

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

**LİZOMAL DEPO HASTALIĞI OLAN GAUCHER  
HASTALIĞINDA OTOFAJİ MEKANİZMASININ MOLEKÜLER  
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

**MELTEM TEMEL**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2013**



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

**LİZOMAL DEPO HASTALIĞI OLAN GAUCHER  
HASTALIĞINDA OTOFAJİ MEKANİZMASININ MOLEKÜLER  
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

**MELTEM TEMEL**

**Tıbbi Biyoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Serap Dökmeci**

**ANKARA  
2013**

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Program: Yüksek lisans

Tez Başlığı: Lizozomal Depo Hastalığı Olan Gaucher Hastalığında Otofaji Mekanizmasının Moleküler Düzeyde İncelenmesi

Öğrenci Adı-Soyadı: Meltem TEMEL

Savunma Sınavı Tarihi: 15.05.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hayat YURTER  
Hacettepe Üniversitesi




Danışman: Prof. Dr. Serap DÖKMECİ  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Engin YILMAZ  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Asuman ÖZKARA  
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Y. Çetin KOCAEFE  
Hacettepe Üniversitesi



ONAY

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



Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başından itibaren her konuda yardımları ve desteği ile bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, bilimsel ve akademik olarak yol gösterici olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Serap DÖKMECİ'ye, laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Sayın Uzm. Dr. Ayşe YÜZBAŞIOĞLU'na, hücre kültürü çalışmalarını gerçekleştiren Parisa SHARAFI'ye, deneysel sürecin bir kısmının Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik Programı'nda gerçekleştirmemi sağlayan Sayın Doç. Dr. Devrim GÖZÜAÇIK'a ve Sayın Dr. Özlem ORAL'a, temel bileşen analizi yöntemi ile veri setinin istatistiksel analizini gerçekleştiren Sayın Doç. Dr. Y. Çetin KOCAEFE'ye, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Gaucher hastalarına klinik tanı koyan ve hastalardan hücre temin etmemi sağlayan Sayın Prof. Dr. Aysel Yüce'ye, eğitimim boyunca çok değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, her türlü destek ile her zaman yanımda olan, moral kaynağım biricik anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

## ÖZET

**Temel, M. Lizozomal depo hastalığı olan Gaucher hastalığında otofaji mekanizmasının moleküler düzeyde incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013.** Lizozomlar, hücrenin en önemli yıkım organelleridir. Lizozomların fonksiyonları, lizozomal hidrolazlar ve lizozom zarında bulunan lizozomal zar proteinlerinin uyumlu çalışmasına bağlıdır. Bu proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların lizozom işlevlerini bozarak, hücre içinde substratların birikmesine ve LDH'ye neden olduğu belirlenmiştir. Hücresel temel yıkım mekanizması olan otofajide yıkım lizozomlarda gerçekleşmektedir. LDH; lizozomlarda biriken substratlar ile lizozom- otofagozom füzyonunun bozulması ve otofajik akışın bloke olması etkindir. Gaucher hastalığı, lizozomal zar glikoprotein olan glikoserebrosidaz geninde meydana gelen mutasyon ya da bu enzimin kofaktörü olan Sapozin C'nin mutasyonu sonucunda hücre içinde glikozilseramid ve diğer glikolipidlerin birikmesiyle ortaya çıkan bir LDH'dir. Farklı genotipik özellik gösteren altı Gaucher hastasında, otofajik vezikül çekirdeklenme aşamasında rol oynayan Beklin-1 ile kese uzaması ve kapanmasında rol oynayan ATG3, ATG5, ATG12, ATG4C, LC3 ve GABARAP gen ifadeleri normal ve açlık koşullarında fibroblast hücrelerinde nicel gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiştir. İncelenen otofaji gen ifadelerinin kontrol fibroblast hücrelerinde açlığın oluşturulmadığı koşullar ile karşılaştırıldığında, açlık durumuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. Hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda elde edilen nicel analiz sonuçları, Gaucher hastalarında otofaji yolağının değiştiğini göstermiştir. Özellikle ATG4C ve ATG5 gen ifadeleri tüm hastalarda azalmıştır. TBA'dan elde edilen korelasyon matrisi ile GAPDH gen ifadesine kıyasla Beklin-1, ATG5, ATG4C ve ATG3 genlerindeki varyasyonların birbirleriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum otofajik veziküllerin çekirdeklenmesi ve izolasyon membranının uzaması aşamalarında rol alan genlerin ifadelerinde, yüksek oranda korelasyon olduğunu göstermektedir. Gaucher hastalarında, otofaji mekanizmasının lipid konjugasyonu sürecinde inhibisyon olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glikoserebrosidaz, Sapozin C, nicel analiz.

## ABSTRACT

**Temel M. Analysis of Autophagy Mechanism in Gaucher's Disease, the Lysosomal Storage Disease on Molecular Level. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Department of Medical Biology, MA Thesis, Ankara 2013**

Lysosomes are the most important degradation organelles of the cell. The functions of the lysosomes depend upon the harmonious coordination between the lysosomal hydrolases and the lysosomal membrane proteins existing in the membrane around the lysosome. It is found that mutations that occur within the protein coding region of genes disrupt lysosome function, cause accumulation of substrates in the cell, and LSD. The lysosomal degradation occurs in autophagy, the basic cellular degradation mechanism. Substrate accumulation in lysosomes, dysfunction of lysosome and autophagosome fusion, and blocking of autophagic flux are the factors of LSD. Gaucher's disease is a LSD that occurs due to accumulation of glucosylceramid and other glycolipids in the cell as a result of mutation occurring in lysosomal membrane glycoprotein glycosylceramidase gene, or mutation of the cofactor of this enzyme Sapozin C. In six Gaucher patients which show different genotypic features, Beclin-1, which plays role in nucleation stage of autophagic vesicles, and ATG3, ATG5, ATG12, ATG4C, LC3, GABARAP, functional in elongation and closure of vesicles; gene expressions are analyzed in non-starvation and starvation conditions by using quantitative RT-PCR. At the control fibroblast cells, examined autophagy gene expressions increased more than starvation conditions. In non-starvation conditions quantitative analysis results showed autophagy pathway has changed in Gaucher patients. Especially ATG4C and ATG5 gene expression decreased in all patients. Correlation matrix of PCA obtained from the GAPDH gene expression compared with the Beclin-1, ATG5, ATG3 and ATG4C variations in genes have been identified to be associated with each other. This results shows high correlation between with autophagic vesicles nucleation and membrane isolation elongation phases of the genes involved in the statements. It is thought that lipid conjugation stage of autophagy mechanism is inhibited in Gaucher patients.

**Key Words:** Glucosylceramidase, Sapozin C, quantitative analysis.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lizozomların Yapı ve Görevleri	3
2.2. Otofaji	5
2.2.1. Atg1 (ULK1/2)-ATG13-ATG17 Kinaz Kompleksi	10
2.2.2. Sınıf III PI3K Kompleksi	10
2.2.3. ATG12 Konjugasyon Sistemi	11
2.2.4. LC3-PE Konjugasyon Sistemi	11
2.3. Otofajinin Fizyolojik Görevleri	13
2.4. Lizozomal Depo Hastalıkları ve Otofaji	14
2.5. Gaucher Hastalığı (GH) ve Otofaji	16
2.6. Nicel Gerçek Zamanlı ( <i>Quantitative Real Time</i> ) Polimeraz Zincir Reaksiyonu	21
2.7. <i>Housekeeping</i> Genlerin Nicel Gerçek Zamanlı-PZR Çalışmalarındaki Önemi	25



2.8.	Temel Bileşen Analizi-TBA ( <i>Principle Component Analysis-PCA</i> )	
	Yöntemi	26
2.9.	Amaç	26
3.	BİREYLER VE YÖNTEM	28
3.1.	Bireyler	28
3.2.	Çalışmada Kullanılan Malzemeler	29
3.2.1.	RNA İzolasyonu	29
3.2.2.	cDNA Sentezi	29
3.2.3.	Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	30
3.2.4.	Agaroz Jel Elektroforezi	30
3.3.	Yöntemler	30
3.3.1.	RNA İzolasyonu	30
3.3.2.	cDNA Sentezi	31
3.3.3.	Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
3.3.4.	Verilerin Değerlendirilmesi	34
4.	BULGULAR	35
4.1.	RNA İzolasyonu	35
4.2.	Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( <i>Real-Time PCR</i> )	36
4.2.1.	GAPDH Gen İfadesi Bulguları	36
4.2.2.	ATG4C Gen İfadesi Bulguları	37
4.2.3.	ATG12 Gen İfadesi Bulguları	38
4.2.4.	Beklin-1 Gen İfadesi Bulguları	40
4.2.5.	GABARAP Gen İfadesi Bulguları	42
4.2.6.	ATG3 Gen İfadesi Bulguları	44
4.2.7.	ATG5 Gen İfadesi Bulguları	46

4.2.8. LC3 Gen İfadesi Bulguları	48
4.3. TBA ile Nicel Gen İfadesi Analizleri	49
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	63
EKLER	73
EK 1. Gaucher hastalarında otofaji gen ifadelerinin nicel analizi	
EK 2. GAPDH gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi	
EK 3. ATG4C gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi	
EK 4. ATG12 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi	
EK 5. Beklin-1 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi	
EK 6. GABARAP gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi	
EK 7. ATG3 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi	
EK 8. ATG5 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi	
EK 9. LC3 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi	
EK 10. Otofaji gen ifadelerinin normal ve açlık koşullarında kontrol fibroblast hücrelerindeki değişimi	
EK 11. Otofaji gen ifadelerinin GH1 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi	
EK 12. Otofaji gen ifadelerinin GH2 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi	
EK 13. Otofaji gen ifadelerinin GH3 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi	
EK 14. Otofaji gen ifadelerinin GH4 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi	
EK 15. Otofaji gen ifadelerinin GH5 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi	
EK 16. Otofaji gen ifadelerinin GH6 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi	

EK 17. Normal koşullarda otofaji gen ifadelerinin kontrol fibroblasta kıyasla Gaucher hastalarındaki değişimi

EK 18. Normal koşullarda otofaji gen ifadelerinin kontrol fibroblasta kıyasla değişimi

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrat derece
A	:	Absorbans
Akt	:	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AMP kinaz	:	Adenozin monofosfat kinaz
ATG /Atg	:	<i>Autophagy-related proteins</i>
ATP	:	Adenozin trifosfat
ATPaz	:	Adenozin trifosfataz
Bcl-2	:	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
Bç	:	Baz çifti
CD63	:	Tetraspanin
cDNA	:	Komplementer DNA
CO <sub>2</sub>	:	Karbondioksit
Ct	:	<i>Threshold cycle</i> (eşik döngü değeri)
DAPK	:	<i>Death associated protein kinase</i>
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
DEPTOR	:	<i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>
DFCP1	:	İki FYVE- içeren protein 1
DHC	:	Diheksosilseramid
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
ER	:	Endoplazmik retikulum
FIP200	:	200kDa fokal adhezyon kinaz bağlantı proteini
FYVE	:	Fenilalanin-Tirozin-Valin-Glutamik asit içeren aminasit dizisi

GAA	:	Asit alfa- glukosidaz
GABARAP	:	$\gamma$ -aminobütirik tip A [GABA <sub>A</sub> ] reseptörü ile ilişkili protein
GADPH	:	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GAG	:	Glikozaminoglikan
GBA	:	Glukoserebrosidaz geni
GC	:	Glukozilseramid
GCaz	:	Glukoserebrosidaz enzimi
GFP	:	<i>Green fluorescent protein</i>
GH	:	Gaucher Hastalığı
GH1	:	1 no'lu Gaucher Hastası
GH2	:	2 no'lu Gaucher Hastası
GH3	:	3 no'lu Gaucher Hastası
GH4	:	4 no'lu Gaucher Hastası
GH5	:	5 no'lu Gaucher Hastası
GH6	:	6 no'lu Gaucher Hastası
GlcCerez	:	Glikoserebrozidaz enzimi
GS	:	Glikozilsfingozinin
GSL	:	Glikosfingolipid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksit
HIF	:	Hipoksi ile indüklenebilir faktör
Hsc-70	:	<i>Heat shock protein 70</i>
JNK1	:	<i>c-Jun N-terminal kinaz 1</i>
K1	:	Kontrol 1
K2	:	Kontrol 2
K3	:	Kontrol 3

KFERQ	:	Lizin-Fenilalanin-Glutamik asit-Arjinin-Glutamin amino asit dizisi
kg	:	Kilogram
LAMP	:	Lizozom ile ilişkili zar proteini
LC3	:	Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zinciri 3
LDH	:	Lizozomal Depo Hastalığı
LIMP2	:	Lizozoma-bütünleşmiş zar proteini 2
LMP	:	Lizozomal zar proteinleri
M	:	Molar
mg	:	Miligram
MHC	:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	:	Mililitre
mLST8	:	<i>mTOR associated protein, LST8 homolog</i>
mM	:	Milimolar
MPSIIIA	:	Tip IIIA Mukopolisakkoridozis
mRNA	:	Mesajcı RNA
MSD	:	Çoklu Sülfataz Eksikliği
mTORC	:	Memeli Rapamisin Hedefi Kompleksi
mTORC1	:	Memeli mTOR Protein Kompleksi
NAD(P)H	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NCL	:	Nöronal Seroid- Lipofuskinosis
ng	:	nano gram
NPA	:	Nieman Pick Tip A
NPB	:	Nieman Pick Tip B
NPC	:	Nieman Pick Tip C
NPC1	:	Niemann-Pick C1

NSL	:	Neuronal seroid-lipofuskinosis
PAS	:	<i>Preautophagosomal Structure</i>
PCA	:	<i>Principal component analysis</i>
PCR	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	:	Fosfotidiletanolamin
PG	:	Fosfotidilgliserol
pH	:	<i>Power of hydrogen</i>
PI	:	Fosfotidilinositol
PI3K	:	Fosfotidilinositol 3-Kinaz
PI3P	:	Fosfotidilinositol 3-Fosfat
PK	:	Fosfotidilkolin
PRAS40	:	<i>AKT1 substrate 1 (proline-rich)</i>
PSAP	:	Prosapozin
PTEN	:	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rab7	:	<i>Ras-related protein</i>
Raptor	:	<i>Regulatory Associated Protein of mTOR</i>
Ras	:	<i>Resistance to Audiogenic Seizures</i>
RNA	:	Ribonükleik asit
RNaz	:	Ribonükleaz
rpm	:	<i>Revolutions per minute</i>
Sap C	:	Sapozin C
SCARB2	:	<i>Scavenger Receptor Class B, Member 2</i>
Ser/Thr	:	<i>Kinaz Serin/Theronine Kinase</i>
SM	:	Sfingomiyelin
SQSTM1	:	<i>Sequestosome 1</i>

Stbd-1	:	<i>Starch-binding domain-containing protein 1</i>
SYT-7	:	Sinaptotagmin
TBA	:	Temel Bileşen Analizi
TEM	:	Transmisyon Elektron Mikroskopisi
TGN	:	<i>trans-Golgi Network</i>
THC	:	Triheksosilseramid
<i>T<sub>m</sub></i>	:	<i>Melting Temperature</i> (erime sıcaklığı)
TORC1	:	Maya TOR Protein Kümesi 1
TP-43	:	<i>Ferrous Iron Transport Protein</i>
TSC1	:	<i>Tuberous Sclerosis 1</i>
TSC2	:	<i>Tuberous Sclerosis 2</i>
ULK	:	Unc-51-benzeri kinaz
VMP1	:	Vakuol Zar Proteini 1
Vps	:	Vacuolar protein sorting
WIPI	:	WD-fosfoinositidille etkileşime giren tekrar proteini.
β- gal	:	β-galaktosidaz
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre



## ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Lizozomların yapısı	3
2.2. Otofajinin basamakları	7
2.3. Lizozomal depo hastalıklarının patogenezi	15
2.4. Gaucher hastalığının patogenezi	17
2.5. SYBR Green tekniği	22
2.6. Erime eğrisi analizi	23
2.7. PZR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri	25
4.1. Atg4C gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği	38
4.2. ATG12 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği	40
4.3. Beklin-1 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği	42
4.4. GABARAP gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği	44
4.5. ATG3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği	46
4.6. ATG5 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği	47
4.7. LC3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği	49

- 4.8. Hastalara ait tüm veri setinin Eigen değerleri ve bu değerlerin toplam varyasyon içinde temsil ettikleri oranlar grafiği 50
- 4.9. Vektörel olarak F1 ve F2 vektörlerinde yer alan genlerin örnekler üzerinde dağılımı PZR ile miktar analizi 51

**TABLolar DİZİNİ**

2.1. Maya ve memelilerde otofaji proteinleri ve özellikleri	9
3.1. Hastalara ait bilgiler	29
3.2. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve cDNA üzerinde çoğalttıkları dizilerin uzunlukları	34
4.1. RNA örneklerinin absorbans değerleri ve konsantrasyonları	36
4.2. ATG4C gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri	37
4.3. ATG12 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri	39
4.4. Beklin-1 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri	41
4.5. GABARAP gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri	43
4.6. ATG3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri	45
4.7. ATG5 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri	47
4.8. LC3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri	48
4.9. Nicel gen ifadelerinin korelasyon matrisi	49

4.10. Hastalara ait tüm veri setinin Eigen değerleri ve bu değerlerin toplam varyasyon içinde temsil ettikleri oranlar	50
--	----

## 1. GİRİŞ

Lizozomlar, hücre içi yıkımdan sorumlu organellerdir. Lizozomlar içeriklerindeki lizozomal hidrolazlar ile protein, glikozaminoglikan, sfingolipid, glikojen, nükleik asit, oligosakkarit ve kompleks lipidler gibi yapısal olarak farklı metabolitlerin yıkımını gerçekleştirirler (1,2). Lizozomal yıkımda, lizozomal hidrolazların yanı sıra lizozomal zar proteinlerinin de rolü vardır (1).

Lizozomal hidrolazlarda ve lizozomal zar proteinlerinde işlev bozukluğu ya da kaybına neden olan değişiklikler, hücre içinde metabolize olamayan substratların birikmesine ve lizozomal depo hastalıklarının (LDH) ortaya çıkmasına neden olur (3,4). Lizozomal depo hastalıklarında, lizozom bağlantılı temel bir hücrel mekanizma olan otofaji aktivasyonunda da değişimler saptanmıştır (4,5).

Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (*auto*) yeme (*phagy*) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, besin elde etmek için hücre içi yapıların yıkımını gerçekleştiren bir mekanizmadır. Otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (6,7). Ayrıca metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında otofaji mekanizmasının rol oynadığı belirlenmiştir (5,7).

