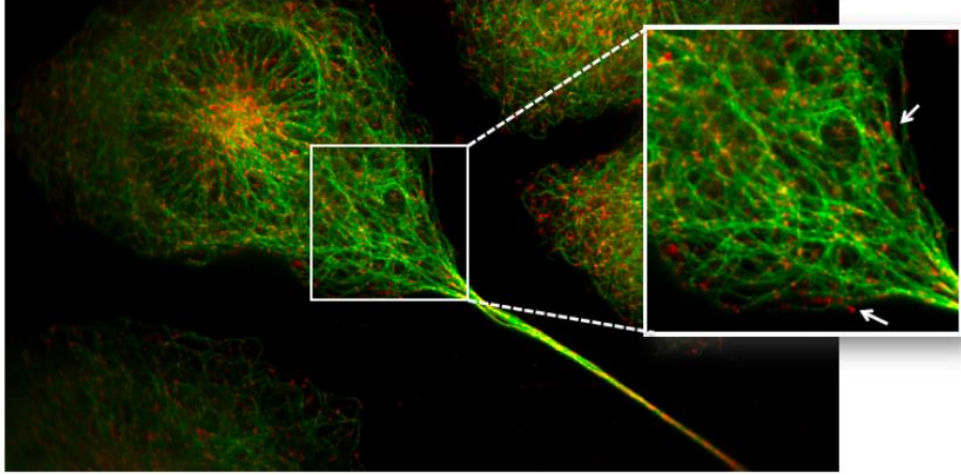


Şekil 4.4. SMN gen ifadesi baskılanan NSC34 hücrelerinde EB3 floresan *intensity* analizi sonuçları. A) Nörit başlangıcında ve nörit ucunda seçilen $200 \mu\text{m}^2$ 'lik sabit alana ait örnek fotoğraflar, B) Nörit başlangıcı ve ucundan gelen EB3 floresan sinyalinin yoğunluğu ve nörit başlangıcı/nörit ucu oranını gösteren sonuçlar. (3 biyolojik replika, n=27, unpaired t-test)

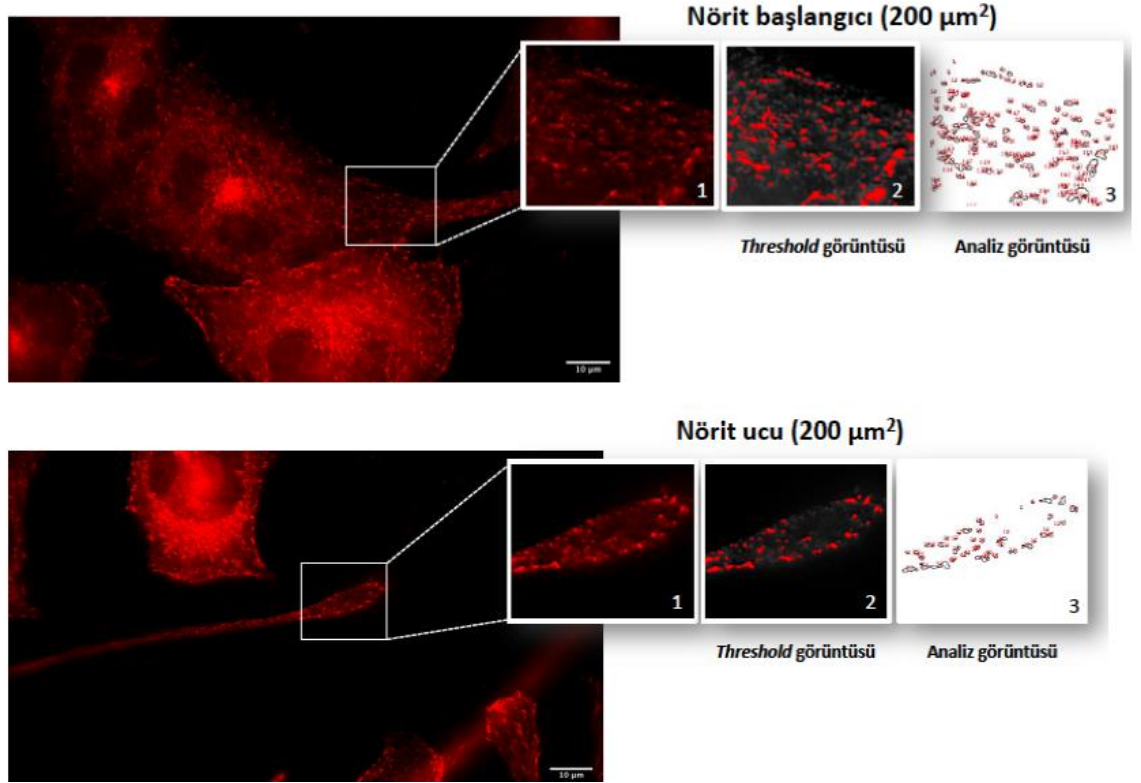
4.2.2. Komet Analizi

EB3 proteinleri dinamik mikrotübüllerin çoğunlukla pozitif uçlarında yerleşim göstermekte ve kuyruklu yıldız görüntüsünde olan bu kısımlar komet olarak adlandırılmaktadır. Komet analizleri amacıyla, 200 μm^2 'lik sabit alan içerisindeki dinamik mikrotübüllerin kapladığı alan tirozin α tübülün boyaması sayesinde belirlenmiştir. Mikrotübül üzerinde yerleşim gösteren noktasal yapıdaki kometlerin sayıları, uzunlukları ve kapladıkları alan Image J programının partikül analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler sırasında bir eşik değeri (threshold) belirlenmiş, tüm hücrelerde aynı eşik değeri kullanılmıştır. Bu sayede belirli bir piksel değerin altındaki sinyaller analize dahil edilmemiş, sadece en parlak kometler analiz edilmiştir. Komet yapıları ve analizlere ait örnek fotoğraflar Şekil 4.5'de sunulmuştur.