Lizozomal depo hastalıklarının, lizozomal hidrolaz enzim eksikliği nedeniyle ortaya çıkmasının yanı sıra lizozom bağlantılı temel hücrel bir mekanizma olan otofaji sürecinde de değişimlerin olduğu saptanmıştır (3). LDH patogeneğinde; lizozomlarda biriken substratların lizozom- otofagozom füzyonunun bozulması ve otofajik akışın bloke olması etkindir (4).

Lizozomal depo hastalıkları arasında en sık görülen Gaucher hastalığı glikosfingolipid metabolik yolağında glukozilseramid ve glikozilsfingozinin özgül

yıkımından sorumlu glikoserebrozidaz enzimini kodlayan glukoserebrosidaz genindeki mutasyonlar ile ortaya çıkan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Gaucher hastalığına neden olan GBA mutasyonları dışında, Sapozin (Sap) C eksiklikleri de Gaucher hastalığı için nadir varyant bir form oluşturmaktadır. Sap C eksiklikleri, prosapozin (PSAP) geninin Sap C kodlayan bölgelerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (8,9). Sap C, GCaz'ın fizyolojik aktivatörüdür ve GCaz ile anyonik fosfolipid içeren zarların bağlanmasını tetikleyerek enzim aktivitesini yeniden yapılandırır.

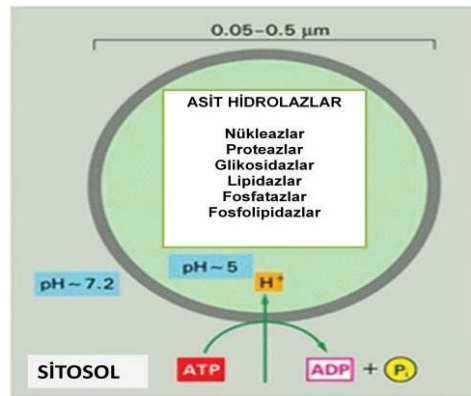
Bugüne kadar Gaucher hastalığı ve otofaji konusunda yapılan çalışmalarda nöronopatik özellik gösteren Gaucher fare modelinde anormal otofagozom oluşumları gözlenmiştir (10). Sapozin C geni susturulmuş fare fibroblastları ile yapılan çalışmada ise anormal otofagozom oluşumu yerine, otofajinin aktive olduğu belirlenmiştir (10).

Gaucher hastalığında lizozomlarda biriken metabolitlerin otofaji mekanizması üzerinde etkisini araştırmak amacıyla çalışmamızda, farklı klinik ve genotipik özellik gösteren Gaucher hastalarının fibroblast hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve otofaji mekanizmasının farklı basamaklarında rol alan otofaji genlerinin (Beklin-1, ATG12, ATG5, ATG4C, ATG3, LC3 ve GABARAP) mRNA ifade seviyeleri nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları ile analiz edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Lizozomların Yapı ve Görevleri

Lizozomlar, hücrenin en önemli yıkım organeli olup, asit pH'de çalışan 50' ye yakın hidrolitik enzim bulundururlar. Lizozomlarda yer alan vakuolar proton ATPaz pompası ile asidik koşullar sürdürülerek lizozomal yıkım gerçekleştirilir (Şekil 2.1) (1). Lizozomlar, proteinler, glikozaminoglikanlar (GAG), sfingolipidler, glikojen, nükleik asit, oligosakkarit ve kompleks lipidler gibi yapısal olarak farklı maddelerin yapıtaşlarına ayrılmasında işlevseldir. Yıkılacak substratlar, lizozomlara endositoz, fagositoz ya da otofaji gibi farklı mekanizmalarla taşınırlar (2,11). Lizozomların katabolik fonksiyonu, melanozom, litik granüller, MHC sınıf II ve platelet-yoğun granüller gibi lizozom-ilişkili organeller ile tamamlanmaktadır (12). Lizozomlar ve lizozom-ilişkili organeller hücre içinde, kolestrol düzenlenmesi, hücre zarı onarımı, kemik ve doku yenilenmesi, patojen savunması ve hücre ölümü gibi çeşitli fizyolojik olaylarda etkin rol alırlar. Bu kompleks fizyolojik fonksiyonlar, lizozomları basit bir yıkım organelinden çok, hücre içinde hayati öneme sahip merkezi ve dinamik bir organel yapmaktadır (1).



Şekil 2.1. Lizozomların yapısı

Lizozomların görevini yapabilmesi iki farklı protein sınıfına bağlıdır. Bunlar zara bağlı olmayan yağ, protein ve şeker gibi karmaşık molekülleri yapı taşlarına (örneğin yağları yağ asitlerine) parçalayan lizozomal hidrolazlar (asit hidrolazlar) ve

lizozom zarında bulunan lizozomal zar proteinleridir (LMP) (1). Bilinen 50 lizozomal hidrolazın her birinin yıkım için özel hedefleri vardır; ancak bunların birlikte faaliyeti, lizozomların toplam katabolik kapasitesini belirlemektedir. Toplu yıkım ve öncü-protein işlenmesine ek olarak lizozomal hidrolazlar, antijen işlenmesi, hücre dışı matriks yıkımı ve apoptozun başlamasında da rol oynar (1). Memeli lizozomlarında yaklaşık 25 LMP vardır, ancak bu sayı her geçen gün daha da artmaktadır. LMP' nin görevleri lizozomal hidrolazlardan çok farklıdır. Bu proteinler, lizozomal lümenin asidifikasyonu, sitoplazmadan protein getirilmesi, zar birleşmesi ve yıkılmış ürünlerin tekrar sitoplazmaya taşınması gibi olaylarda rol alırlar. Lizozom zarında en sık bulunan proteinler, lizozoma birleşik zar proteini 1 (LAMP1) ve 2 (LAMP2) ile lizozoma-bütünleşmiş zar proteini 2 (LIMP2; SCARB2 olarak da bilinir) ve Tetraspanin'dir (CD63). Bunların dışında, kalsiyum ile birlikte plazma zar onarımında görev olan Sinaptotagmin (SYT-7) ve hücre içi kolesterol düzenlenmesinde rol oynayan Niemann-Pick C1 (NPC1) proteini bilinen diğer önemli LMP' lerdir (13).

Lizozom oluşumu, hücre içinde endositik ve biyosentetik yolların uyumlu bir şekilde çalışmasını gerektirir. Örneğin, yeni sentezlenen lizozomal proteinlerin lizozoma taşınması, direkt olarak *trans*-Golgi ağından (*trans*-Golgi Network-TGN) endozomal sisteme, oradan da lizozoma doğru gerçekleşebilirken; indirekt olarak önce plazma zarına, sonra endozomal sisteme, en son olarak da lizozomlara doğru gerçekleşebilmektedir (1). Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, oldukça sıkı düzenlenen LMP trafiğinin önemini daha da arttırmıştır. Bu proteinlerin, hücre içi taşıma sistemine ya da endoplazmik retikulum, lizozom, hücre zarı gibi taşındıkları yere bağlı olarak organellere özel fonksiyonlar kazandırdığı gösterilmiştir. Öyle ki, bu proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların lizozom işlevlerini bozduğu ve lizozomal depo hastalıklarına yol açtığı ortaya çıkarılmıştır (14).

Lizozomal hidrolazlarda ve lizozomal zar proteinlerinde işlev bozukluğu ya da kaybına neden olan değişiklikler, lizozomların görevlerini gerektiği gibi yerine getirememelerine neden olur (3). Hidrolazlar ya da zar proteinlerini sentezleyen



genlerde oluşan mutasyonlar, lizozom oluşumunu da etkileyebilmektedir. Lizozom oluşumunda ve çalışmasında meydana gelen bu aksaklıklar, hücre içinde metabolize olamayan substratların birikmesine ve LDH'nin ortaya çıkmasına neden olur. Bugüne kadar hücre içinde metabolitlerin birikimine bağlı olan yaklaşık 60'tan fazla lizozomal depo hastalığı tanımlanmıştır (4). LDH sırasında, lizozom bağlantılı temel bir hücrel mekanizma olan otofajide de anormallikler görüldüğüne dair yayınlar vardır (4,5).

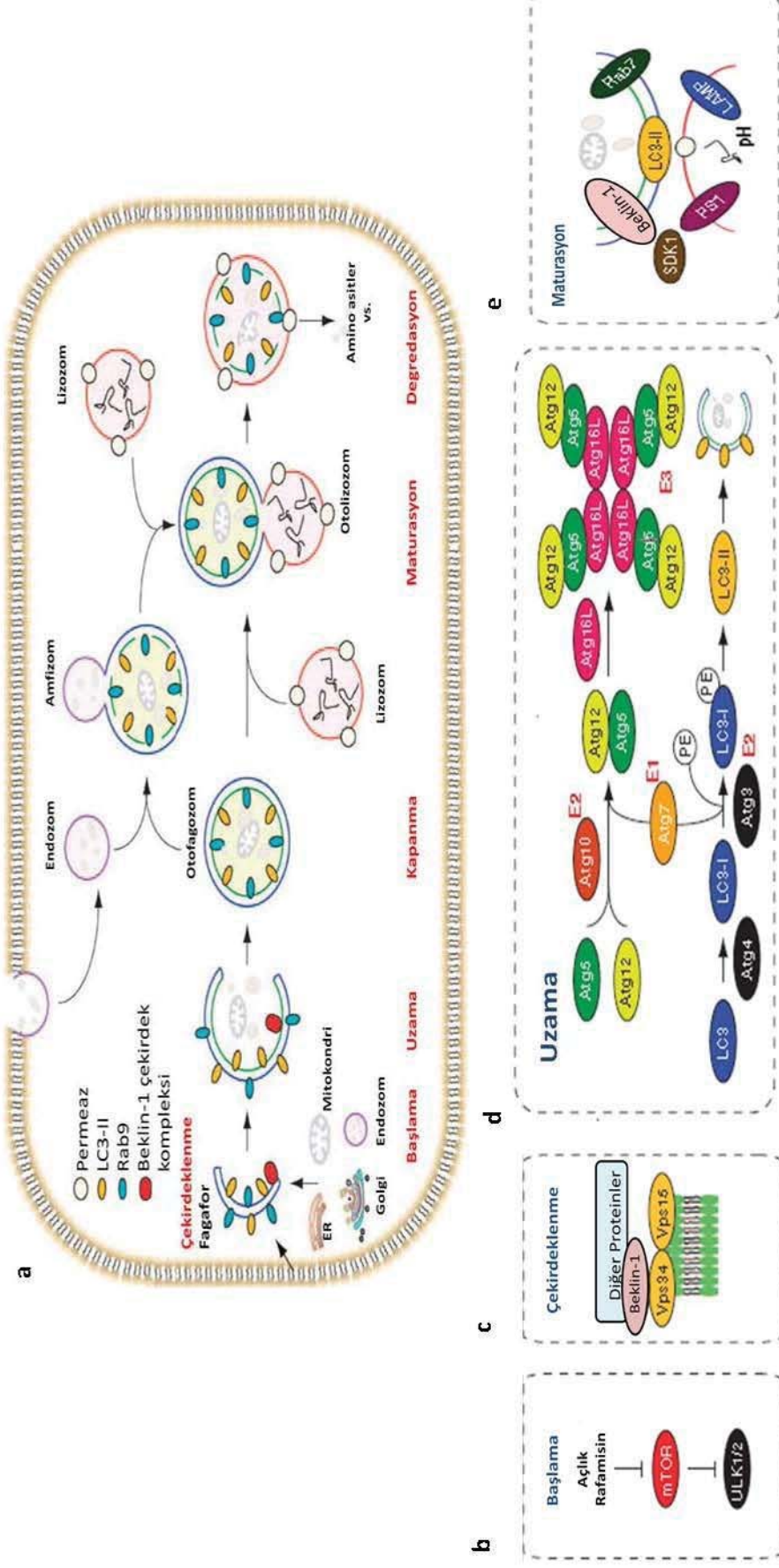
## 2.2. Otofaji

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır (6,7). Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları (örn. aminoasitler) hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar. Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (*auto*) yeme (*phagy*) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, besin elde etmek için hücre içindeki yapıların nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (6,7). Son yıllarda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur (5,7). Ayrıca araştırmalar, otofaji değişimlerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir (6).

Otofaji; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılıklı otofaji şeklinde en az üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (15). Her üç tipte de sitosolik bileşenlerin lizozomlarda proteolitik yıkımı gerçekleşir. Makrootofaji hücrede bazal düzeyde oluşmaktadır (16). Protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin

parçalanmasında önemli rol oynar. Sitoplazmik kargonun lizozomlara çift zar yapıdaki otofagozomlar ile taşınması ve otofagozomun, lizozomlar ile otolizozom oluşturmak üzere füzyonu gerçekleşir (17)(Şekil 2.2a). Mikrootofajide, sitosolik bileşenlerin lizozomlar içerisine direkt olarak lizozomun invajinasyonu ile alınması gerçekleşir. Hem makrootofaji hem de mikrootofajide, büyük yapıların seçici ve/veya seçici olmayan mekanizmalar ile alınımı olabilir. Şaperon-aracılı otofajide, KFERQ motifli hedef proteinler, lizozomal zara şaperon protein kompleksi (Hsc-70) ile transloke olur. Bunlar lizozomal zar reseptörü olan lizozom ile ilişkili zar proteini 2A (LAMP-2A) tarafından tanınır ve yıkımları gerçekleşir (15).

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu “otofaji ile ilişkili proteinler” (Autophagy-related proteins) ya da kısaca Atg proteinleri mayada yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur. Bugüne kadar tanımlanan 35 kadar otofaji proteininin, filogenetik geçişte diğer canlılarda da korunduğu gözlemlenmiştir (18)(Tablo 2.1). Atg proteinlerinin bir kısmı ve diğer protein kompleksleri “otofajik kesecik” ya da bir başka deyişle izolasyon membranının ve otofagozomun oluşumunda rol oynamaktadır. Hücrede otofagozomlar “otofaji oluşum merkezi” (*Preautophagosomal structure, PAS*) adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum (ER) ile Golgi arasına serpiştirilmiş olan yapılarda ortaya çıkarlar. İzolasyon membranının kaynağı tam belli olmasa da en çok kabul edilen modelde bunun yeni sentez edildiği veya ER, mitokondri dışı membranı ve plazma membranından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (19).



**Şekil 2.2.** Otofajinin basamakları **(a)** Makrotofaji **(b)** mTOR tarafından inhibe olan ULK1 ve ULK2 komplekslerinin aktivasyonu başlangıç aşamasının sürekliliğini sağlar. **(c)** Çekirdeklenme aşaması Beclin-1- Vps34- Vps15 çekirdek kompleksi ve diğer proteinler ile ilişkilidir. **(d)** Fagoforların uzaması iki ubikitin benzeri sistem tarafından gerçekleşir. Bu iki reaksiyon Atg16 kompleksinin oluşumunu ve LC3-PE( fosfotidiletanolamin) sürecini tetikler. **(e)** LC3-II, Beclin-1, lizozomal membran proteinleri LAMP-1 ve LAMP-2, GTP' ye bağlanan protein RAB7, ATPaz SKD1, hücre iskeleti, lizozom pH' sı ve presenilin1 ( PS1) tarafından matürasyon aşaması desteklenir (15).

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu “otofaji ile ilişkili proteinler” (Autophagy-related proteins) ya da kısaca Atg proteinleri mayada yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur. Bugüne kadar tanımlanan 35 kadar otofaji proteininin, filogenetik geçişte diğer canlılarda da korunduğu gözlemlenmiştir (18)(Tablo 2.1). Atg proteinlerinin bir kısmı ve diğer protein kompleksleri “otofajik kesecik” ya da bir başka deyişle izolasyon membranının ve otofagozomun oluşumunda rol oynamaktadır. Hücrede otofagozomlar “otofaji oluşum merkezi” (*Preautophagosomal structure, PAS*) adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum (ER) ile Golgi arasına serpiştirilmiş olan yapılarda ortaya çıkarlar. İzolasyon membranının kaynağı tam belli olmasa da en çok kabul edilen modelde bunun yeni sentez edildiği veya ER, mitokondri dışı membranı ve plazma membranından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (19).

**Tablo 2.1.** Maya ve memelilerde otofaji proteinleri ve özellikleri:

	Maya	Memeli	Özellik
Atg1/ ULK1 kompleksi	Atg1	ULK1/2	Ser/Thr kinaz; mTORC1 tarafından fosforile olur.
	Atg13	ATG13	mTORC1 tarafından fosforile olur.
	Atg17	-	Atg29 ve Atg31 ile üçlü kompleks oluşturur.
	Atg11	-	Seçici otofajide PAS organizasyonu için platform oluşturur.
	Atg29	-	Atg17 ve Atg31 ile üçlü kompleks oluşturur.
	Atg31	-	Atg17 ve Atg31 ile üçlü kompleks oluşturur.
	-	FIP200	ULK1/2 ve Atg13 için platform oluşturur.
	-	ATG101	Atg13 ile etkileşime girer.
	Sınıf III PI3K kompleksi	Vps34	VPS34
Vps15		VPS15	Ser/Thr kinaz; miristollenmiş.
Vps30/Atg6		Beklin-1	Bcl-2 ile etkileşime girer.
Atg14		ATG14 (L)/Barkor	Otofaji- özgül alt ünitesi
-		AMBRA1	Beklin-1 ile etkileşime girer.
Diğerleri	Atg2	ATG2A/B	Atg18 ile etkileşime girer.
	Atg9	ATG9L1/2	Çok yayımlı transmembran protein
	Atg18	WIPI1/2/3/4	PI3P'a bağlanan protein
	-	DFCP	PI3P'a bağlanan FYVE içeren protein
	-	VMP1	Çok yayımlı transmembran protein
	Atg7	ATG7	E1-benzeri enzim
	Atg10	ATG10	E2-benzeri enzim
	Atg5	ATG5	Atg12 ile konjuge olur
	Atg16	Atg16L1/2	Homodimer; Ag5 ile konjuge olur.
Atg8/LC3 konjugasyon sistemi	Atg8	LC3A/B/C, GABARAP, GABARAPL 1/2/3	Ubikitin benzeri, PE ile eklenme tepkimesi verir. (GABARAPL2=GATE16)
	Atg4	ATG4A-D	LC3/Atg8 C-terminal hidrolaz enzimi
	Atg7	ATG7	E1-benzeri enzim ( Atg12 ile paylaşılır)
	Atg3	ATG3	E2-benzeri enzim

Bu proteinler otofaji sırasında otofajik kese (otofagozom) çekirdeklenmesi, kese zarı uzaması, kapanması, taşınması, lizozomla kaynaşması, iç zar ve kargonun lizozomda yıkılması ve yapıtaşlarının sitoplazmaya taşınması gibi değişik aşamalarda rol oynamaktadır (18).

Otofaji mekanizması dört basamakta özetlenebilir:

### **2.2.1. Atg1(ULK1/2)-ATG13-ATG17 Kinaz Kompleksi**

Atg1/ULK1-2 (Mayada Atg1 ve memelilerde ULK1-2) ve ATG13 proteinleri otofagozom oluşumunun en önemli düzenleyicileridir (Şekil 2.2.b). Hücrenin enerji ölçeri memeli mTOR ya da maya TOR protein kümesi 1 (memelilerde mTORC1 ya da mayalarda TORC1), besin ve büyüme faktörü varlığını algılayarak, otofajiye ihtiyaç olup olmadığını kontrol eder.

Memelilerde mTORC1 protein kümesi, mTOR'a bağlanan raptor, mLST8, PRAS40, DEPTOR ve mTOR etkinliğinin düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerden oluşur. mTOR, mTORC1 kümesinde etkin olan hücre büyümesi ve metabolizmasını düzenleyen önemli bir kinazdır.

Besinin bol olduğu durumlarda mTORC1, memelilerde Atg1/ULK1 üzerinden, mayalarda ise Atg13 üzerinden otofajiyi inhibe etmektedir. Memelilerde ULK1'in mTOR tarafından fosforillenmesinin otofajiyi baskıladığı gösterilmiştir. Açlık durumunda ise, mTORC1 baskılanır ve ULK1 kompleksinden ayrılır; böylece otofagozomların oluşumunu tetikler (20).

### **2.2.2. Sınıf III PI3K Kompleksi**

Otofagozomların oluşumunda rol oynayan önemli bir diğer protein kompleksi sınıf III PI3K, Vps34'ü içeren kümedir (Şekil 2.2.c). Bu protein kümesinin aktivitesini düzenleyen en önemli protein memelilerde Beklin-1 proteindir. Vps34 aktivitesinin ürünü olan fosfotidil-inositol-3 fosfat (PI3P), otofaji yolağının ilk

aşamasında önemli rol oynar. PI3-P, otofajik kese oluşumu için gerekli olan proteinlerin otofajik vezikül filizlenme bölgelerinde öbeklenmesinde görev alır ve birçok protein için bir birleşme platformu oluşturur (15). Sınıf III PI3K- Vps34 ve ürünü PI3-fosfat otofajinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (7).

### **2.2.3. ATG12 Konjugasyon Sistemi**

Otofajik kese uzaması ubikitinlenme benzeri iki ayrı protein-protein konjugasyon tepkimesi içerir (Şekil 2.2.d). Birinci ubikitinasyon sistemi, ATG12 proteininin ATG5'e bağlanmasını, ATG12-ATG5-ATG16 kompleksinin oluşmasını sağlar ve izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır. Burada ubikitinlenmeye benzer bir şekilde ATG12 eklenmesini düzenleyen ATG7 ve ATG10 proteinleri, sırasıyla E1 ve E2 benzeri rol oynar. ATG12-ATG5-ATG16 kompleksinin ise E3 benzeri bir rol üstlendiği ve otofajik vezikül oluşum bölgesini belirlemeye katkıda bulunduğu öne sürülmüştür. Bu nedenlerden ötürü ATG12-ATG5-ATG16 kompleks oluşumu, ikinci ubikitinasyon benzeri yolak için gereklidir (7,15).

### **2.2.4. LC3-PE Konjugasyon Sistemi**

İkinci ubikitinasyon sistemi ise, fosfotidil etanolamin (PE) adlı yağ molekülünün LC3 proteinine kovalent bağlanmasını sağlar (Şekil 2.2.d). Bu bağlanmanın olabilmesi için, LC3'ün C-ucundaki beş aminoasitin ATG4 proteazı tarafından kesilerek 6. aminoasit olan glisinin ortaya çıkarılması ve LC3-I formunun oluşturulması gerekmektedir. PE molekülü, bu glisine bağlanmaktadır. LC3-I'in PE'ye bağlanması ile oluşan LC3-II formu, otofagozomların oluşmaya başladığı bölgeye zar taşınmasını ve burada zar uzamasını sağlar. Ayrıca ATG4, otofagozom oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3-II proteinlerinden yağ moleküllerini uzaklaştırarak yeniden kullanılmalarına yol açmaktadır (7,15,16). LC3-II'nin otofajik zarlara yağ taşıdığı ve böylece zar uzamasını ve kese kapanmasını sağladığı düşünülmektedir.

ATG3, her iki ubiquitin benzeri reaksiyon arasında aracı molekül olarak görev almaktadır. ATG3 bu fonksiyonunu LC3 veya GABARAP lipid konjugasyonunda rol oynarak gerçekleştirir. LC3'ün fagoforların uzaması sürecinde yer aldığı belirlenirken, aynı protein ailesinin diğer alt üyesi GABARAP'ın otofagozomların maturasyon öncesi aşamasını düzenlediği tespit edilmiştir (21).

ATG9 ve döngü sistemi otofajik vezikülden otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır (Şekil 2.2.e). ATG9, ATG protein ailesinin tek transmembran proteindir. Normal koşullarda ATG9, trans-Golgi ağı ve geç endozomlar arasındaki trafiği gerçekleştirir (22). Açlık koşullarında ise ATG9, periferel havuzunda yer alır. Burada otofajik vakuol belirteçleri olan LC3-II ve Rab7 (*Ras-related protein*) ile birlikte bulunur. ATG9' un görevi lipid taşımak ve/veya fagaforu etkileyen faktörler için bir platform olarak hizmet etmektir (23).

Lizozomlar ile tamamlanmış otofagozomların birleşmesi ise, LAMP2 ve Rab7 gibi aynı zamanda diğer vezikül yolaklarında yer alan proteinler tarafından yönlendirilir. Sonunda otofagozomların dış ikili zarı, lizozom zarı ile birleşir, iç zar ve içerdiği sitoplazma, ömrünü tamamlamış proteinler ve hatta tüm organeller lizozomdaki yıkıcı enzimlerin etkinlikleri sayesinde parçalanır. Parçalanan yapıtaşları (amino asitler, yağ asitleri gibi) yeni hücre bileşenleri üretilmesi ve enerji dengesinin korunması için hücre tarafından geri kazanılır. Otofaji, besin yetersizliği, büyüme faktör eksikliği, hipoksi, toksinlerle karşılaşma ve benzer şekilde strese neden olan başka durumlarda hücrelerin hayatta kalmaları için önemlidir.

PTEN, DAPK, TSC1 ve TSC2 kompleksleri gibi tümör baskılayıcıları, c-Jun N-terminal kinaz 1 (JNK1), AMP kinaz gibi stres ile aktive olan yolaklarda rol oynayan ve bağışıklık sisteminde yer alan moleküllerin aynı zamanda otofajiyi uyaran proteinler oldukları açığa çıkarılmıştır. Fosfotidil inositol 3- kinaz (PI3K), Akt, Ras, TOR ve Bcl-2 gibi onkogenlerden bazılarının ise otofajiyi baskıladıkları anlaşılmıştır. Çalışmalar en önemli tümör baskılayıcı genlerden biri olan p53'ün, otofaji üzerine ikili bir rol oynadığını kanıtlamıştır ve özellikle hücre çekirdeğine geç



eden p53'ün, transkripsiyona etkisine bağımlı veya bağımsız olarak otofajiyi uyardığını göstermiştir (24, 25).

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan protein ve protein kümelerinin tamamının moleküler yapıları ve etki mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir. Otofajik kese oluşumu, çekirdeklenmesi, zar uzaması, lizozomla birleşme ve lizozomda yıkım gibi hücre içinde meydana gelen bu olaylarda rol oynayan çok proteinli kümeler ve bunları düzenleyen yolaklar günümüzde de süren yoğun araştırmalarla aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

### **2.3. Otofajinin Fizyolojik Görevleri**

Hasar görmüş ya da katlanması bozuk proteinlerin ve fonksiyonel olmayan organellerin yok edilmesi otofaji yoluyla olmaktadır. Örneğin otofajinin, genetik bozukluk nedeniyle mutant anti-tripsin ifade eden karaciğerdeki protein birikimini yok etme, yağ hücrelerinden lipid mobilize etme, oksidatif strese karşı direnç sağlama, bazı enfeksiyon ve tümörlerin oluşumunu baskılama gibi fizyolojik ve patolojik yanıtlarda rol oynadığı tespit edilmiştir (26,27,28).

Çok sayıda çevresel faktör, hücrelerde otofajiyi tetiklemektedir. Açlık, hipoksi ve stres otofajiyile alakalı çevresel faktörlerdir (29,30,31). Otofaji, bu çevresel faktörlere karşı hücrel dengeyi korur ve stres altındaki hücrelerin hayatta kalmasını sağlar. Otofaji sisteminin bu işlevini yerine getirememesi, Alzheimer ve Huntington hastalığı (32,33) gibi nörodejeneratif hastalıklara, ateroskleroz (damar sertliği) (34) ve yaşlılığa bağlı dejenerasyon (35,36) gibi çeşitli rahatsızlıklara yol açar.

Otofaji, patolojik durumlarda ve yaşlanmaya bağlı rahatsızlıklarda kritik bir biyolojik olay olarak ortaya çıkar. Otofajinin hücre içindeki başlıca görevi sitoplazmik bileşenlerin normal döngüsünü sağlamaktır. Daha önce yapılan araştırmalarda otofajik aktivitedeki yetersizliğin farelerde nörodejenerasyona (nöron kaybına) neden olduğu kanıtlanmıştır (37). Farede Atg5 otofaji geninin susturulması

hücre içinde anormal protein birikimlerine yol açmaktadır. Bu durum nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna neden olabilir. Örneğin, Alzheimer hastalığı amiloid- $\beta$  ve tau proteinin; Parkinson hastalığı ise TP-43 ve  $\alpha$ -sinüklein birikimiyle ilişkilidir (38). Ayrıca bu protein birikimleri nörodejeneratif hastalıklarda, diğer temel protein yıkım mekanizması olan ubiquitin-proteozom sistemini de devre dışı bırakmaktadır. Bu nedenlerden ötürü, otofajinin ilaçlarla uyarılmasının nörodejeneratif hastalıkların tedavisine katkıda bulunacağı düşünülmekte ve ilaç araştırma çalışmaları hızla ilerlemektedir.

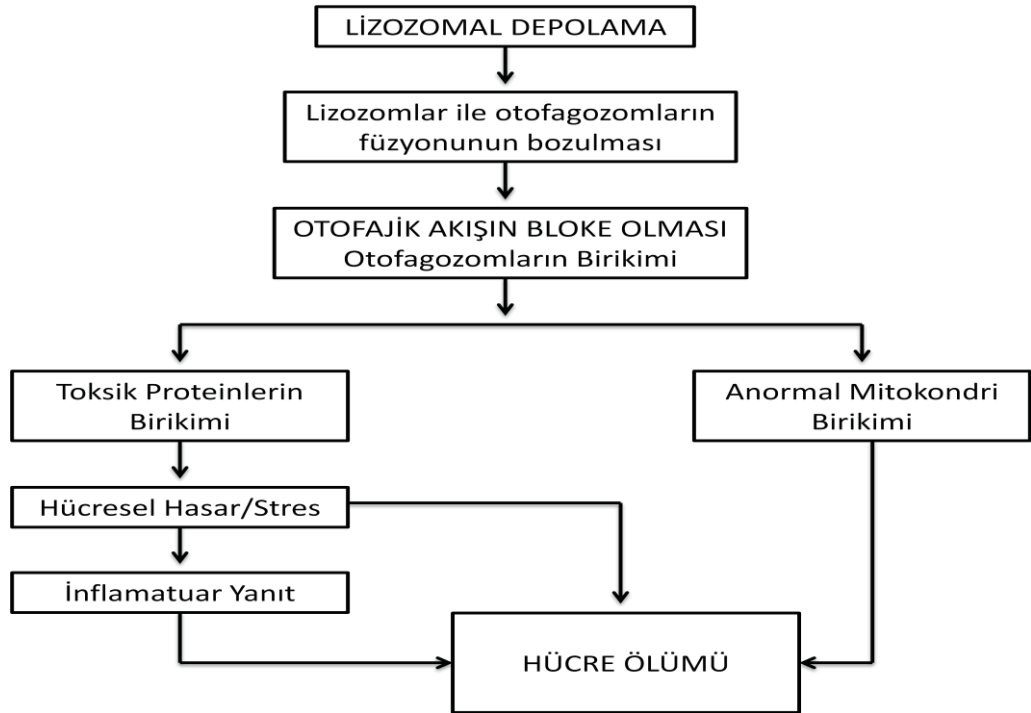
Son yıllarda, otofaji-kanser bağlantısı hakkında da önemli bilgiler elde edilmiştir (39). Kanser oluşumunun erken safhalarında otofajinin tümör baskılayıcı bir rol oynadığı öne sürülmüştür (40). Öte yandan tümör çapı artarken kitle içerisindeki hücrelerde kan (besin ve oksijen) yetersiz gelmeye başlar ve bu bölgede hücrelerin yaşamını sürdürmesi için otofajinin gerekli olduğuna dair işaretler vardır.

Yakın zamanda, hücre içi kolesterol miktarının mTOR yolağı aracılığıyla otofajiyi direkt etkilediği bulunmuş, böylece otofajinin hücre içi lipid metabolizması ve depolanmasında da kritik rol oynadığı gösterilmiştir (31). Hepatositlerle yapılan çalışmalarda, otofajinin, ATG5 ve ATG7 genlerinin silinmesi ya da farmakolojik olarak 3-metiladenin ile engellenmesinin hücre içi trigliserit ve kolesterol miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Benzer çalışma, fare embriyonik fibroblastlarında da aynı sonuçları vermiş olup, otofajinin lipid yıkımındaki önemli rolünün hepatositlerle sınırlı olmadığını göstermiştir (41). Yine fare fibroblastlarına kolesterol verilmesinin, lizozomların zar lipid kompozisyonunu değiştirerek otofagozom-lizozom birleşmesini engellediği ve Nieman Pick Tip A, B, C (NPA, NPB, NPC) gibi bazı lizozomal depo hastalıklarına yol açtığı gözlenmiştir (42).

#### **2.4. Lizozomal Depo Hastalıkları ve Otofaji**

lizozomal hidrolaz enzim eksikliği nedeniyle ortaya çıkan lizozomal depo hastalıklarında, lizozom bağlantılı temel hücrel bir mekanizma olan otofaji sürecinde de değişimlerin olduğu saptanmıştır (3).

LDH patogenezinde; substrat birikimi ile ortaya çıkan lizozomal depolama lizozom- otofagozom füzyonunun bozulmasına ve otofajik akışın bloke olmasına neden olur. Çoklu ubikitinlenmiş proteinlerin, fonksiyonel olmayan mitokondri gibi sekonder substratların birikimi otofajik akışı bloke ederek, otofagozomların birikimine ve hücre ölümüne neden olmaktadır (4) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Lizozomal depo hastalıklarının patogenezi

En yaygın çalışılan lizozomal depo hastalığı, geç endozomlarda kolesterol birikmesiyle ortaya çıkan Nieman Pick hastalığıdır. Npc1 geni silinmiş farelerin beyin ve yumurtalık dokularından elde edilmiş hücrelerde otofajinin belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir (3,41). Benzer sonuçlar, NPC1 geni silinmiş insan fibroblaslarında da bulunmuştur (42). Otofaji aktivasyonu, NPC2, Sandhoff hastalığı, çoklu sülfataz eksikliği ve MPSIIIA (4, 43), GM1 gangliosidozis (44), Neuronal seroid-lipofuskinosis-NSL ve Pompe hastalığı (4,45) gibi diğer lizozomal hastalıklarda da görülür. Otofajik birikimin endositik yolakta da etkin olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır. Otofagozomların lizozomlarla birleşmesinde rol oynayan LAMP2 proteinini kodlayan gendeki mutasyon, birçok dokuda

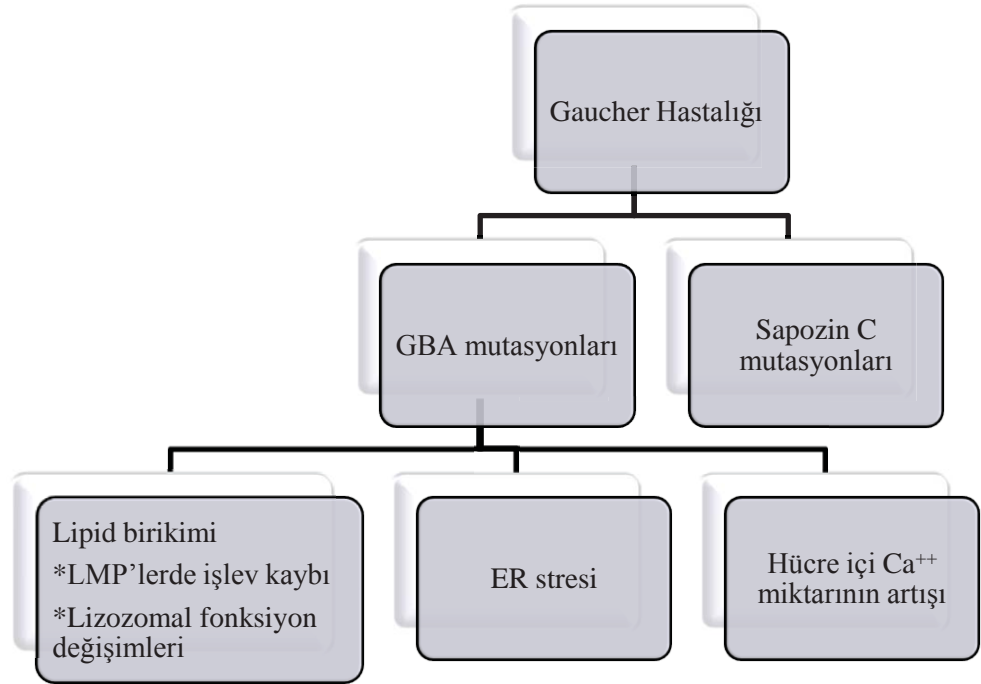
otofagozomların birikmesine yol açarak, miyopati ve kardiyopati belirtileriyle bilinen Danon hastalığına neden olmaktadır (46). Temel mekanizmaları farklı olmasına karşın, otofaji engellenmesinin birçok lizozomal hastalığa neden olduğu görülmektedir. Diğer yandan, GM1 gangliosidozis ya da NCL gibi hastalıklarda engellenme otofajinin fazla aktivasyonu sebebiyle olurken, çoklu sülfataz eksikliği ya da MPSIIIA gibi hastalıklarda engellenme otofagozom-lizozom birleşmesinin bloke olmasından kaynaklanmaktadır (4). Gaucher hasta fibroblast hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise otofajinin normal olduğu gösterilmiştir (43). Ancak bu çalışmada, otofaji belirteci olarak LC3-II ve önemli bir otofaji proteini olan Beklin-1 miktarına bakılmış olup, diğer otofaji genleri ile otofajik aktivite ve bunun dinamiklerinin Gaucher hastalığı oluşum ve belirtilerindeki rolü çalışılmamıştır.