A

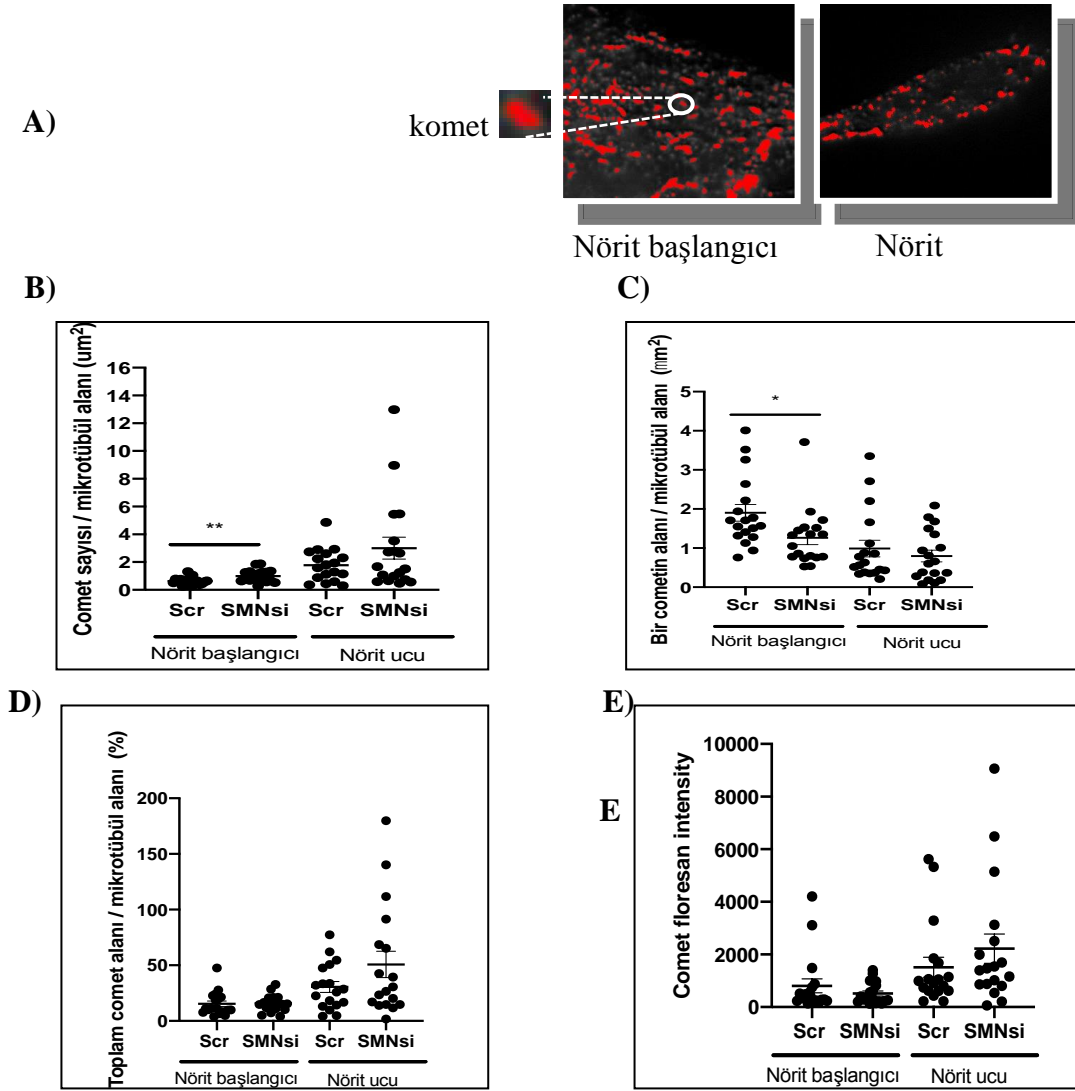


B



Şekil 4.5. NSC34 kontrol hücrelerinde EB3 proteinlerinin oluşturduğu A) komet yapılarına, B) analizlere görüntülerine ait örnek fotoğraflar. Kometler ok ile gösterilmiştir. Kırmızı: EB3, yeşil: tirozin α tübülin. Bar: 10 μ m