## 2.5. Gaucher Hastalığı (GH) ve Otofaji

Lizozomal depo hastalıklarında en sık görülen Gaucher hastalığının (MIM#608013), genel populasyonda görülme sıklığı 1/40.000-1/60.000'dir (8). Gaucher hastalığı; glikosfingolipid metabolik yolağında glukozilseramid (GC) ve glikozilsfingozinin (GS) özgül yıkımından sorumlu glikoserebrozidaz (GCaz, GlcCera, asit  $\beta$ -glukozidaz) (E.C.3.2.1.45) enzimini kodlayan glukoserebrozidaz genindeki (GBA, MIM#606463) mutasyonlar ile ortaya çıkan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. GCaz enzimi, kompleks glikosfingoipidlerin parçalanma yolağındaki metabolik bir ara ürün olan glikozilserebrozidi parçalayarak glukoz ve seramid oluşturmaktadır. GBA genindeki mutasyonlar lizozomlarda glikozilseramid ve glukozilsfingozin hidrolizinin engellenmesine neden olur. Mutasyonlar sonucu, glukoserebrozidin özellikle retikuloendotelial sistemin dokularında olmak üzere, makrofajların lizozomlarında büyük miktarlarda birikimi gerçekleşir. Lipid ile şişmiş olan makrofajlar genellikle tipik bir morfoloji sunar ve “ Gaucher hücreleri” olarak adlandırılır. Gaucher hücreleri, tüm vücutta dağılım gösterebilir ancak en fazla karaciğer, dalak, kemik iliği ve merkezi sinir sisteminde GC birikmesine neden olur.

Klinik olarak Gaucher hastalığı fenotipleri nöronopatik olmayan ya da viseral (Tip1, MIM# 230800), akut nöronopatik (Tip2, MIM# 230900) ve kronik

nöronopatik (Tip3, MIM# 231000) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (47) . En yaygın görülen Tip1' dir. İleri nöronopatik patoloji gösteren Tip2, ilk bir yıl içinde ölüme sonuçlanır. Ölümler daha çok merkezi sinir sistemi ve akciğer bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Tip3'te ise bulgular daha yavaş ilerlemekte olup, erken safhada çoğunlukla karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde; hafif şekilde merkezi sinir sisteminde; ergenlik döneminde ise kontrol edilemeyen nöbetler şeklinde görülür. Tip2 ve Tip3 gibi nöronopatik tiplerde GC ve GS birikimi nöronlarda gösterilmiştir (48). Hastalarda, merkezi sinir sisteminde nöronal inklüzyon ve nöronal ölüm görülmesine karşın, anormal GC/GS mekanizmasının bu patolojik bulgulara ne şekilde sebep olduğu henüz açıklanmamıştır (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Gaucher hastalığının patogenezi

Gaucher hastalığına neden olan mutasyonlar popülasyonlarda, farklı dağılım göstermektedir. Örneğin, p.N370S, p.84GG, p.L444P mutant allelleri Yahudilerde %90 oranında görülürken, diğer toplumlarda %75 oranında görülmektedir (49).

Genel olarak Tip1 Gaucher hastalığında glukoserebrosidaz geninde %75 oranında p.N370S mutasyonu saptanırken; Tip2 ve Tip3 Gaucher hastalığında ise yüksek oranda p.L444P mutasyonu gözlenmektedir (50,51). Anabilim Dalımızda yapılan mutasyon analizleri sonucunda ise sıklıkla gözlenen mutasyonlar p.L444P (%42), p.N370S (%30), p.D409H (%4,38) ve p.L296V (%3,5) olarak saptanmıştır (52).

GH fibroblast hücrelerinde yapılan çalışmalarda GBA geninde p.N370S mutasyonunun, GCaz ile GCaz aktivatörleri olan Sap C ve anyonik fosfolipid içeren zarlar arasındaki etkileşimi bozduğu gösterilmiştir. p.N370S mutasyonunda GCaz ve aktivatörleri arasındaki zayıf bağlantının, *in vivo*'da düşük enzim aktivitesine neden olduğu düşünülmektedir (53).

GBA geninde p.L444P mutasyonu sonucunda ise GCaz enziminin katlanma etkinliği azalmaktadır. Enzimin sadece % 10' u lizozoma ulaşmaktadır. Geri kalan kısmı ER' de katlanma kontrol sistemine ulaşamadığı için yıkıma uğramaktadır ve enzimin lizozoma ulaşan kısmı özgül aktivitesini gösterememektedir (54).

GBA genindeki bir diğer mutasyon ise p.D409H'dır. p.D409H mutasyonu içeren Gaucher hastalarında erken yaşlarda iç organlar ve sinir sistemi etkilenmektedir. Mutasyonunun homozigot formu özgül kardiyovasküler semptomlara neden olmaktadır (55). p.D409H homozigot hastalarda GCaz enziminin düşük rezidüel aktivitesi tespit edilmiştir. Ayrıca enzimde anormal stabilite ve değişmiş kinetik özellikler gözlenmektedir (56) .

p.L296V mutasyonu, Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen mutasyon analizleri sonucunda ilk kez tanımlanmıştır. p.L296V mutant hastalarda GCaz enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmektedir. p.L296V mutasyonu gösteren hastalar, klinik olarak Tip1 ile uyumludur (52).

Gaucher hastalığında glukoserebrosit birikiminin yanı sıra *dihexosylceramide-* (DHC) ve *trihexosylceramide* (THC), sfingomiyelin (SM),

fosfotidilkolin (FK), fosfotidilinositol (FI) ve fosfotidilgliserol (FG) gibi diğer sfingolipidlerin de lizozomlarda sekonder birikimi özellikle Tip2 Gaucher fibroblastlarında gözlenmiştir (57). Sfingolipidler ökaryotik hücre zarlarının önemli yapısal bileşenleridir. Hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü, hücre sel sinyal, trafik, otofaji ve hücre ölümü gibi birçok hücre sel fonksiyonda düzenleyici rolü vardır. Geç endozomlarda ve lizozomlarda yıkıma uğrayan sfingolipidlerin yıkım basamaklarında hasarın ortaya çıkması, sfingolipidlerin lizozomal birikimine yol açmaktadır. Lipidlerin endozomal ve lizozomal birikimi lipid trafiğinin bozulmasına ve lizozomlarda lipid yıkımının azalmasına neden olur (57).

Gaucher hastalığına neden olan GBA mutasyonları dışında, Sapozin ( Sap) C eksiklikleri de GH için nadir varyant bir form oluşturmaktadır. Sapozinler (A, B, C, D) özgül glikosfingolipid (GSL)'lerin aktivasyonundan sorumlu yaklaşık 80 amino asitlik küçük proteinlerdir (58). Sap C eksiklikleri, prosapozin (PSAP) geninin Sap C kodlayan bölgelerindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (9). Sap C, GCaz'ın fizyolojik aktivatörüdür ve GCaz ile anyonik fosfolipid içeren zarların bağlanmasını tetikleyerek enzim aktivitesini yeniden yapılandırır. Sapozin C'ye bağlı GCaz aktivasyonu, enzim ve substrat interaksiyonunu sağlayan zar katmanlarında değişikliğe sebep olur (53).

Sapozinler yapılarına ve fonksiyonlarına etki eden altı sistein bölgesi içermektedir. Sistein bölgelerinde mutasyon taşıyan Sap C'nin endozomal/ lizozomal stabilitesi bozulmaktadır. Sap C'nin azalan miktarları GCaz' ın hücre içi yerleşimini etkiler. Sap C seviyelerinin azalmasıyla ortaya çıkan bu durum, otofajik aktivitenin indüklenmesine neden olmaktadır (58).

Tatti ve diğ. (9)'leri PSAP geninin sistein bölgelerinde mutasyon taşımayan; p.N370S ve p.L444P mutasyonu taşıyan hastalarda otofajik aktivitenin normal olduğunu gözlemlemiştir. Elde edilen sonuçlar, Sap C'nin olmadığı koşullarda otofajinin zarar gördüğünü göstermektedir. Sap C proteininin çok az bir miktarının bulunması, normal otofajik aktivite için yeterli olduğunu göstermiştir (9).

Gaucher hastalığı ve otofaji konusunda yapılan çalışmalarda nöronopatik Gaucher fare modellerinde anormal otofagozom oluşumları gözlenmiştir. Sapozin C geni silinmiş fare fibroblastları ile yapılan bir başka çalışmada ise anormal otofagozom oluşumu yerine, otofajinin aktive olduğu LC3 proteini ve elektron mikroskopisi ile belirlenmiştir (10).

Gaucher hastalığı modelleri hem indüklenmiş otofajiyi, hem de otofagozomların ve otofajik substratların birikimini gösterir. Glukoserebrosidaz geninde homozigot p.V394 mutant ve Sapozin C eksikliği bulunan fareler nöronopatik Gaucher hastalığının modeli olarak kullanılmıştır. Otofajik substrat olan p62/SQSTM1'in nöronlarda ve astrositlerde birikimi gözlenmiştir. Veziküller içinde parçalanmayan materyallerin birikimi ise aksonlarda gözlenerek otofajik substrat birikiminin olduğu tespit edilmiştir (59). Bu durum, Gaucher hücrelerinde otolizozomal kargonun yıkımında hasar olduğunu göstermektedir.

Gaucher hastalığının patolojisini açıklamak amacıyla yapılan bazı moleküler ve biyokimyasal araştırmalar, hasta makrofajlarında GC birikmesinin, bu hücrelerdeki interlökin-1b, interlökin-6, tümör nekroz faktörü ve interlökin-2 reseptörleri (CD14, M-CSF) gibi bazı sitokinlerin miktarını arttırdığı gözlemlenmiştir (60,61). Bu artışın makrofajları aktive ederek, farklı bir hücre içi sinyal yolağı aracılığıyla GC birikimi görülmeyen diğer dokulardaki bozukluklara sebep olduğu, böylece farklı patolojik etkilerin ortaya çıktığı düşünülmektedir (62).

Substrat birikiminin yanında, mutant enzimin, hücre içi işlevinde anormalliklere sebep olarak kendi başına Gaucher hastalığı patolojisinde etkili olduğu öne sürülen bir başka görüş ise GBA mutant proteininin ER içinde yanlış katlanmalara sebep olarak, proteozom yıkım mekanizmasını aktive ettiği ve böylece ER stresine neden olduğudur. Endoplazmik retikulumdaki bu birikim ya da yıkım oranının, hastalığın şiddeti ile aynı doğrultuda olduğunu gösteren bir çalışma vardır (63). Gaucher hastalığı fare modellerinde yapılan bir başka çalışmada ise nöronal hücre ölümü ile sonuçlanan ER kalsiyum miktarının arttığı gösterilmiştir. Kalsiyum artışının özellikle hastalığın nöronopatik (Tip2) fenotipinde görülmesi, hücre içi



kalsiyum dengesinin hastalığın nöropatolojisi ile direkt ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Gaucher hasta primer fibroblastlarında ise reaktif oksijen çeşitlerinin arttığı ve bu artışın daha çok NAD(P)H oksidazına bağlı olarak görüldüğü bulunmuştur (64). Öyle ki bu hücrelerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen hücre ölümüne hassas oldukları ve oksidatif strese yanıt verme mekanizmalarının bozulduğu gösterilmiştir.

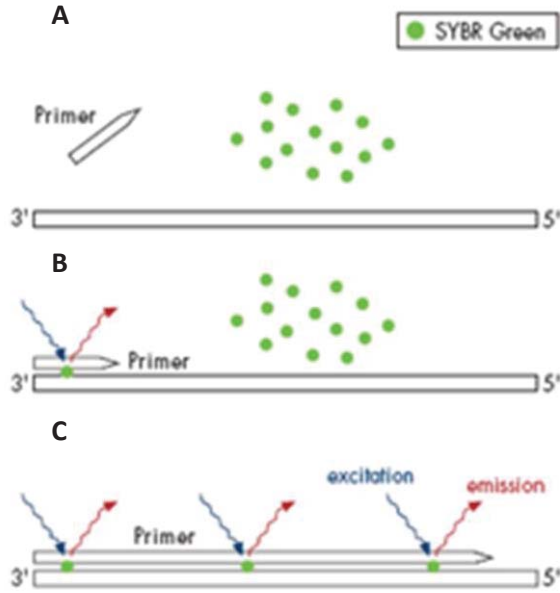
## **2.6. Nicel Gerçek Zamanlı (*Quantitative Real-Time*) Polimeraz Zincir Reaksiyonu:**

1983'teki keşfinden itibaren PZR; gen klonlama, gen haritalanması, mutasyon taraması, DNA sekanslama gibi çok geniş uygulama alanlarında kullanılmaktadır. PZR aynı zamanda mRNA ifadelerinin ölçümünde de kullanışlı bir metottur. Nicel gerçek zamanlı PZR, nükleik asit amplifikasyonunun gerçek zamanlı zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir PZR yöntemidir. DNA sarmalına bağlanarak floresan ışığa yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob diziler aracılığı ile amplifikasyon miktarının tespit edilmesini sağlamaktadır. Her PZR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve nicel analizlerin yapılmasını sağlar (65, 66).

Nicel gerçek zamanlı PZR metotları olarak pek çok metot tanımlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan metot SYBR®Green boyama ile gerçekleştirilen PZR tekniğidir.

DNA'ya bağlanan SYBR®Green boyası kullanılan metot ile boya çift zincir DNA'ya bağlanırken, tek zincir DNA'ya bağlanmaz. SYBR®Green bağlanmanın ardından floresan ışığa verir. Tekrar eden reaksiyon boyunca örnek artan miktarda floresan sinyali verecek ve SYBR®Green boyasının bağlanabildiği daha fazla çift zincir ürün oluşacaktır. Reaksiyondaki floresan ışığının miktarı, reaksiyon sonrasında oluşan çift zincir DNA ürünü ile ilişkilidir (Şekil 2.5). SYBR®Green'deki düşüş, boyanın tüm çift zincirli yapılara bağlanması ile ortaya

çıkar. Bu yapılar özgül ürünler, özgül olmayan ürünler, primer dimerler ve diğer amplifikasyon ürünleri olabilir.

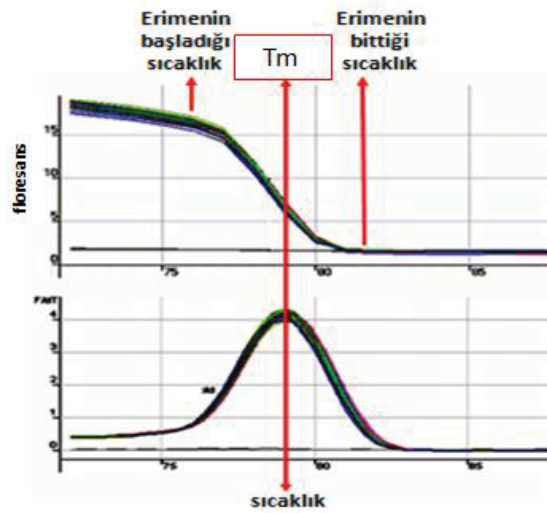


**Şekil 2.5.** SYBR®Green tekniği **A.** Başlangıç aşaması: Reaksiyonun başlangıcında ortamda SYBR®Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresans sinyal yoktur. **B.** Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile amplifikasyon sonucu SYBR®Green oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanır ve az miktarda floresan sinyal açığa çıkar. **C.** Primer uzaması: Amplifikasyon oranına bağlı olarak çift zincirli DNA'nın yapısına daha fazla boya katılarak floresans sinyal artar.

SYBR® Green tekniği ile gerçekleştirilen PZR'de mRNA ifadesinin miktar tayini için uygun primer seçimi en önemli aşamadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PZR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmaması gereklidir. RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu da SYBR®Green tekniği ile gerçekleştirilen PZR'nin başarısını tehdit eden bir diğer unsurdur. Özgül amplifikasyon ürünü elde etmek için, cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, ampikon uzunluklarının kısa tutulması

(120-250 baz) ve primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi dikkat edilmesi gereken noktalardır.

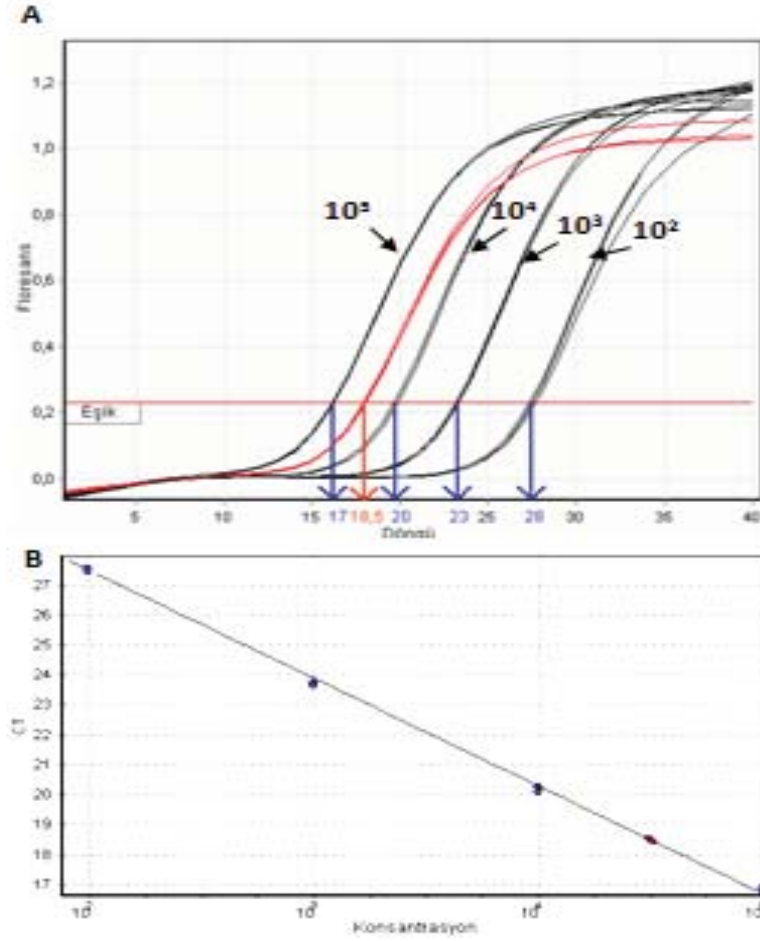
SYBR Green, primer dimerleri ve özgül olmayan PZR ürünleri gibi çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilir (67). Bu nedenle floresans artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermez. Amplifikasyon ürününün özgül olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi ile incelenir. Bununla birlikte nicel gerçek zamanlı PZR cihazlarında primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılabilmektedir (Şekil 2.6). Her çift zincirli DNA kendine özgül bir “melting temperature (erime sıcaklığı), “T<sub>m</sub>” (Çift zincirli DNA’nın %50’sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık) değerine sahiptir. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilir. Çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca interkale olan boya serbest kaldığı için ölçülen floresans miktarı azalmaya başlar. Bu şekilde elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun özgüllüğü belirlenebilir. T<sub>m</sub> değerinin tam olarak saptanabilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevi çizilebilir. Bu türev analiz, sıklıkla başvurulan bir yöntemdir.