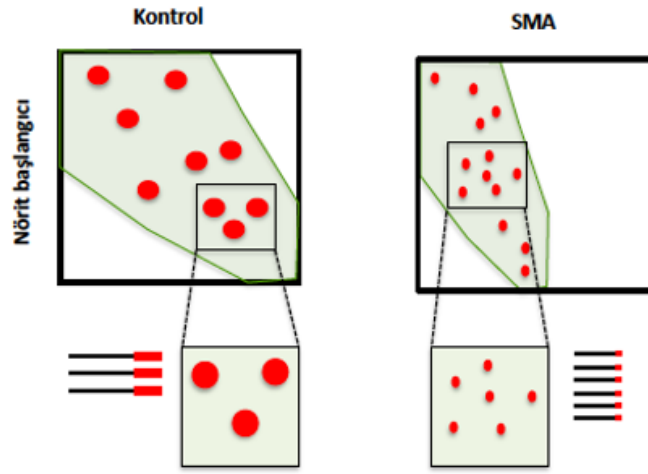
Sonuçlarımız, SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerde mikrotübül üzerinde yerleşim gösteren komet sayısının kontrol hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını, bir kometin kapladığı alanın ise azaldığını göstermiştir. Kometlerin mikrotübül üzerinde kapladığı toplam alanda ve floresan yoğunlukta ise anlamlı bir fark saptanmamıştır. Sonuçlarımız Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. SMN ifadesi baskılanan NSC34 hücrelerinde komet analizi sonuçları.

A) 200 μm^2 lik sabit alanda eşik değeri belirlenmesi sonrası kometlerin görüntüsüne ait örnek fotoğraflar. B) komet sayısı, C) bir kometin mikrotübül üzerinde kapladığı alan, D) kometlerin mikrotübül üzerinde toplam kapladıkları alan, E) kometlerin toplamından gelen floresan yoğunluğa ait sonuçlar. 3 biyolojik replika, n=18, unpaired t-test, *p<0.05, **p<0.01.

EB3 yerleşim analizinden elde ettiğimiz sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerde nörit başlangıcından ve ucundan gelen toplam (serbest ve mikrotübül üzerindeki) EB3 sinyalinin yoğunluğunun kontrol hücrelere göre değişmediği saptanmıştır. SMN ifadesi baskılandığı durumda dinamik mikrotübüllerin ucunda yerleşim gösteren komet sayılarının arttığı, boylarının ise kısaldığı saptanmıştır. Mikrotübüller üzerinde kometlerin toplamının kapladığı alanın ve kometlerin floresan yoğunluğunun ise değişmediği görülmüştür. Şekil 4.7’de komet analiz sonuçlarına ait veriler şematik olarak gösterilmiştir.

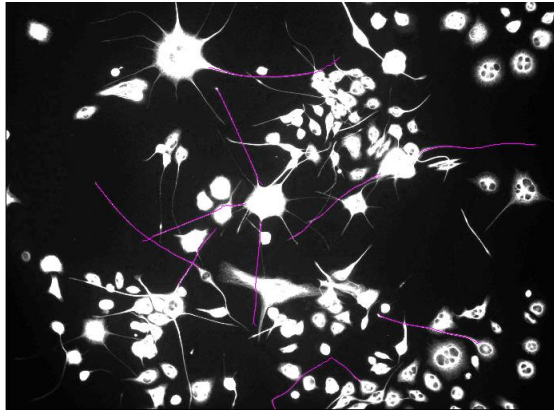


Şekil 4.7. SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerde komet analizlerinden elde edilen sonuçların şematik gösterimi. Sabit alan içerisinde dinamik mikrotübüllerin kapladığı alan yeşil ile, mikrotübülün $1 \mu\text{m}^2$ 'si başına düşen komet sayısındaki artış ve kometlerin kapladıkları alandaki azalma kırmızı ile gösterilmiştir.

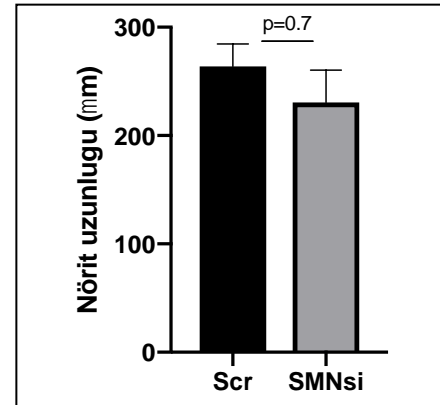
4.3. Nörit Uzunluklarının Ölçülmesi

SMN ifadesi baskılanan hücrelerde EB3 protein miktarındaki azalmanın hücrelerin nörit boylarındaki farklılıklardan dolayı olabileceği düşünülmüş, bu nedenle hücrelerin nörit boyları ölçülmüştür. Tirozin α tübülün boyaması yapılan hücreler floresan ataçmanlı *inverted* mikroskopta incelenmiş, fotoğraflanmış ve Image J programının *Neuron J plug-in*'i kullanılarak nörit boyları analiz edilmiştir. Hücre gövdesinin en az iki katı uzunluğunda olan uzantılar nörit olarak kabul edilmiştir. SMN siRNA transfekte edilen hücrelerin nörit boyları *scrambled* kontrol siRNA transfekte edilen hücreler ile karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Sonuçlar Şekil 4.8'de sunulmuştur.

A)



B)

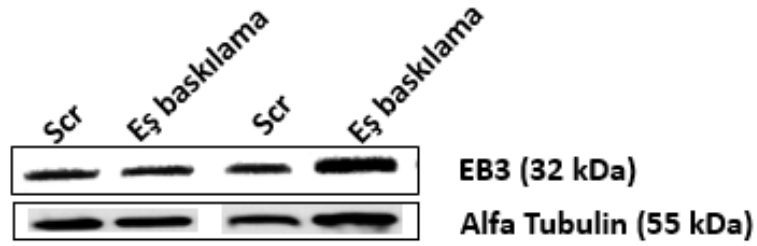


Şekil 4.8. NSC34 hücrelerinde nörit boyu analizleri. A) Nörit ölçümüne ait örnek fotoğraf, B) Nörit boyu analiz sonuçları. *Mann-Whitney U*, 3 biyolojik replika, >200/şart.

4.4. SMN ve MAP1B Gen İfadeleri Baskılanan Hücrelerde EB3 Protein

Miktar Analizi

SMN ifadesi baskılanan hücrelerde EB3 proteininde saptadığımız azalmanın MAP1B proteini ile ilişkisinin araştırılması amacıyla, SMN ile birlikte MAP1B gen ifadesi de siRNA yöntemi ile baskılanmıştır. Eş-baskılama yapılan hücrelerde EB3 protein miktarında azalma saptanmamış olup kontrol hücrelerle aynı düzeyde olduğu gösterilmiştir. (Şekil 4.9.)



Şekil 4.9. SMN ve MAP1B gen ifadeleri eş baskılanan hücrelerde EB3 protein miktarını gösteren Western Blot sonuçları.

5. TARTIŞMA

Sinir sistemi oluşturan nöronlar, özelleşmiş morfolojiye sahip hücrelerdir. Nöronlarda akzon ve dendrit yapılarının doğru şekillenmesi nöronların işlevini düzgün bir şekilde yerine getirebilmesini sağlamaktadır. Mikrotübüller akzon ve dendritlerin oluşumunda temel rol oynamakta olup bu iskelet elemanında oluşan yapısal ve işlevsel bozukluklar çok sayıda nörodejeneratif hastalık ile ilişkilendirilmektedir. Nörodejeneratif hastalıkların çoğunluğu proteinopatiler olarak adlandırılan ve yanlış protein katlanması nedeniyle agregat oluşumu gözlenen protein homeostazi hastalıklarıdır (35). Farklı etiyojilere sahip nörodejeneratif hastalıklarda bu hastalıklarla ilişkili olarak birikim gözlenen proteinlerle birlikte hücre iskelet elemanlarının da (ör; nörofilamentler ve tau) biriktiği gözlenmiştir. Ayrıca hücre iskeletinde yapısal hatalar saptanmakta, ortak olarak akzonal transport ve sinaptik iletim etkilenmektedir (35, 36). Hücre iskeleti ağındaki bozuklukların, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stres dahil olmak üzere farklı mekanizmaları indüklediği ve DNA hasar mekanizmalarını aktive ettiği düşünülmektedir. (36).

Nörodejeneratif hastalıklardan biri olan SMA'da spesifik motor nöron tutulumu görülmekte, nöron morfolojisi bozulmakta ve nöronal iletimde zayıflık meydana gelmektedir. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda nöronal hücre iskeleti üzerinde yoğunlaşmıştır. SMN proteininin hücre iskeleti elemanlarıyla ilişkisi olduğu ve eksikliğinde hücre iskeletinde bozulmalar meydana geldiği gösterilmiş, SMA'lı hayvan modellerinden kurulan primer nöron kültürlerinde ve nöron benzeri hücre hatlarında akzon uzama hataları saptanmış, profilin gibi aktine bağlanan proteinlerde ve düzenleyici sinyal yollarında da hatalar rapor edilmiştir. (12, 13, 37). SMN eksikliğinde hücre iskeletinin diğer önemli elemanı olan mikrotübüllerin depolimerizasyonunda görevli statmin proteininde ve stabilitenin sağlanmasında görevli Tau proteininde ifade veya fosforilasyon değişiklikleri gösterilmiş olmasına rağmen SMA hastalığında mikrotübül yapısı detaylı araştırılmamıştır.

Anabilim Dalı'mızda SMA hastalığının patomekanizmasının açıklanmasına yönelik olarak yaptığımız çalışmalarda, mikrotübüller üzerine odaklanılmış, *in vitro* ve *in vivo* hastalık modelleriyle yaptığımız önceki çalışmalarımızda hastalığın ciddi formunu yansıtan fare modeline ait omurilik dokularında pre- semptomatik dönemde

mikrotübül stabilitesinin kontrolünde görevli olan MAP1B protein düzeyinde artış saptanmıştır. Benzer sonuçlar SMN ifadesi siRNA ile baskılanan motor nöron benzeri NSC34 hücre hattında da gösterilmiştir. (Bora ve ark. yayımlanmamış veri)

Literatürde mikrotübül asosiye proteinlerden olan Tau ve MAP1B'nin mikrotübülün pozitif ucuna bağlanan EB1 ve EB3 proteinlerinin hücre içi yerleşimlerini değiştirdiği rapor edilmiştir (22). EB1 ve EB3 proteinleri, mikrotübülün büyüyen ucunda yerleşim gösteren ve mikrotübül uçlarında komet şekli oluşturan +TIP'lerin ana düzenleyicileridir. +TIP proteinlerini mikrotübüle bağlayarak mikrotübül uzamasında görev almaktadır. Mikrotübülün pozitif ucundaki polimerizasyon ve depolimerizasyonu kontrol ederek mikrotübül dinamiğinin sağlamaktadır. Bu nedenle, akzon uzaması, dendrit morfolojisinin oluşması ve *axon initial segment* (AIS) yapısının düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır. Nöronlarda ifade olan ve çoğunlukla akzonun distalinde yerleşim gösteren Tau proteini ile ilgili yapılan çalışmalarda, Tau proteininin EB'lere bağlanabildiği ve EB'lerin aşırı ifadesinin Tau'nun ekstraselüler ortama salgılanmasını arttırdığını göstermiştir (1, 38) Bu nedenle EB'lerin, taupatilerde Tau'nun ekstraselüler ortama salgılanmasını kontrol eden proteinler olabileceği öne sürülmüştür (38, 39). Başka bir mikrotübül asosiye protein olan MAP1B ile ilgili yapılan bir çalışmada ise MAP1B proteininin, EB1 ve EB3 proteinlerini sitoplazmada tutarak mikrotübülün pozitif ucu üzerindeki yerleşimlerini engellediği bildirilmiştir (23).