Şekil 2.6. Erime eğrisi analizi

Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) nicel gerçek zamanlı PZR uygulamalarında önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında tespit

edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile ürünlerdeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Farklı PZR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (68). Florimetrik PZR yöntemi ile yapılan miktar tayini çalışmalarında, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak miktar tayini yapılmaktadır. Bu nedenle, nicel PZR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara mutlak miktar tayini adı verilir. Bir örneğin içinde yer alan kalıp miktarının diğer bir örnekle karşılaştırıldığı durumlarda mutlak miktar tayinine gerek yoktur. Bu durumda, standart örneğin içinde bulunan kalıp DNA miktarının bilinmesi önemli değildir. İyi ifade olan bir örneğin seri dilüsyonları standart olarak kullanılabilir. Bu çalışmalarda önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli miktar tayini (*relative quantitation*) adı verilir (69). Bir standart örnekten seri dilüsyonlar hazırlanır. Standart dilüsyonlara varsayılan bir konsantrasyon miktarı atfedilir ve genellikle bu miktar “varsayılan birim” (*arbitrary unit*) olarak ifade edilir. Bu standartlar kullanılarak, atfedilen konsantrasyon değerlerine karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek miktar tayini için gerekli olan regresyon eğrisi çizilir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Miktar tayini aşamasında, örneklerin Ct değerlerinin regresyon eğrisi üzerinde hangi atfedilen değeri temsil ettiklerine bakılarak göreceli bir miktar belirlenir. Bu şekilde nicel gerçek zamanlı PZR verilerinin analizinde; mutlak ve göreceli ölçüm kullanılır. Göreceli miktar tayini için, şekil 2.7’de 3’er kez tekrar edilmiş standart örnek seri dilüsyonlarının ( $10^5$  ile  $10^2$  arası konsantrasyon değerleri atfedilmiştir) Ct değerleri ile amplifikasyon eğrileri ve bu eğriler kullanılarak çizilen standart eğri bir örnek olarak verilmiştir.



**Şekil 2.7.** PZR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri. A. Standart dilüsyon örneklerinin amplifikasyon eğrisi ve Ct değerleri (mavi oklar) gösterilmiştir. Bir adet bilinmeyen örnek ve Ct değeri kırmızıyla gösterilmiştir. B. Standart örneklerin Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri gösterilmiştir. Bilinmeyen örnek kırmızı ile ifade edilmiştir.

## 2.7. Housekeeping Genlerin Nicel Gerçek Zamanlı PZR Çalışmalarındaki Önemi

Nicel gerçek zamanlı PZR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ifadesinin değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (70). Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ifade düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ifadesinin değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü

mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin ifade düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir. Bu nedenle farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ifade düzeyinin nicel olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak *housekeeping* genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak *housekeeping* genin ifade düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ifade düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır.

## **2.8. Temel Bileşen Analizi-TBA (*Principle Component Analysis-PCA*) Yöntemi**

TBA, çok gözlemlili ve çok parametrelili analizlerde izlenen değişkenlerin kendi içlerinde sergiledikleri varyasyonun korelasyon analizi yardımı ile vektörel ifade biçimidir. Toplam varyasyonun ne kadarının hangi varyantlar ve hangi gözlemler tarafından temsil edilebildiğini gösterir.

Genom analizinde yüksek ölçekli verilerin analizinde ve yorumunda sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Tek bir değişken için anlamlı istatistiksel analiz olmasa dahi, çoklu gözlemlerle birden fazla değişkenin hangilerinin hangi örnekler üzerinde ne kadar etkisi olduğunu göstermesi bakımından önemlidir. TBA yöntemi sıklıkla etkilenen alt grupların tanımlanması, aykırı tanımlanması ve veri yorumu için kullanılmaktadır. Yapılan nicel gen ifadesi analizi sonuçları TBA yöntemi kullanılarak XLSTAT (vers.2009.3.02) yazılımında değerlendirilmiştir.

## **2.9. Amaç**

Hücre içi yıkım mekanizması olan otofajide yıkım lizozomlarda gerçekleşmektedir. Bu nedenle lizozomların fonksiyonlarında ve yapılarında meydana gelen herhangi bir bozukluğun otofaji mekanizmasını doğrudan

etkileyeceği Niemann- Pick hastalığı, Sandhoff hastalığı, çoklu sülfataz eksikliği, MPSIIIA, GM1 gangliosidozis, nöronal seroid- lipofuskinosis (NCL) ve Pompe hastalığı gibi pek çok LDH' de etkili olduğu gösterilmiştir.

Gaucher hastalığında ise lizozomlarda sifingolipid ve diğer lipidlerin birikiminin lizozomal zar proteinlerinde işlev kaybına ve lizozom fonksiyon değişikliklerine neden olması, otofaji sürecinde de değişikliklerin olabileceğini düşündürmektedir.

Planlanan çalışmamızda, lizozomal depo hastalığı olan Gaucher hastalığında otofaji mekanizmasının gen ifadesi düzeyinde incelenmesi amacıyla hastalara ait fibroblast hücrelerinde çalışılması öngörülmüştür. Klinik seyirleri farklılık gösteren hastaların fibroblast hücrelerinde de moleküler değişikliklere sebep olabileceği, bu hücrelerden yola çıkarak Gaucher hastalığında değişen otofaji kinetiklerinin aydınlatılabileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışmada, klinik olarak farklı fenotipik özellikler gösteren 6 Gaucher hastasında, otofajinin çekirdeklenme aşamasında rol alan Beklin-1 ile kese uzaması ve kapanmasında rol alan ATG3, ATG5, ATG12, ATG4C, LC3 ve GABARAP mRNA ifadelerinin hücre içi açlığın oluşturulduğu ve oluşturulmadığı koşullarda, nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları ile analizi gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak GADPH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) geninin ifadesi değerlendirmeye alınmıştır.

### 3. BİREYLER VE YÖNTEM

#### 3.1. Bireyler

Tez çalışması kapsamında H.Ü. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji-Hepatoloji Ünitesi'nde Gaucher hastalığı tanısı alan hastalardan deri biyopsi örnekleri alınmıştır.

Hastaların enzim analizleri H.Ü. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Klinik Patoloji Laboratuvarları tarafından yapılmıştır.

Kontrol ve hasta fibroblastlarının hücre kültürü aşamaları H.Ü. Tıbbi Biyoloji A.D. Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Kontrol ve hasta fibroblastlarında *EBSS* ile hücre içi stres, Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik Programı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tüm çalışmalar bireylerden “ Bilgilendirilmiş Onam Formu” ve H.Ü. Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu'nun TBK 12/09 numaralı onay kararı ile gerçekleştirilmiştir.



**Tablo 3.1.** Hastalara ait bilgiler

No	Tanı	Mutasyon (Protein Düzeyinde)	Klinik Tablo
GH1	Tip I	p.L296V	Kemik bulguları, hepatosplenomegali
GH2	Tip III	p.D409H	Kemik bulguları, hepatosplenomegali, nörolojik bulgular
GH3	Tip III	p.L444P	Kemik bulguları, hepatosplenomegali, nörolojik bulgular
GH4	Tip III	p.L444P	Kemik bulguları, hepatosplenomegali
GH5	Tip I/III	p.D409H	Kemik bulguları, hepatosplenomegali (nörolojik ve kardiyolojik bulgular?- erken yaş)
GH6	Tip I/III	p.L444P	Kemik bulguları, hepatosplenomegali (nörolojik bulgu?-erken yaş)

### 3.2.Çalışmada Kullanılan Malzemeler

#### 3.2.1. RNA İzolasyonu

- TRIzol (Invitrogen)
- Kloroform (Applichem)
- İzopropanol (Applichem)
- Dietyl pirokarbonat (DEPC, Applichem)
- Etanol (Riedel)

#### 3.2.2. cDNA Sentezi

-ImProm-II™ tampon (5X) (Promega)	Tris-HCL KCL DTT	250 mM 250 mM 50 mM
-ImProm-II™ RT (Promega)		1 µl/ reaksiyon
-MgCl <sub>2</sub> (Promega)		25 mM
Oligo(dT)15 primeri (Promega)		0.5 µg/ µl
dNTP karışımı (Promega)		10 mM

### 3.2.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

-SYBR Green Karışımı (Floresan boya) (2X) (Sigma)	20 mM Tris-HCL, pH 8.3, 100 mM KCl, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP, 0.4 mM dTTP, Stabilizatör, 0.05 u/ µl Taq DNA polimeraz, Jump Start Taq antibody SYBR Green I boyası
-MgCl <sub>2</sub> (Sigma)	25 mM

### 3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

-Agaroz (Cambex)	Moleküler biyoloji kullanım saflığında
-Tris-asetat tamponu (TAE) (pH 8.0)	Tris baz (Merck) 2 M Glasiyel asetik asit (Merck) 1.14 ml Na <sub>2</sub> EDTA (Merck) 0.5 M
-Yükleme tamponu	Gliserol (Merck) 5.5 ml 1X TAE tamponu 4.5 ml Orange G boya (Merck) 0.01gr
- Etidyum bromür (Sigma)	10 mg/ ml distile su
- Moleküler ağırlık belirleyicisi	100 bç DNA Ladder (Promega) (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 baz çifti)

## 3.3. Yöntemler

### 3.3.1. RNA İzolasyonu

Gaucher hastalarına ait deri biyopsilerinden hücre kültürü ile elde edilen fibroblast hücreleri -80°C' de saklandı. Bu örnekler, -80°C'den çıkartılarak oda

sıcaklığına getirildikten sonra standart TRIzol izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu yapıldı. Aşağıda TRIzol izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu aşamaları verilmiştir:

1. Hücreler 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
2. 200 µl kloroform eklendikten sonra vorteks yapıldı ve 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi.
3. 12000 rpm de 15dk 4°C' de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası oluşan en üst fazda bulunan RNA toplandı ve 500 µl izopropanol içeren yeni tüpe alındı.
5. RNA ve izopropanol içeren tüp alt üst edilerek karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. 12000 rpm de 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatli bir şekilde döküldü. Pelet üzerine 1 ml DEPC ile muamele edilmiş %70'lik etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
8. RNA'nın degrade olmasını ve kırılmasını önlemek için düşük hızda (7500 rpm) 10 dk 4°C' de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası %70 etanol döküldü ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA peleti kurutuldu.
10. Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz içermeyen su (% 0,1 DEPC ile muamele edilmiş su) eklendi.
11. 60°C' de 10 dk bekletildi ve analize kadar -20°C' de, analiz sonrası -80°C' de saklandı.

### 3.3.2.cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, ImProm-II™ reverse transkriptaz enzimi (Promega) ve oligo(dT)15 primeri kullanıldı. Kalıp olarak 1µg RNA kullanıldı ve 0.5 µg/ µl oligo(dT)15 primeri ve RNaz içermeyen su ile 5 µl'ye tamamlanarak 70°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 5 dk bekletildi. Aynı bir tüpte 15 µl reverse transkripsiyon karışımı hazırlandı.

Reverse transkripsiyon karışımı:

	Final konsantrasyon	Hacim
RNaz içermeyen su		6,6 µl
Improm-İltm tampon (5X)(Promega)	1X	4 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3mM	2,4 µl
dNTP karışımı (10 mM)	0,5 mM	1 µl
Improm-İltm Reverse Transkriptaz		1 µl
<hr/>		
Toplam		15 µl

Toplam 20 µl olacak şekilde 5 µl RNA + primer karışımı, 15 µl reverse transkripsiyon karışımı ile birleştirilerek reverse transkripsiyon aşağıdaki koşullarda Applied Biosystems-9700 PZR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi:

25°C' de	5 dk
42°C' de	60 dk
70°C' de	15 dk

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri daha verimli kullanılmak amacıyla 80 µl'ye sulandırıldı (20 µl cDNA +60 µl distile su = 80 µl).

### 3.3.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gaucher hastalarında *housekeeping* mRNA ifadesi fibroblast hücrelerinde *Corbett Rotor-gene* 6000 gerçek zamanlı PZR cihazında incelendi. Lizozomal kusuru bulunmayan üç bireye ait fibroblast hücresi ise kontrol olarak kullanıldı. Nicel

gerçek zamanlı PZR deneylerinde, primer seçimleri özgül olmayan bağlanmayı engelleyecek şekilde gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında GAPDH house-keeping genine özgü primer sentezletildi. cDNA'lar nicel gerçek zamanlı PZR tekniği ve SYBR Green floresan boyası kullanılarak çoğaltıldı. Bu amplifikasyon sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green I miktarı florimetrik deteksiyon filtresiyle ölçülmektedir. Bu ölçümlerde floresans, DNA ürünü ile orantılı olarak değişmektedir. *Rotor-gene* 6000 cihazı, erime eğrisi analizi yapabilme özelliği ile primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hataları gözlemlemeye de olanak sağlamaktadır.

Nicel gerçek zamanlı PZR reaksiyonları hazırlanırken, kontrol fibroblast hücrelerinden elde edilen cDNA örneğinden 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlandı ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında *Rotor-gene* 6000 analiz programı ile standart eğriler çizildi. Deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanılmıştır. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır.

Nicel gerçek zamanlı PZR koşulları;

	Hacim
2X SYBR Green karışımı	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
Forward primer (10 pmol/ µl)	0,4 µl
Reverse primer (10 pmol/ µl)	0,4 µl
cDNA	2 µl
Distile su	1 µl
<hr/> Toplam	<hr/> 10 µl

10 µl nicel gerçek zamanlı PZR reaksiyonu *Rotor-gene* 6000 cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

94°C' de 2 dk }  
 94°C' de 2 s } 50 döngü  
 60°C' de 20 s }

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri, Tm dereceleri ve cDNA üzerinde çoğalttıkları dizilerin uzunlukları

PRIMER	SEKANS	TM	AMPLİKON BÜYÜKLÜĞÜ
Atg3-F	5'-CGGTCCTCAAGGAATCAAAG-3'	52	100 bç
Atg3-R	5'-TTGGACAGTGGTGGACTAGGT-3'	54	
Atg5-F	5'-ATAGAGTAGGTTTGGCTTTG-3'	48	120 bç
Atg5-R	5'-ATATGTTGGCTGTGGGATGA-3'	50	
GABARAP-F	5'-GCGAGAAAATCCGAAAGAAA-3'	48	120 bç
GABARAP-R	5'-GATCAGAAGGCACCAGGTATTT-3'	53	
Atg4C-F	5'-GCATAAAGGATTTCCCTCTTGA-3'	51	100 bç
Atg4C-R	5'-GCTGGGATCCATTTTTCG-3'	48	
Atg12-F	5'-ACAAAGAAGTGGGCAGTAGAGC-3'	55	200 bç
Atg12-R	5'-CAGTTTACCATCACTGCCAAAA-3'	51	
Beklin-1-F	5'-AGGTTGAGAAAGGCGAGACA-3'	52	150 bç
Beklin-1-R	5'-GCTTTTGTCCACTGCTCCTC-3'	54	
LC3-F	5'-GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTG-3'	58	250 bç
LC3-R	5'-GTGTCCGTTACCAACAGGAAG-3'	58	
GAPDH-F	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	53	100 bç
GAPDH-R	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	51	

### 3.3.4. Verilerin değerlendirilmesi

Nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonlarından, Rotor- gene 6000 cihazının 1.7 versiyonu ve iCycler BIO-RAD cihazı ile nicel sonuçlar elde edilmiştir.

TBA veri setindeki çoğu varyasyonu koruyarak datanın boyutunu azaltan bir matematiksel algoritmadır. Elde edilen nicel sonuçların analizi TBA ile gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

Lizozomal kusuru bulunmayan üç bireyin fibroblast hücrelerinden ve hastaların fibroblast hücrelerinden RNA izole edildi. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı.

mTOR- bağımlı bir yolak ile otofajiyi indüklemek amacıyla fibroblast hücrelerine *EBSS* (*Earle's Balanced Salt Solution*) ile açlık uygulandı. EBSS, memeli hücrelerinin belirlenmiş kimyasal bir ortam içerisinde bakımını gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Tuz dengesi bulunan solüsyon, *in vitro*' da hücrelerin yapısal ve fizyolojik bütünlüğünü muhafaza edecek bir ortam sağlar. EBSS, bir CO<sub>2</sub> ortamı içinde hücrelerin kısa süreli bakımını gerçekleştirmektedir. Farklı zaman aralıklarında *EBSS* uygulanan ortamda serum ve amino asitler uzaklaştırılmaktadır. Çalışmamızda kontrol fibroblast grubuna ve Gaucher hastalarına ait fibroblast hücrelerine *EBSS* ile 4 saat açlık uygulandı.

Otofaji mekanizmasında rol oynayan ATG3, ATG4C, ATG5, ATG12, Beklin-1, GABARAP ve LC3 genlerine ait ifade düzeyleri, nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edildi.

Gen ifadelerinin miktar analizinde standart, standart-1, standart-2, standart-3 seyreltmeleri ile standart grafik çizildi. İncelenen örneklerin Ct değerleri standart eğri grafiğine uyarlanarak nicel değerleri hesaplandı.

ATG3, ATG4C, ATG5, ATG12, Beklin-1, GABARAP ve LC3 gen ifadeleri kontrol fibroblast grubu ve Gaucher fibroblastları arasında nicel olarak karşılaştırılmıştır. İlgilenilen gen ifadeleri GAPDH'e oranlanarak göreceli nicel değerlendirme yapılmıştır (Bkz. EK 1).