Önceki bulgularımız literatür ile birlikte değerlendirilmiş ve SMN eksikliğinde ifadesi artan MAP1B'nin EB1 ve EB3 proteinlerinin ifade ve/veya yerleşimine etki edebileceği düşünülmüştür. Literatür araştırmalarımız sonucunda, SMN proteini eksikliğinde EB1 ve EB3 proteinlerinin ifade düzeyleri ve yerleşimlerine ait herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle, MAP1B ve EB proteinleri arasındaki bağlantı araştırılmadan önce SMN eksikliğinde EB proteinlerinin ifade düzeyi ve yerleşimlerinin belirlenmesi gerektiği düşünülmüş ve bu tez çalışması gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında motor nöron benzeri fare NSC34 hücre hattında SMN gen ifadesi siRNA yöntemi ile baskılanarak *in vitro* model oluşturulmuştur. SMN ifadesi baskılanan hücrelerde EB3 protein ifadesinin % 44 oranında azaldığı saptanmıştır. Protein ifadesindeki azalmanın MAP1B proteini ile ilişkisinin araştırılması amacıyla

yapılan ek çalışmada, SMN ile birlikte MAP1B gen ifadesi de baskılanmış ve EB3 protein düzeylerinde azalma saptanmamıştır. Bu bulgularımız, SMN eksikliğinde EB3 protein miktarındaki azalmanın, MAP1B proteini ile ilişkili olabileceğine işaret etmekle birlikte ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir. EB3 protein ifadesinde saptanan azalmanın transkripsiyon hızının ve/veya protein stabilitesinin azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. EB3 proteininin, aktin bağlayıcı bir protein olan drebrin aracılığıyla aktin filamentine bağlanabildiği, bu sayede aktin-mikrotübül bağlantısında görev aldığı bildirilmiştir (40). Bu nedenle EB3 protein miktarındaki azalmanın, EB3 ile kurulan protein komplekslerini etkileyebileceği, böylece aktin-mikrotübül bağlantısında değişikliklere neden olabileceği düşünülmüştür. Diğer bir +TIP proteini olan EB1'in farklı nöroblastoma hücrelerinde ifade olduğu bildirilmiş olmasına karşın, NSC34 hücreleri ile yaptığımız çalışmalarda endojen ifadesinin olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmalara EB3 proteini ile devam edilmiş, SMN eksikliğinde EB3 proteinlerinin nörit başlangıcındaki ve ucundaki yerleşimlerini araştırmak üzere kantitatif mikroskopik analizler gerçekleştirilmiştir. SMN eksikliğinde nörit başlangıcında komet sayısında kontrol hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış, bir kometin mikrotübül üzerinde kapladığı alanda ise azalma saptanmıştır. Kometlerin kapladığı toplam alanda, komet floresan yoğunluğunda ve toplam (serbest ve mikrotübül ile ilişkili) EB3 floresan yoğunluğunda bir değişiklik saptanmamıştır.

SMN eksikliğinde komet sayısında nörit başlangıcında yani MTOC bölgesine yakın bölgede saptadığımız artış, uzayan mikrotübüllerin fazlalığına işaret etmektedir. Ancak komet sayısında artış saptanmasına rağmen mikrotübül ucunda yeterli EB3 birikimi olmamakta ve komet alanı küçük kalmaktadır. Bu bulgularımız, SMN eksikliğinde mikrotübül ucunun hiperdinamik olduğuna işaret etmektedir. SMN eksikliğinde MAP1B proteininin artmış olduğunu önceki çalışmalarımızda göstermiş olmamız, MAP1B'nin EB3'ü tutarak mikrotübül ucuna bağlanmasını engellediğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasından elde ettiğimiz bulgular, tez önerisindeki hipotezimizi destekler niteliktedir.

Bu tez çalışması ile SMA patomekanizmasına EB3 proteinin katkısı ilk kez araştırılmış olup elde edilen sonuçların, SMN eksikliğinde mikrotübüllerin hiperdinamik yapıda olduklarına dair önceki bulgularımız ile uyumlu olduğu görülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Motor nöron benzeri NSC34 hücrelerinde SMN gen ifadesi siRNA yöntemi ile baskılanmıştır. Western blot çalışmaları sonucunda SMN gen ifadesinin %86 oranında baskılandığı gösterilmiştir.
- SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerde EB3 protein miktarı Western blot yöntemi ile araştırılmış ve kontrol hücrelere göre protein miktarının %44 oranında azaldığı saptanmıştır.
- NSC34 hücrelerinde endojen olarak EB1 protein ifadesi bulunmadığı gösterilmiştir.
- EB3 proteinlerinin nöritlerin başlangıcında ve uç kısımlarındaki yerleşim değişikliğinin incelenmesi amacıyla floresan yoğunluk (intensity) analizleri gerçekleştirilmiştir. SMN ifadesi baskılanan hücreler kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında, toplam (serbest ve mikrotübül üzerindeki) EB3 proteinlerinden gelen floresan sinyalin yoğunluğunda anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.
- EB3 proteinlerinin dinamik mikrotübüllerin ucunda yerleştikleri ve komet olarak adlandırılan bölgeler analiz edilmiştir. Analizlerde dinamik mikrotübüllerin kapladığı alanlar tirozin α tübülün boyamaları ile belirlenmiş, mikrotübül alanına düşen kometlerin sayısı, alanı ve floresan yoğunluğu (intensity) ölçülmüştür. SMN gen ifadesi baskılanan hücrelerde mikrotübül üzerinde yerleşim gösteren komet sayısının kontrol hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. Bir kometin kapladığı alanın ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını gösterilmiştir. Kometlerin toplamının mikrotübül üzerinde kapladığı alanın ve bu alandan gelen floresan yoğunluğun ise değişmediği saptanmıştır.
- Tez önerisinde yer almayan ek çalışmalar gerçekleştirilerek, NSC34 hücrelerinde SMN eksikliğinde EB3 proteininde saptanan azalmanın nedenleri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda:
 - SMN ifadesindeki baskılanmanın hücrelerin nörit boylarında kısaltmaya neden olabileceği ve EB3 miktarının bu nedenle azalmış

olabileceği düşünülerek nörit boyu analizleri gerçekleştirilmiş, kontrol hücrelere göre anlamlı bir fark saptanmamıştır. EB3 protein miktarındaki azalma hücrelerin nörit boyları ile ilişkili bulunmamıştır.

-SMN eksikliğinde azalan EB3 protein miktarının, daha önceki çalışmalarda ifade artışı saptadığımız MAP1B proteini ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla SMN ile birlikte MAP1B gen ifadesi de baskılanmış, eş-baskılama yapılan hücrelerde EB3 protein miktarının kontrol hücrelerdeki seviyesine geri döndüğü gösterilmiştir. Sonuçlarımız, EB3 protein ifadesindeki azalmanın SMN eksikliğinde ifadesi artan MAP1B proteini ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

6.2. Öneriler

- SMN ifadesi baskılanan hücrelerde EB3 protein miktarında saptadığımız azalmanın moleküler mekanizmasının açıklanabilmesi amacıyla EB3 gen ifadesinin RNA düzeyinde incelenmesi, böylece ifade değişikliğinin transkripsiyonel olup olmadığının araştırılması önerimizdir. RNA düzeyinde fark saptanmaması durumunda protein stabilitesindeki değişikliklerin araştırılması yoluna gidilebilir.
- EB3 protein miktarındaki azalmanın EB3 ile bağlanan diğer pozitif uç proteinlerine ve mikrotübülün EB3 ile ilişkili olan fonksiyonları üzerine etkileri araştırılabilir.
- NSC34 hücre hattından elde edilen sonuçların, kültür ortamında daha uzun süreli olarak farklılaştırılabilen başka bir nöron benzeri hücre hattında (örneğin PC12) gösterilmesi, protein ifadesindeki azalmanın nörit boyları üzerindeki etkilerinin incelenmesi açısından katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Nehlig A, Molina A, Rodrigues-Ferreira S, Honoré S, Nahmias C. Regulation of end-binding protein EB1 in the control of microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(13):2381-93.
2. Kiselyov AS, Gurney ME. Spinal Muscular Atrophy: Current Therapeutic Strategies. *Neurodegenerative Diseases: Springer*; 2010. p. 177-91.
3. Ogino S, Wilson RB. Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*. 2004;4(1):15-29.
4. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human mutation*. 2000;15(3):228-37.
5. Matera AG, Frey MR. Coiled bodies and gems: Janus or gemini? *American journal of human genetics*. 1998;63(2):317.
6. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Violette L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-65.
7. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Human molecular genetics*. 1999;8(7):1177-83.
8. Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Violette L, Cruaud C, et al. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics*. 1996;32(3):479-82.
9. Monani UR, McPherson JD, Burghes AH. Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1999;1445(3):330-6.
10. Awano T, Kim J-K, Monani UR. Spinal muscular atrophy: journeying from bench to bedside. *Neurotherapeutics*. 2014;11(4):786-95.
11. Hensel N, Stockbrügger I, Rademacher S, Broughton N, Brinkmann H, Grothe C, et al. Bilateral crosstalk of rho-and extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) pathways is confined to an unidirectional mode in spinal muscular atrophy (SMA). *Cellular signalling*. 2014;26(3):540-8.
12. Oprea GE, Kröber S, McWhorter ML, Rossoll W, Müller S, Krawczak M, et al. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science*. 2008;320(5875):524-7.
13. Bowerman M, Shafey D, Kothary R. Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2007;32(2):120-31.
14. Dogterom M, Koenderink GH. Actin–microtubule crosstalk in cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018:1.