### 4.1. RNA İzolasyonu

İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri Thermo Scientific NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer cihazında gerçekleştirilmiştir. RNA

kalitesinin beklenen düzeyde olduğunu göstermek amacıyla 28S ve 18S rRNA bantları, RNA jeli elektroforezinde gösterilebilir.

NanoDrop® cihazında elde edilen spektrofotometrik değerler ve konsantrasyonları Tablo 4.1' de verilmektedir.

**Tablo 4.1.** RNA örneklerinin absorbans değerleri ve konsantrasyonları

RNA	Konsantrasyon ( ng/μl)	A: ( 260/ 280)
K1	513,0	1,93
K2	484,0	1,73
K3	784,4	1,83
GH1	204,0	1,81
GH2	172,9	1,82
GH3	402,2	1,91
GH4	179,1	1,80
GH5	2125,0	1,94
GH6	792,0	1,93

A: Absorbans

## 4.2. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

### 4.2.1. GAPDH gen ifadesi bulguları

GAPDH gen ifadesinin miktar analizinde, kontrol fibroblast hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin onbeşinci döngüden itibaren amplifiye oldukları gözlenmiştir. Erime eğrisinde tüm örnekler özgül bir T<sub>m</sub> derecesinde tepe noktası vermiş ve agaroz jel elektroforezinde 100 bp uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> (toplam RNA konsantrasyonunun dağılımı) değerinin >0.99 olarak elde edilmesi reaksiyon veriminin iyi olduğunu göstermektedir. Standart eğri grafiğinde reaksiyon veriminin bir diğer parametresi olan eğim (*slope*-M) değerinin -3,6 < M < -3,1 aralığında olması (-3,12) reaksiyonun beklenen verimde (%90-100) olduğunu göstermektedir (Bkz. EK 2).



#### 4.2.2. ATG4C gen ifadesi bulguları

ATG4C gen ifadesinin miktar analizinde, kontrol fibroblast hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin yirminci döngüden itibaren amplifiye oldukları gözlenmiştir. Erime eğrisinde tüm örnekler özgül bir Tm derecesinde tepe noktası vermiş, agaroz jel elektroforezinde 100 bç uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan R<sup>2</sup> (toplam RNA konsantrasyonunun dağılımı) değerinin >0.99 olarak elde edilmesi reaksiyon veriminin iyi olduğunu göstermektedir. Standart eğri grafiğinde reaksiyon veriminin bir diğer parametresi olan eğim (*slope-M*) değerinin yaklaşık olarak  $-3,6 < M < -3,1$  aralığında olması reaksiyonun beklenen verimde (%90-100) olduğunu göstermektedir (Bkz. EK 3).

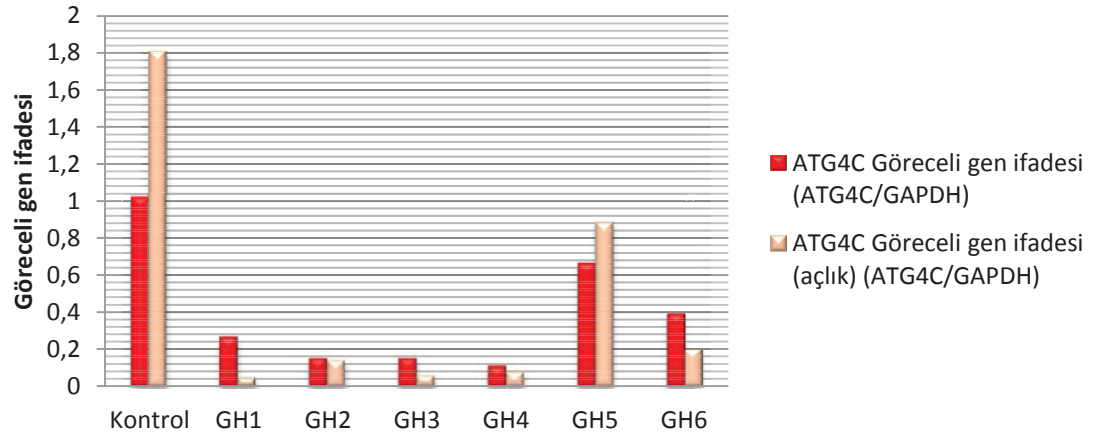
ATG4C gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri Tablo 4.2’de verilmektedir.

**Tablo 4.2.** ATG4C gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri

ATG4C		
Örnekler	Göreceli gen ifadesi (ATG4C/GAPDH)	Göreceli gen ifadesi (açlık) (ATG4C/GAPDH)
Kontrol	1,02	1,81
GH1	0,27	0,05
GH2	0,15	0,14
GH3	0,15	0,06
GH4	0,11	0,08
GH5	0,67	0,89
GH6	0,39	0,2

İzolasyon membranının uzaması aşamasında LC3 ve GABARAP moleküllerinin proteolitik kesimini gerçekleştiren ATG4C’nin mRNA ifade seviyeleri, kontrol fibroblastta kıyasla tüm hastalarda azalmıştır. Hücre içi açlığın oluşturulduğu koşullarda, kontrol fibroblastlarda ATG4C mRNA ifade seviyeleri

artmıştır. Hasta fibroblastlarında açlığın olmadığı koşullara kıyasla, hücre içi açlıkta GH1 ve GH3'te ATG4C mRNA ifade seviyeleri azalırken; GH2, GH4, GH5 ve GH6'da belirgin bir fark tespit edilmemiştir. ATG4C gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimlerine ait grafik, Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** ATG4C gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği

#### 4.2.3. ATG12 gen ifadesi bulguları

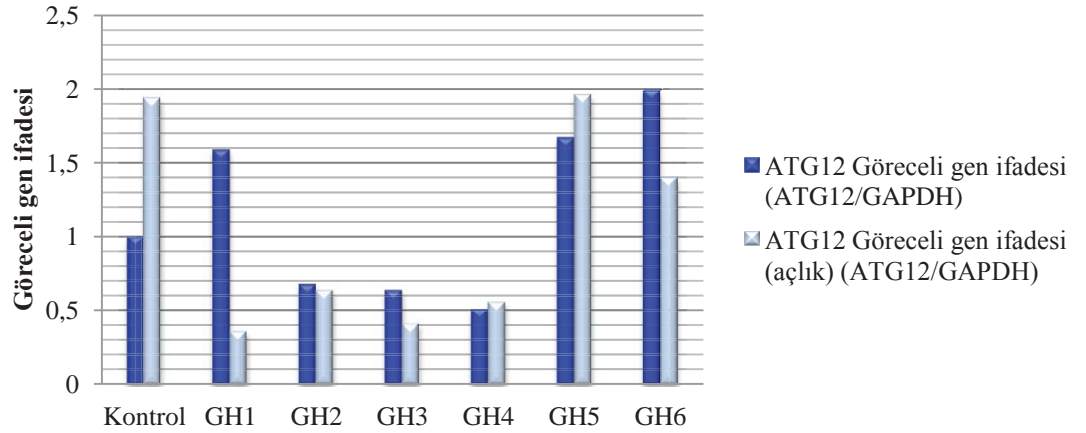
ATG12 gen ifadesinin miktar analizinde, kontrol fibroblast hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin yirminci döngüden itibaren amplifiye oldukları gözlenmiştir. Erime eğrisinde tüm örnekler özgül bir Tm derecesinde tepe noktası vermiş, agaroz jel elektroforezinde 200 bp uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan  $R^2$  (toplam RNA konsantrasyonunun dağılımı) değerinin yaklaşık 0.99 olarak elde edilmesi reaksiyon veriminin iyi olduğunu göstermektedir. Standart eğri grafiğinde reaksiyon veriminin bir diğer parametresi olan eğim (*slope-M*) değerinin  $-3,6 < M < -3,1$  aralığında olması reaksiyonun beklenen verimde (%90-100) olduğunu göstermektedir (Bkz. EK 4).

ATG12 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri Tablo 4.3'te verilmektedir.

**Tablo 4.3.** ATG12 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri

ATG12		
Örnekler	Göreceli gen ifadesi (ATG12/GAPDH)	Göreceli gen ifadesi (açlık) (ATG12/GAPDH)
Kontrol	1	1,94
GH1	1,59	0,36
GH2	0,68	0,64
GH3	0,64	0,41
GH4	0,51	0,56
GH5	1,67	1,96
GH6	1,99	1,4

İzolasyon membranının uzaması aşamasında I. konjugasyon sisteminde rol alan ATG12 geninin ifade değerleri kontrol fibroblasta kıyasla GH1, GH5 ve GH6'da artarken; GH2, GH3 ve GH4'te azalmıştır. Hücre içi açlığın oluşturulduğu koşullarda, kontrol fibroblastlarda ATG12 geninin ifadesi artmıştır. Hasta fibroblastlarında açlığın olmadığı koşullara kıyasla, hücre içi açlıkta ATG12 gen ifadesi GH1 ve GH6'da azalırken; GH5'te artmış, GH2, GH3 ve GH4'te ise kontrole göre belirgin bir fark gözlenmemiştir. ATG12 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimlerine ait grafik, Şekil 4.2'de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** ATG12 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği

#### 4.2.4. Beklin-1 gen ifadesi bulguları

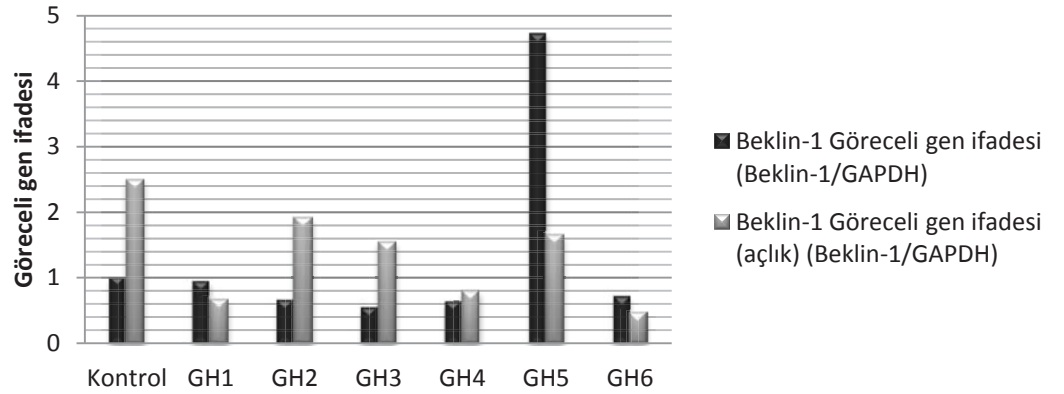
Beklin-1 gen ifadesinin miktar analizinde, kontrol fibroblast hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin yirminci döngüden itibaren amplifiye oldukları gözlenmiştir. Erime eğrisinde tüm örnekler özgül bir  $T_m$  derecesinde tepe noktası vermiş, agaroz jel elektroforezinde 150 bp uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan  $R^2$  (toplam RNA konsantrasyonunun dağılımı) değerinin yaklaşık 0.99 olarak elde edilmesi reaksiyon veriminin iyi olduğunu göstermektedir. Standart eğri grafiğinde reaksiyon veriminin bir diğer parametresi olan eğim (*slope-M*) değerinin yaklaşık  $-3,6 < M < -3,1$  aralığında olması reaksiyonun beklenen verimde (%90-100) olduğunu göstermektedir (Bkz. EK 5).

Beklin-1 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri Tablo 4.4'te verilmektedir.

**Tablo 4.4.** Beklin-1 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri

<b>Beklin-1</b>		
Örnekler	Göreceli gen ifadesi (Beklin-1/GAPDH)	Göreceli gen ifadesi (açlık) (Beklin-1/GAPDH)
Kontrol	1	2,5
GH1	0,94	0,66
GH2	0,66	1,91
GH3	0,55	1,55
GH4	0,64	0,79
GH5	4,73	1,65
GH6	0,72	0,46

Otofajik veziküllerin çekirdeklenmesi aşamasını düzenleyen Beklin-1 mRNA düzeyinde ifadesi kontrol fibroblasta kıyasla, GH5'te belirgin bir artış göstermektedir. GH1, GH2, GH3, GH4 ve GH6'da ise Beklin-1 gen ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Hücre içi açlığın oluşturulduğu koşullarda kontrol fibroblastlarında Beklin-1 gen ifadesi artmıştır. Hasta fibroblastlarında açlığın olmadığı koşullara kıyasla, hücre içi açlıkta Beklin-1 gen ifadesi GH1, GH5 ve GH6'da açlık koşullarında azalırken; GH2 ve GH3'te artmış, GH4'te belirgin bir fark gözlenmemiştir. Beklin-1 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimlerine ait grafik, Şekil 4.3'te verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Beklin-1 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği

#### 4.2.5. GABARAP gen ifadesi bulguları

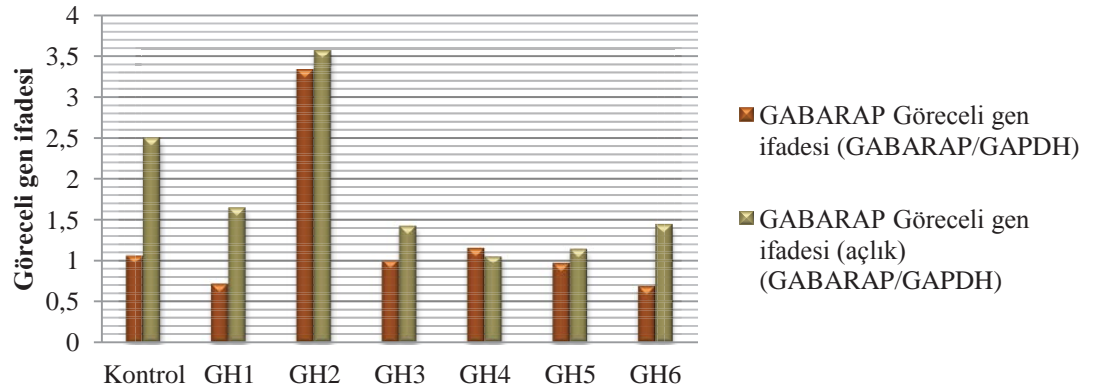
GABARAP gen ifadesinin miktar analizinde, kontrol fibroblast hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin yirminci döngüden itibaren amplifiye oldukları gözlenmiştir. Erime eğrisinde tüm örnekler özgül bir Tm derecesinde tepe noktası vermiş, agaroz jel elektroforezinde 120 bp uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan  $R^2$  (toplam RNA konsantrasyonunun dağılımı) değerinin yaklaşık 0.99 olarak elde edilmesi reaksiyon veriminin iyi olduğunu göstermektedir. Standart eğri grafiğinde reaksiyon veriminin bir diğer parametresi olan eğim (*slope-M*) değerinin yaklaşık  $-3,6 < M < -3,1$  aralığında olması reaksiyonun beklenen verimde (%90-100) olduğunu göstermektedir (Bkz.EK 6).

GABARAP gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri Tablo 4.5'te verilmektedir.

**Tablo 4.5.** GABARAP gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri

<b>GABARAP</b>		
<b>Örnekler</b>	<b>Göreceli gen ifadesi (GABARAP/GAPDH)</b>	<b>Göreceli gen ifadesi (açlık) (GABARAP/GAPDH)</b>
Kontrol	1,06	2,49
GH1	0,71	1,65
GH2	3,33	3,56
GH3	0,99	1,41
GH4	1,15	1,05
GH5	0,95	1,14
GH6	0,68	1,43

Otofagozom biyogenezinin maturasyon öncesi aşamasını düzenleyen GABARAP geninin ifadesi kontrol fibroblastlara kıyasla, GH2’ de belirgin bir artış göstermiştir. GH3, GH4 ve GH5’te GABARAP geninin ifadesinin kontrol fibroblastlara yakın değerde olduğu tespit edilirken; GH1 ve GH6’da GABARAP gen ifadesi azalmıştır. Hücre içi açlığın oluşturulduğu koşullarda, kontrol fibroblast hücrelerinde GABARAP gen ifadesi artmıştır. Hasta fibroblastlarında açlığın olmadığı koşullara kıyasla, hücre içi açlıkta GH1, GH3 ve GH6’da GABARAP gen ifadesi artarken, GH2, GH4 ve GH5’te belirgin bir fark gözlenmemiştir. GABARAP gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimlerine ait grafik, Şekil 4.4’te verilmiştir.



**Şekil 4.4.** GABARAP gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği

#### 4.2.6. ATG3 gen ifadesi bulguları

ATG3 gen ifadesinin miktar analizinde, kontrol fibroblast hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin yirminci döngüden itibaren amplifiye oldukları gözlenmiştir. Erime eğrisinde tüm örnekler özgül bir Tm derecesinde tepe noktası vermiş, agaroz jel elektroforezinde 100 bç uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiştir. Standart eğride hesaplanan  $R^2$  (toplam RNA konsantrasyonunun dağılımı) değerinin yaklaşık 0.99 olarak elde edilmesi reaksiyon veriminin iyi olduğunu göstermektedir. Standart eğri grafiğinde reaksiyon veriminin bir diğer parametresi olan eğim (*slope-M*) değerinin yaklaşık  $-3,6 < M < -3,1$  aralığında olması reaksiyonun beklenen verimde (%90-100) olduğunu göstermektedir (Bkz. EK 7).

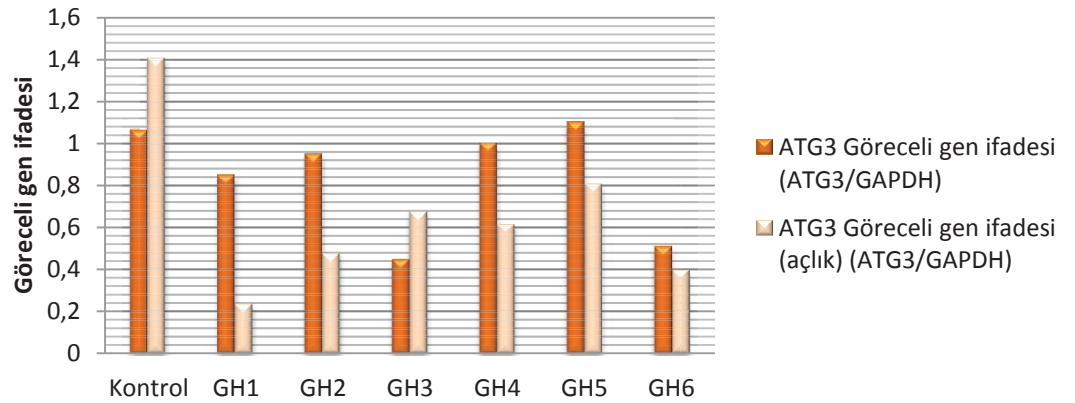
ATG3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri Tablo 4.6'da verilmektedir.