15. Zamoner A, Pessoa-Pureur R. Intermediate filaments as a target of signaling mechanisms in neurotoxicity. *Cytoskeleton-Structure, Dynamics, Function and Disease*: IntechOpen; 2017.
16. Goodson HV, Jonasson EM. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2018;10(6):a022608.
17. Conde C, Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(5):319.
18. Mustyatsa VV, Boyakhchyan AV, Ataulakhanov FI, Gudimchuk NB. EB-Family Proteins: Functions and Microtubule Interaction Mechanisms. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(7):791-802.
19. Galjart N. Plus-End-Tracking Proteins and Their Review Interactions at Microtubule Ends. *Curr Biol*. 2010;20(12):R528-R37.
20. Lasser M, Tiber J, Lowery LA. The role of the microtubule cytoskeleton in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2018;12:165.
21. Sayas C, Avila J. Regulation of EB1/3 proteins by classical MAPs in neurons. *Bioarchitecture*. 2014;4(1):1-5.
22. Sayas CL, Tortosa E, Bollati F, Ramírez-Ríos S, Arnal I, Avila J. Tau regulates the localization and function of End-binding proteins 1 and 3 in developing neuronal cells. *Journal of neurochemistry*. 2015;133(5):653-67.
23. Tortosa E, Galjart N, Avila J, Sayas CL. MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *The EMBO journal*. 2013;32(9):1293-306.
24. Maurer SP, Fourniol FJ, Bohner G, Moores CA, Surrey T. EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell*. 2012;149(2):371-82.
25. Noordstra I, Akhmanova A. Linking cortical microtubule attachment and exocytosis. *F1000Research*. 2017;6.
26. Tortosa E, Galjart N, Avila J, Sayas CL. MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *EMBO J*. 2013;32(9):1293-306.
27. Martin M, Akhmanova A. Coming into focus: mechanisms of microtubule minus-end organization. *Trends in cell biology*. 2018;28(7):574-88.
28. Yang C, Wu J, de Heus C, Grigoriev I, Liv N, Yao Y, et al. EB1 and EB3 regulate microtubule minus end organization and Golgi morphology. *J Cell Biol*. 2017;216(10):3179-98.
29. Akhmanova A, Steinmetz MO. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(12):711.
30. Goldspink DA, Gadsby JR, Bellett G, Keynton J, Tyrrell BJ, Lund EK, et al. The microtubule end-binding protein EB2 is a central regulator of microtubule reorganisation in apico-basal epithelial differentiation. *J Cell Sci*. 2013;126(17):4000-14.

31. Kapitein LC, Yau KW, Gouveia SM, van der Zwan WA, Wulf PS, Keijzer N, et al. NMDA receptor activation suppresses microtubule growth and spine entry. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(22):8194-209.
32. Chen Y, Wang P, Slep KC. Mapping multivalency in the CLIP-170–EB1 microtubule plus-end complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(3):918-31.
33. Maiato H, Girao H, Okada N, Figueiredo A, Garcia Z, Moutinho-Santos T, et al. CLASP2 lattice-binding near microtubule plus ends stabilizes kinetochore attachments. 2019.
34. Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, Shaw IT, et al. Neuroblastoma× spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Developmental dynamics*. 1992;194(3):209-21.
35. Didonna A, Opal P. The role of neurofilament aggregation in neurodegeneration: lessons from rare inherited neurological disorders. *Molecular neurodegeneration*. 2019;14(1):19.
36. McMurray C. *Neurodegeneration: diseases of the cytoskeleton?* : Nature Publishing Group; 2000.
37. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning A-K, Karle K, Monani UR, et al. Smn, the spinal muscular atrophy–determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *The Journal of cell biology*. 2003;163(4):801-12.
38. Sayas CL, Medina M, Cuadros R, Ollá I, García E, Pérez M, et al. Role of tau N-terminal motif in the secretion of human tau by end binding proteins. *PloS one*. 2019;14(1):e0210864.
39. Gozes I, Ivashko-Pachima Y, Sayas CL. ADNP, a Microtubule Interacting Protein, Provides Neuroprotection Through End Binding Proteins and Tau: An Amplifier Effect. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;11.
40. Zhao B. *The Role of Centrosomal Microtubules in F-actin Dynamics during Neuronal Polarization*. 2019.

8. EKLER

8.1. EK-1 Tez Çalışması için Gerekli Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 84

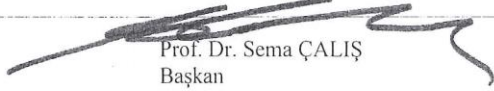
10.07.2018

Prof. Dr. Hayat Erdem YURTER
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Prof. Dr. YURTER,

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz 18.06.2018 tarihli dilekçeniz ile danışmanı olduğunuz öğrenciniz Dila KOYUNOĞLU'nun "*SMN Eksikliğinin Mikrotübül Pozitif Uç Proteinleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması*" isimli yüksek lisans tez projesinde NSC34 hücre hattının tedarikçi bir firmadan satın alınacağı ve bu amaçla canlı omurgalı bir hayvan kullanılmayacağı anlaşılmaktadır. Hücre Kültürü Deneyleri, eğer canlı omurgalı hayvan kullanımını içermiyorsa, Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik kapsamı dışında kalmakta ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı gerektirmemektedir.

Bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Başkan

EK :
Toplantı Katılım Tutanağı

8.2. EK-2 Orjinallik Raporu

Survival Motor Nöron Proteini Eksikliğinin Mikrotübül Pozitif Uç Proteinleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması


ORJINALLIK RAPORU

%5	%3	%2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
2	Gamze BORA, Dila KOYUNOĞLU, Merve SUNGUROĞLU. "Microtubule Structure, Organization and Defects: Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis", Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 2019 Yayın	%1
3	tbgder.org İnternet Kaynağı	%1
4	"10th Congress of International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (ISSAID)", Pediatric Rheumatology, 2019 Yayın	<%1
5	www.oncotarget.com İnternet Kaynağı	<%1
6	cms.galenos.com.tr	

8.3. EK-3 Dijital Makbuz




Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Dila KOYUNOĞLU
Ödev başlığı:	Revision 3
Gönderi Başlığı:	Survival Motor Nöron Proteinini Eksik...
Dosya adı:	06.08.2019 T kontrol 1.docx
Dosya boyutu:	7.49M
Sayfa sayısı:	54
Kelime sayısı:	8,236
Karakter sayısı:	58,544
Gönderim Tarihi:	06-Ağu-2019 01:07PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1158053501



Copyright 2019 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ

Dila KOYUNOĞLU

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yılı : 1993
Doğum Yeri : Malatya
Sabit Telefon : 0312 305 25 41
Faks : 0312 309 60 60
Cep Telefonu : 05070339194
E-Posta Adresi : dilasare21@gmail.com
 dila.koyunoglu12@hacettepe.edu.tr
Posta Adresi : Hacettepe Üniversitesi Sıhhiye Kampüsü Tıp Fakültesi Binası
 Tıbbi Biyoloji AD. A Kapısı 7. Kat Altındağ/Ankara

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD, 2017-2019
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2012-2016

MESLEKİ VE İDARİ DENEYİM

Yaz Stajı, Hacettepe Üniversitesi, Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji AD, 2015

GÖREV ALINAN PROJELER

- Survival Motor Nöron Protein Eksikliğinin Mikrotübül Pozitif Uç Proteinleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Yüksek lisans tez projesi, Proje No: TYL-2018-17434 (2018-devam ediyor). *Yardımcı araştırmacı (Proje yürütücüsü: Prof. Dr. Hayat Yurter)*

- Spinal Müsküler Atrofi Hastalığında Saptanan MAP1B Regülasyon Bozukluğunun Moleküler Mekanizmasının ve Fonksiyonel Sonuçlarının Araştırılması. TÜBİTAK 3001 Ar-Ge Başlangıç Projesi, Proje No: 216S770 (2017-2019). *Bursiyer. (Proje yürütücüsü: Dr. Öğr. Üyesi Gamze Bora)*

YAYIN

- Bora G, Koyunoğlu D, Sunguroğlu M, Erdem-Yurter H. Mikrotübül Yapı, Organizasyon ve Hataları: Spinal Müsküler Atrofi ve Amyotrofik Lateral Skleroz. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 2019; 39(2):221-30, doi: 10.5336/medsci.2018-63881 (Derleme).

BİLDİRİLER

- Bora G*, Hensel N, Rademacher S, Koyunoğlu D, Sunguroğlu M, Aksu-Mengeş E, Balci-Hayta B, Claus P, Erdem-Yurter. MAP1B upregulation and its involvement of microtubule stability in spinal muscular atrophy. 44th FEBS conference, 6-11 July 2019, Krakow, Poland (*Sözlü bildiri, sunan yazar)
- Koyunoğlu D*, Bora G, Erdem-Yurter H. Microtubule Plus End Binding 3 Protein Alterations in Spinal Muscular Atrophy Model. International Molecular Medicine Symposium by the Bosphorus, İstanbul, 16-18 Mayıs 2019 (*Poster, sunan yazar)
- Bora G*, Koyunoğlu D, Sunguroğlu M, Erdem-Yurter H. MAP1B causes alterations in alpha tubulin detyrosination and microtubule stability in Spinal Muscular Atrophy. International Molecular Medicine Symposium by the Bosphorus, İstanbul, 16-18 Mayıs 2019 (*Sözlü bildiri, sunan yazar)
- Bora G*, Koyunoğlu D, Erdem-Yurter H Contribution of altered microtubule-regulatory proteins to SMA pathomechanisms. Balkan Journal of Medical Genetics, 13th Balkan Human Genetics Conference, 17-20 Nisan 2019, Edirne (*Sözlü bildiri, sunan yazar)

- Bora G*, Rademacher S, Hensel N, Koyunoğlu D, Sunguroğlu M, Aksu E, Hayta B, Claus P, Erdem-Yurter H. Low SMN Level Causes Alterations in Alpha Tubulin Detyrosination and Microtubule-associated protein 1B in Spinal Muscular Atrophy. FEBS Advanced Lecture Course and 33rd European Cytoskeletal Forum Meeting on “Biology and pathology of cytoskeleton: the crossroads of three cytoskeletal systems. 20-24 Eylül 2018, Prague, Czeck Republic (*Poster, sunan yazar)
- Bora G*, Rademacher S, Hensel N, Koyunoğlu D, Sunguroğlu M, Claus P, Erdem-Yurter H. SMN Deficiency Causes Upregulation of Microtubule Associated Protein 1B (MAP1) in Models of Spinal Muscular Atrophy (SMA). 13th Meeting of the Mediterranean Society of Myology and 2nd Congress of Turkish Neuromuscular Society, 27-29 Haziran 2018, Cappodocia, Nevşehir (*Sözlü bildiri, sunan yazar)