**Tablo 4.6.** ATG3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri

ATG3		
Örnekler	Göreceli gen ifadesi (ATG3/GAPDH)	Göreceli gen ifadesi (açlık) (ATG3/GAPDH)
Kontrol	1,06	1,41
GH1	0,85	0,24
GH2	0,95	0,48
GH3	0,45	0,68
GH4	1,0	0,62
GH5	1,1	0,81
GH6	0,51	0,4

İzolasyon membranının uzaması aşamasında LC3 ve GABARAP moleküllerine lipid konjugasyonunda rol alan ATG3 gen ifadesi kontrol fibroblastlara kıyasla GH1, GH2, GH4 ve GH5'te belirgin bir fark gözlenmezken; GH3 ve GH6'da azalmıştır. Hücre içi açlığın oluşturulduğu koşullarda, kontrol fibroblastlarda ATG3 gen ifadesi artmıştır. Hasta fibroblastlarında açlığın olmadığı koşullara kıyasla, hücre içi açlıkta ATG3 gen ifadesi GH1, GH2, GH3 ve GH4'te azalırken; GH5 ve GH6'da belirgin bir fark gözlenmemiştir. ATG3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimlerine ait grafik, Şekil 4.5'te verilmiştir.



**Şekil 4.5.** ATG3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği

#### 4.2.7. ATG5 gen ifadesi bulguları

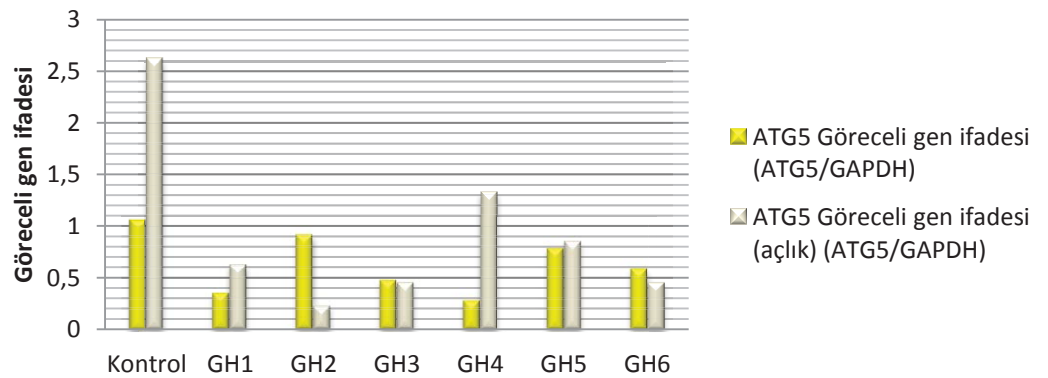
ATG5 gen ifadesinin miktar analizinde, kontrol fibroblast hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin amplifikasyonunun verimli bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Nicel gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre, erime eğrisinde standartlar ve örnekler aynı Tm derecesinde tepe noktası vermiş, agaroz jel elektroforezinde 120 baz çifti (bç) uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiştir (Bkz. EK 8).

ATG5 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri Tablo 4.7' de verilmektedir.

**Tablo 4.7.** ATG5 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri

ATG5		
Örnekler	Göreceli gen ifadesi (ATG5/GAPDH)	Göreceli gen ifadesi (açlık) (ATG5/GAPDH)
Kontrol	1,06	2,62
GH1	0,35	0,63
GH2	0,91	0,23
GH3	0,47	0,45
GH4	0,28	1,33
GH5	0,78	0,85
GH6	0,59	0,45

İzolasyon membranının uzaması aşamasında ATG12 ile konjuge molekül ATG5 gen ifadesi seviyesi kontrol fibroblastlara kıyasla tüm hastalarda azalmıştır. Hücre içi açlığın oluşturulduğu koşullarda, kontrol fibroblastlarında ATG5 gen ifadesi artmıştır. Hasta fibroblastlarında açlığın olmadığı koşullara kıyasla, hücre içi açlıkta ATG5 gen ifadesi GH1 ve GH4'te artarken, GH2'de azalmış, GH3, GH5 ve GH6'da ise belirgin bir fark gözlenmemiştir. ATG5 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimlerine ait grafik, Şekil 4.6'da verilmiştir.



**Şekil 4.6.** ATG5 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği

#### 4.2.8. LC3 gen ifadesi bulguları

LC3 gen ifadesinin miktar analizinde, kontrol fibroblast hücrelerinden hazırlanan standartların ve örneklerin amplifikasyonunun verimli bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Nicel gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre, erime eğrisinde standartlar ve örnekler aynı Tm derecesinde tepe noktası vermiştir, agaroz jel elektroforezinde 250 baz çifti (bç) uzunluğunda beklenen ürün gözlenmiştir (Bkz. EK 9).

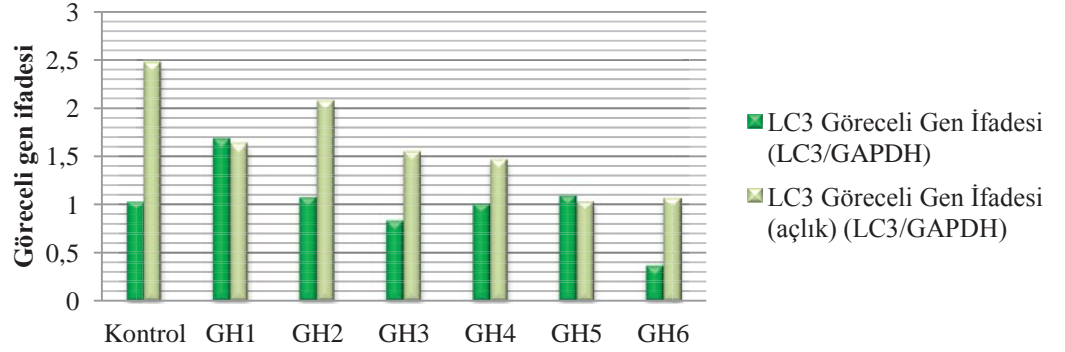
LC3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri Tablo 4.8’de verilmektedir.

**Tablo 4.8.** LC3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblastta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri

LC3		
Örnekler	Göreceli Gen İfadesi (LC3/GAPDH)	Göreceli Gen İfadesi (açlık) (LC3/GAPDH)
Kontrol	1,03	2,47
GH1	1,68	1,63
GH2	1,08	2,08
GH3	0,83	1,55
GH4	1	1,46
GH5	1,1	1,03
GH6	0,36	1,07

İzolasyon membranının uzaması aşamasında II. konjugasyon sisteminde yer alan ve lipid taşınımını gerçekleştiren LC3 gen ifadesi kontrol fibroblastlara kıyasla GH1’de artarken, GH3 ve GH6’da azalmış; GH2, GH3, GH4 ve GH5’te ise belirgin bir fark gözlenmemiştir. Hücre içi açlığın oluşturulduğu koşullarda, kontrol fibroblastlarda LC3 gen ifadesi artmıştır. Hasta fibroblastlarında açlığın olmadığı koşullara kıyasla, hücre içi açlıkta LC3 gen ifadesi GH1 ve GH6’da belirgin bir fark göstermezken; GH2, GH3, GH4 ve GH6’da artmıştır. LC3 gen ifadesinin miktar

analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimlerine ait grafik, Şekil 4.7’de verilmiştir.



**Şekil 4.7.** LC3 gen ifadesinin miktar analizinden elde edilen kontrol fibroblasta göre hastalara ait fibroblastlardaki gen ifadesi değişimleri grafiği

### 4.3. TBA ile Nicel Gen İfadesi Analizleri

Elde edilen nicel gen ifadesi analizi sonuçlarının TBA yöntemi kullanılarak incelenmesi sonucunda elde edilen korelasyon matrisi ve tablolar aşağıda verilmiştir. Korelasyon matrisi farklı gözlemlerin (genlerin) veri seti içinde birbirleri ile ne oranda korelasyon sergilediklerini gösterir. Tablo 4.9’da, elde edilen nicel gen ifadelerinin korelasyon matrisinde %50 ve üzeri korelasyon sergileyen varyasyonlar işaretlenmiştir.

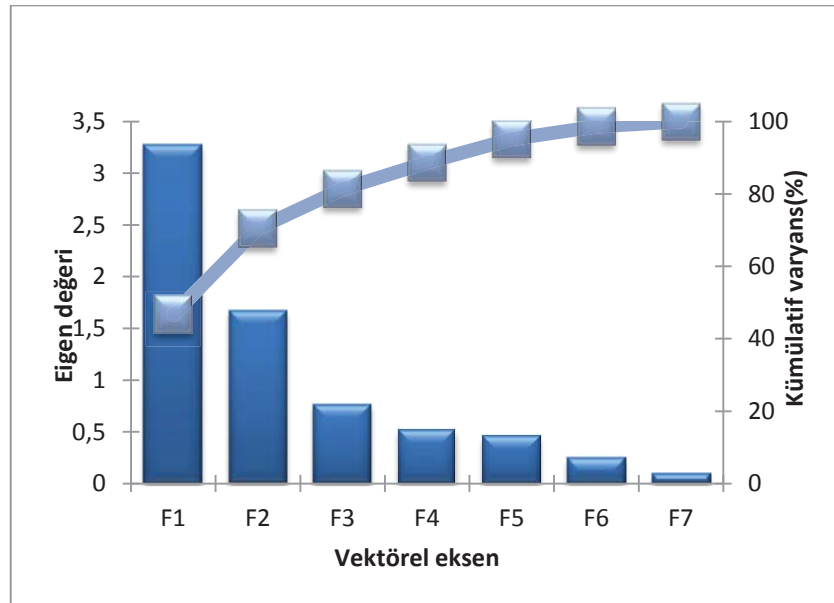
**Tablo 4.9.** Nicel gen ifadelerinin korelasyon matrisi

Değişkenler	Beklin-1	ATG3	ATG5	ATG12	ATG4C	LC3	GABARAP
Beklin-1	<b>1</b>						
ATG3	<b>0,504</b>	<b>1</b>					
ATG5	0,280	<b>0,610</b>	<b>1</b>				
ATG12	0,389	0,384	0,353	<b>1</b>			
ATG4C	0,462	<b>0,727</b>	<b>0,801</b>	<b>0,660</b>	<b>1</b>		
LC3	0,278	0,239	0,450	-0,097	0,309	<b>1</b>	
GABARAP	0,066	0,078	0,188	-0,260	0,043	<b>0,534</b>	<b>1</b>

Eigen değerleri: Bir veri seti için ortaya konulan “toplam” varyasyonun vektörel olarak ifadesidir. Hesaplanan vektörel değerler, veri seti içinde yer alan varyasyonun belirli kesirlerini içerir ve her kesir içinde yer alan gözlem noktalarının (genlerin) varyasyona etkisi farklıdır. Hastalara ait tüm veri setinden elde edilen Eigen değerleri ve bu değerlerin toplam varyasyon içinde temsil ettikleri oranlar Tablo 4.10 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.

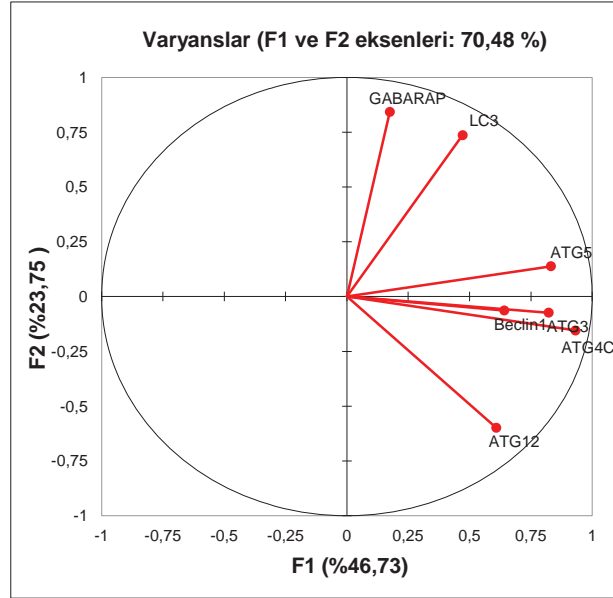
**Tablo 4.10.** Hastalara ait tüm veri setinin Eigen değerleri ve bu değerlerin toplam varyasyon içinde temsil ettikleri oranlar

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Eigen değeri	3,271	1,662	0,763	0,511	0,454	0,241	0,098
Varyans(%)	46,726	23,750	10,895	7,296	6,484	3,447	1,403
Toplam %	46,726	70,475	81,370	88,666	95,150	98,597	100,000



**Şekil 4.8.** Hastalara ait tüm veri setinin Eigen değerleri ve bu değerlerin toplam varyasyon içinde temsil ettikleri oranlar grafiği. İlk iki vektör, toplam

varyasyonun %70,48'ini temsil etmektedir. Bu nedenle sadece ilk iki vektör kullanılarak ortaya çıkan TBA grafiği aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.9.** Vektörel olarak F1 ve F2 vektörlerinde yer alan genlerin örnekler üzerinde dağılımı

Korelasyon matrisi ile oluşturulan tablo ve grafikler genlerin birlikte nasıl hareket ettikleri göstermektedir. F1 vektörü toplam varyansın %46,73'ünü temsil eder ve en belirgin etkiye sahiptir. Buna göre F1 ekseninde standart sıfır (0) noktasına göre Beklin-1, ATG5, ATG4C ve ATG3 genlerinin varyans değerlerinin birlikte hareket ettiği gözlenmektedir. Diğer yandan F2 ekseninde GABARAP ile LC3 genlerinin birlikte hareket ettiği gözlenmiştir. Ancak F2 vektörü total varyansın %23,75'lik kısmını oluşturduğundan daha az etkiye sahiptir.

## 5. TARTIŞMA

Lizozom oluşumunda ve fonksiyonunda meydana gelen aksaklıklar, hücre içinde metabolize olmayan substratların birikmesine ve LDH'nin ortaya çıkmasına neden olur. Lizozomal depo hastalıklarında, lizozom bağıntılı temel bir hücrel mekanizma olan otofaji mekanizmasında bozukluklar görüldüğüne dair yayınlar vardır (8, 40, 41, 42). Otofaji, hücre içindeki sitoplazma parçaları ve organellerin, otofajik vezikül denilen kesecik benzeri yapılar içinde hapsedilmek suretiyle lizozomlara taşınması ve burada sindirilmesidir (71). Bu mekanizmada, lizozomlara taşınan kargo, lizozomal hidrolazların etkisiyle yapıtaşlarına ayrılır. Ortaya çıkan yıkım ürünü moleküller, hücrenin yeniden kullanımı için lizozom zar proteinleri tarafından sitoplazmaya geri taşınırlar. Bu açıdan, otofaji hücre hayatı ve stres direnci için gerekli ve önemli bir mekanizmadır. Fakat bazı koşullarda uzun ve yoğun uyarılmış otofajinin hücreyi apoptozdan farklı, otofajik hücre ölümü adı verilen bir programlı hücre ölüm yoluna götürdüğü tanımlanmıştır (71).

Lizozomal proteinlerden kaynaklanan hastalıkların yanında, lizozomda bulunan lizozomal hidrolazları kodlayan genlerde görülen mutasyonlar da lizozomal depo hastalıklarına neden olur. Gaucher hastalığında, bir lizozomal hidrolaz olan asit  $\beta$ -glikosidaz enzimini kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar ve sapozin C yetersizlikleri etkindir.

Çalışmamızda, kontrol fibroblast hücreleri ile gerçekleştirilen nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları sonucunda, çalışılan otofaji gen ifadelerinin hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullar ile karşılaştırıldığında, açlık durumunda belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (Bkz. EK 10). Bu durum, besin ve büyüme faktörü yetersizliği durumunda otofajinin, parçalanan yapıtaşları (amino asitler, yağ asitleri gibi) ve yeni hücre bileşenleri üretilmesi ile enerji dengesinin korunması için hücre tarafından bir geri kazanım mekanizması olarak kullanıldığına işaret etmektedir.



Hasta fibroblast hücrelerinde hücre içi stresin olduğu koşullarda ise ATG3, ATG4C ve ATG5 gen ifadeleri kontrole göre azalmıştır. Otofaji her ne kadar hücrenin stres koşulları altında aktive olarak, hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizma olsa da, paradoksal olarak aşırı stres altında hücreyi kaspaz bağımsız yoldan üzerinden, apoptotik olmayan hücre ölümüyle öldürebilmektedir (71). Bu nedenle stres koşulları altında otofaji aktivasyonu dengede tutulmalıdır. Gaucher hasta fibroblastlarında görülen lizozomal hasar, hücre için var olan bir stres faktörü iken; serum, amino asit ve glikoz gibi temel besin maddelerinin eksikliği hücre için ikinci bir stres faktörü oluşturmaktadır. Bu koşullar altında, aşırı otofaji aktivasyonundan kaçınmak amacıyla, bazı gen ifadelerinin düşmesi, biyolojik olarak hücre içi homeostazisin sağlanması açısından gereklidir.

GH1 (p.L296V), klinik olarak Tip I Gaucher tanısı almıştır. Kemik bulguları ve hepatosplenomegali belirtileri gösteren, tedavi alan bir hastadır. Çalışmamızda GH1’de hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda gerçekleştirilen nicel analizler sonucunda Beklin-1 gen ifadesinde, kontrol fibroblastlara kıyasla bir değişim gözlenmemiştir (Bkz. EK 11). Pacheco ve diğ. (40)’nin Tip 1 tanısı alan Gaucher hastalığı fibroblast hücre kültürlerinde yaptıkları çalışma ile uyumludur. Beklin-1, otofagozomların oluşumunda rol oynayan PI3K, Vps34’ü içeren protein kümesinin en önemli düzenleyici proteindir. GH1 için Beklin-1 gen ifadesinde kontrol grubuna yakın değerlerin elde edilmesi, otofajik veziküllerin çekirdeklenmesi aşamasında herhangi bir değişikliğin olmadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda GH1’de, ATG5 gen ifadesinde kontrol fibroblast grubuna kıyasla yaklaşık 3 katlık bir azalma gözlenirken; ATG5 ile konjuge olan ATG12 gen ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir.

Otofajik kese uzamasında görev alan birinci ubikitinasyon benzeri sisteminde, ATG12 proteininin ATG5’e bağlanması ve ATG12-ATG5-ATG16 kompleksinin oluşum reaksiyonu katalizlenmektedir. Kompleksin oluşumu, otofajik

veziküllerin uzamasında E3 benzeri bir rol üstlenirken, diğer yandan otofajik vezikül oluşum bölgesini belirlemede görev aldığı öne sürülmüştür (11, 12). GH1’ de Beklin-1 gen ifadesinin değişmemesi otofagozom çekirdeklenmesinde bir farklılık olmadığını göstermektedir. ATG5 ve ATG12 gen ifadelerinden elde edilen değerler ise kese zarı uzaması ve kapanmasına kadar geçen otofagozom biyogenezinde değişiklikler olduğunu düşündürmektedir.

1 no’lu hastada ikinci ubiquitinasyon benzeri sistemde yer alan ATG4C gen ifadesinde kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlenirken, LC3 gen ifadesinde artış tespit edilmiştir. Bu sistemde, otofagozom oluşumunun tamamlanabilmesi için LC3’ün C-ucundaki beş aminoasitin ATG4C proteazı tarafından kesilmesi ve fosfotidil etanolamin (PE)’nin LC3-I’e kovalent bağlanması gerekmektedir (16). Azalan ATG4C gen ifadesi, LC3’ün proteolitik kesiminde ve lipid ile konjuge form olan LC3-II’den PE’nin uzaklaştırılması aşamalarında bozukluklar olabileceğini düşündürmektedir.

1 no’lu hastada ATG3 gen ifadesi kontrole göre belirgin bir fark gözlenmemektedir. ATG3; LC3 veya GABARAP’a lipid konjugasyonunda rol alır. LC3’ün fagoforların uzaması sürecinde yer aldığı belirlenirken, aynı protein ailesinin diğer alt üyesi GABARAP’ın otofagozomların maturasyon öncesi aşamasını düzenlediği tespit edilmiştir (18). Bu durumda GH1 için, ATG3 gen ifadesinde bir değişim gözlenmemesine rağmen, LC3 ve GABARAP gen ifadesinden elde edilen değerler otofagozom biyogenezinin son aşamalarındaki değişimlere işaret etmektedir.

Genel olarak, GH1’de çalışılan genlerin ifadelerindeki değişimler, otofajik veziküllerin çekirdeklenmesinde bir farklılık olmadığına ancak kese zarı uzaması ve kapanmasına kadar geçen otofagozom biyogenezinde değişiklikler olduğuna işaret etmektedir.

GH2 (p.D409H), klinik olarak Tip III Gaucher tanısı almıştır. Kemik bulguları, hepatosplenomegali ve nörolojik bulguları olan, tedavi alan bir hastadır. Gen ifadesi analizlerinde, en belirgin farklılık ATG4C gen ifadesinin 1/10 oranında azalmış olması ve GABARAP gen ifadesinin 3 kat artmasıdır. Bunun dışında analiz edilen diğer genlerden Beklin-1 ve ATG12’de azalma tespit edilirken; LC3, ATG3 ve ATG5 gen ifadelerinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Bkz. EK 12). Otofajik veziküllerin çekirdeklenmesi aşamasını düzenleyen Beklin-1 gen ifadesindeki azalma, otofagozom biyogenezinin başlangıç aşamasında inhibisyona işaret etmektedir. Diğer yandan otofagozomların uzaması aşamasında rol alan ATG12 gen ifadesinin azalması, ATG12-ATG5-ATG16 konjugasyonunda değişimlerin olabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle kese zarı uzaması ve kapanmasına kadar geçen otofagozom biyogenezinde değişiklikler olduğu düşünülmektedir.

1 no’lu hastaya benzer bir şekilde GH2’de ikinci ubikitin benzeri sistemde rol alan ATG4C gen ifadesindeki azalma, LC3’ün proteolitik kesiminde ve lipid ile konjuge form olan LC3-II’den PE’nin uzaklaştırılması aşamalarında bozukluklar olabileceğini düşündürmektedir. LC3 ve GABARAP proteinlerinin her ikisi de otofagozom oluşumu için gereklidir, ancak bazı farklılıklar göstermektedir. LC3 ilk olarak mikrotübül-ilişkili protein olarak bulunmuş olup, hücre içi membran trafiği ile direkt bir ilişkisi saptanamamıştır (72). GABARAP ise Golgi ve ER ağında hücre içi veziküllerin taşınımını gerçekleştiren sitozolik bir proteindir. Otofagozom biyogenezinde, LC3 otofajik membran uzamasından sorumlu iken, GABARAP otofagozom oluşumunun daha geç aşamalarında Atg12-Atg5-Atg16L kompleksinin ayrılmasında görev almaktadır (18). GABARAP proteinin bilinen diğer önemli bir rolü de, taşıyıcısı olan Stbd-1 (*Starch-binding domain-containing protein 1*) proteinine bağlanarak glikojenlerin lizozomlara taşınmasını sağlamak ve böylece hücre içi glikoz seviyesini kontrol etmektir (73). Bu durumda, GH2’de GABARAP gen ifadesinde görülen belirgin artış, otofagozom biyogenezinin maturasyon aşamasında bir aksaklık olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca lizozomal enzim

bozukluğundan dolayı glikoz gibi hücre içinde biriken substratların otofajik geri bildirim mekanizmasını etkileyebileceği düşünülmektedir.

Genel olarak, GH2’de otofajik genlerin ifadelerinden elde edilen değerler, otofajik veziküllerin çekirdeklenmesi, kese zarı uzaması ve otofagozomların ER-golgi ağında maturasyonunda lipid moleküllerinin uzaklaştırılmasında değişimler olduğuna işaret etmektedir.

GH3 (p.L444P), klinik olarak Tip III Gaucher tanısı almış olup; GH2’ye benzer özellikler göstermektedir. Hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda gerçekleştirilen gen ifadesi analizlerinde, GABARAP dışında tüm otofajik genlerin ifadesinde belirgin azalma gözlenmektedir (Bkz. EK 13).

3 no’lu hastada Beklin-1, ATG5 ve ATG12 gen ifadesinden elde edilen değerler, otofajik vezikül çekirdeklenmesi, kese zarı uzaması ve kapanmasına kadar geçen otofagozom biyogenezinde değişiklikler olduğunu düşündürmektedir.

ATG4C gen ifadesindeki azalma, LC3’ün proteolitik kesiminde ve lipid ile konjuge form olan LC3-II’den PE’nin uzaklaştırılması aşamalarında bozukluklar olabileceğini düşündürmektedir. GH3’te GABARAP gen ifadesinde bir değişim olmasa dahi, azalan ATG4C gen ifadesi otofagozom biyogenezinin maturasyon öncesi aşamalarında lipid moleküllerinin uzaklaştırılmasında ve proteolitik kesim aşamalarında bozuklukların olabileceğini düşündürmektedir.

Temel mekanizmaları farklı olmasına karşın, lizozomal enzim eksikliği nedeniyle ortaya çıkan substrat birikiminin, otofaji mekanizmasını engellemekle birlikte birçok lizozomal depo hastalığına neden olabileceği düşünülmektedir. GM1

gangliosidozis (41) ya da NCL gibi hastalıklarda engellenme otofajinin fazla aktivasyonu sebebiyle olurken, çoklu sülfataz eksikliği ve MPSIIIA gibi hastalıklarda engellenme otofagozom-lizozom birleşmesinin bloke olmasından kaynaklanmaktadır (9). GH2 (p.D409H) ve GH3 (p.L444P) farklı genotiplere sahip olmalarına rağmen benzer klinik bulgular göstermektedir. Otofaji gibi her türlü hücre içi moleküler değişikliklerden direkt etkilendiği bilinen kompleks bir mekanizmanın, aynı fenotiplerde farklı şekilde etkilenebileceği düşünülmektedir.

GH4 (p.L444P), klinik olarak Tip III Gaucher tanısı almıştır. Hepatosplenomegali ve kemik bulgularının yanında nörolojik bulgularının olup olmadığı, tanının erken yaşta konması sebebiyle henüz bilinmemektedir. Hasta tedavi almaktadır. GH4'te çalışılan otofajik genlerin ifadesi hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda, Beklin-1, ATG5, ATG12 ve ATG4C'de azalma gösterirken; ATG3, LC3 ve GABARAP genlerinde bir değişiklik saptanmamıştır (Bkz. EK 14). Otofajik kese uzaması, ubikitinlenme benzeri iki ayrı protein-protein kovalent eklenme tepkimesi içerir. Birinci yolak ubikitin benzeri ATG12 proteininin ATG5'e bağlanmasını ve ATG12-ATG5-ATG16 kompleksinin oluşmasını sağlar. Bu oluşum, ikinci ubikitinasyon benzeri yolak için gereklidir. GH4'te Beklin-1, ATG5 ve ATG12 gen ifadelerinden elde edilen değerler, otofagozom çekirdeklenmesi, kese zarı uzaması ve kapanmasına kadar geçen otofagozom biyogenezinde bir takım değişiklikler olduğuna işaret etmektedir.

3 ve 4 no'lu hastalar aynı genotipe sahiptir (p.L444P). Ancak 3 no'lu hastada ATG3 gen ifadesi azalmışken, 4 no'lu hastada herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Elde edilen değerler 3 no'lu hastada ATG3 aracılı lipid konjugasyonunda bozukluklara işaret ederken, 4 no'lu hastada LC3 ve GABARAP lipid konjugasyonunda bir değişim olmadığını düşündürmektedir.

GH5 (p.D409H), klinik olarak Tip I/III Gaucher tanısı almıştır. Kemik ve hepatosplenomegali bulguları tespit edilmiş, ancak tanının erken yaşta konması sebebiyle, nörolojik bulguları saptanamamıştır. Hasta tedavi almaktadır. GH5 fibroblastlarında hücre içi açıklığın oluşturulmadığı koşullarda yapılan gen ifadesi analizlerinde Beklin-1 (yaklaşık 4,5 kat) ve ATG12 gen ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. ATG4C gen ifadesinde azalma gözlenirken; ATG3, ATG5, LC3 ve GABARAP gen ifadesinde bir değişiklik saptanamamıştır (Bkz. EK 15).

Beklin-1'in farklı yollar üzerinden otofajiyi düzenlediği bilinmektedir. Otofagozomların oluşumu aşamasında sınıf III fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) Vps34'ü içeren protein kompleksi, önemli bir rol oynamaktadır. Bu protein kümesinin aktivitesini düzenleyen en önemli protein Beklin-1 proteindir. PI3P, otofajik kese oluşumu için gerekli olan proteinlerin otofajik vezikül filizlenme bölgelerinde öbeklenmesinde rol oynar ve birçok protein için bir birleşme platformu oluşturur (12). Beklin-1 ayrıca apoptotik olmayan Bcl-2 proteinleri ile bağlanarak otofaji düzenlenmesi için oldukça kilit bir rol oynamaktadır. Bcl-2 proteinlerine bağlanan Beklin-1, Vps34-PI3K kompleksini aktive edemez ve otofajinin engellenmesine neden olur. Bcl-2 ya da Beklin-1 proteinlerinin JNK ya da DAPK1 tarafından direkt fosforilasyonu, Bcl-2-Beklin-1 kompleksinin ayrılmasını ve otofajinin yeniden aktivasyonunu sağlar (74). Bunun yanında Beklin-1'in bir kaspaz substratı olduğu ve kesilen Beklin-1'in apoptoz otofaji dengesinde direkt rol oynadığı bilinmektedir (75, 76). Otofaji hücre hayatı ve stres direnci için gerekli bir mekanizmadır. Fakat aşırı uyarılmış otofajinin hücreyi apoptozdan farklı, otofajik hücre ölümü adı verilen bir programlı hücre ölüm yoluna götürdüğü tanımlanmıştır (71). Bu durumda, lizozomal enzim eksikliği olan, aşırı stres altındaki Gaucher fibroblastlarında Beklin-1 gen ifadesinin dramatik olarak artmış olması birkaç olasılığı ortaya çıkarabilmektedir. ATG12 gen ifadesindeki artış ile birlikte düşünüldüğünde, çekirdeklenme aşamasından başlayarak bir otofajik aktivasyon sözcüğü olabilir. Diğer yandan, otofaji-apoptoz dengesinde oldukça önemli bir rol oynayan Beklin-1'deki artış, aşırı strese maruz kalan hücrenin otofajiyi apoptoza karşı bir direnç mekanizması olarak aktive ettiğini düşündürmektedir.

GH6 (p.L444P), klinik olarak TipI/III Gaucher tanısı almıştır. Kemik ve hepatosplenomegali bulguları tespit edilen ve tedavi alan bir hastadır. Hastanın yaşının küçük olması nedeniyle herhangi bir nörolojik bulgu saptanamamıştır. Hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda yapılan gen ifadesi analizlerinde, ATG12 geninde artış gözlenirken; çalışılan diğer otofajik gen ifadelerinde (Beklin-1, ATG3, ATG5, ATG4C, LC3, GABARAP) azalma tespit edilmiştir (Bkz. EK 16). GH6' da çalışılan otofajik genlerin ifadelerinden elde edilen değerler, otofajik vezikül çekirdeklenmesi, kese zarı uzaması ve kapanmasına kadar geçen otofagozom biyogenezinde inhibisyon olduğuna işaret etmektedir.

Hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda Gaucher hastalarının fibroblast hücrelerinden elde edilen nicel analiz sonuçları, otofaji yolağının değiştiğini göstermiştir. Özellikle ATG4C ve ATG5 gen ifadeleri tüm hastalarda azalmıştır. TBA'dan elde edilen korelasyon matriksi ile GAPDH gen ifadesine kıyasla Beklin-1, ATG5, ATG4C ve ATG3 genlerinin birbiri ile %50'den fazla korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Bu durum otofajik veziküllerin çekirdeklenmesi ve izolasyon membranının uzaması aşamalarında rol alan genlerin ifadelerinde, yüksek oranda korelasyon olduğunu göstermektedir. Gaucher hastalarında, otofaji mekanizmasının lipid konjugasyonu sürecinde inhibisyon olabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Kontrol hücrelerinde bazal otofajiyi test etmek amacıyla, hücre içi stresin oluşturulduğu koşullarda otofaji genlerinin ifadesinin, stres olmayan koşullara kıyasla arttığı gözlenmiştir. Gen ifadesi seviyelerinde gözlenen artış, otofaji mekanizmasının enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla hücrenel bir sağ kalım mekanizması olarak işlev gördüğünü doğrulamaktadır.

- Klinik olarak Tip 1 Gaucher tanısı alan GH1 (p.L296V), kemik bulguları ve hepatosplenomegali belirtileri gösteren, tedavi alan bir hastadır. Çalışmamızda GH1'de hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda gerçekleştirilen nicel analizler sonucunda Beklin-1 gen ifadesi seviyelerinde, kontrol fibroblastlara kıyasla bir değişim gözlenmemiştir. Pacheco ve diğ. (40)'nin yaptıkları bir çalışmada da Tip 1 Gaucher hastalarının fibroblast hücrelerinde Beklin-1 protein seviyelerine bakılmış ve kontrol fibroblastlara yakın değerler elde edilmiştir. GH1'de Beklin-1 gen ifadelerinden elde edilen değerler Pacheco ve diğ.'nin yaptıkları çalışma ile uyumludur.

- Deney sürecinde gen ifadesi düzeyinde elde edilen analizler, genel anlamda otofajik yolda moleküler seviyede değişim olduğuna işaret etmektedir (Bkz. EK 1,17,18). Çalıştığımız otofaji genlerinin ifadeleri incelendiğinde hücre içi stresin oluşturulmadığı koşullarda, lipid konjugasyonunda rol alan ATG4C ve ATG5 genlerinin tüm hastalarda azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum Gaucher hastalarında otofaji mekanizmasının lipid konjugasyonu aşamasında inhibisyon olabileceğine işaret etmektedir. Değişken seviyelerde olduğu tespit edilen analiz sonuçları temel olarak lizozomlarda biriken protein, glikozaminoglikan, sfingolipid, glikojen, oligosakkarit ve kompleks lipidler gibi metabolitlerin otofajik yolda değişimlere neden olduğunu düşündürmektedir.



- Hasta fibroblast hücrelerinde stresin (açlık) oluşturulduğu koşullarda ATG4C, ATG5 ve ATG3 gen ifadelerinin kontrol hücrelerine kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Lipid konjugasyonu basamaklarında rol alan ATG4C, ATG5 ve ATG3 gen ifadeleri azalmıştır. Gaucher hasta fibroblastlarında görülen lizozomal hasar, hücre için var olan bir stres faktörü iken; ikincil bir stres ile aşırı otofaji aktivasyonundan kaçınmak amacıyla, bazı gen ifadelerinin düşmesinin, hücre içi homeostazisin sağlanması açısından gerekli olduğu düşünülmektedir.

- TBA sonuçlarından elde edilen korelasyon tablo ve vektörel eksen grafikleri ofofajik veziküllerin çekirdeklenmesi aşamasında rol oynayan Beklin-1 ile izolasyon membranının uzaması aşamalarında rol alan ATG5, ATG4C ve ATG3 genlerinin birbirleri ile %50'den fazla korelasyon içinde olduğunu göstermiştir.

- Gen ifadesi analizlerine ek olarak protein düzeyine yansıyan değişiklikleri incelemek amacıyla hücrelerden, protein izole edilip, immünoblot yöntemi ile analizler gerçekleştirilebilir. Bu yöntemle otofaji proteinleri ifadelerinin hastalara özgü farklılıklarını inceleme imkanı elde edilebilir.

- Otofajinin aktive olduğu koşullarda, otolizozomal etkinliğin uyarılması nedeniyle, hücre içi toplam lizozom aktivitesinin yanında, lizozomlarda yaygın olarak bulunan katepsin enzim aktiviteleri de analiz edilebilir.

- *Lysotracker* ve *acridine orange* boyamaları, lizozomları pH'nin asit olduğu durumlarda boyamaktadır. Hücrede lizozomal aktiviteyi ölçmek amacıyla, asit pH'deki boyamalar ile aktif lizozomlar tespit edilebilir.

- Lizozomal bozuklukların otofaji aktivasyonu ile otofagozom-lizozom birleşmesine etkisini göstermek amacıyla yapılması gerekli olan diğer moleküler yöntemler, otofaji analizlerinin temeli olan LC3-I/LC3-II protein analizi, GFP-LC3 immunofloresan nokta oluşumu, p62 protein yıkımı ve otofajinin nitelik ve

nicelik olarak tanımlanmasında otofajik veziküllerin ve içlerindeki kargonun ultra yapısal olarak transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) yöntemi ile tanımlanmasıdır (77).

## KAYNAKLAR

1. Saftig, P., Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**, 623-635.
2. Funato, K., Beron, W., Yang, C.Z., Mukhopadhyay, A., Stahl, P.D. (1997). Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin O-permeabilized cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, 272 (26), 16147-16151.
3. Futerman, A.H., van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5 (7), 554-565.
4. Lieberman, A.P., Puertollano, R., Raben, N., Slaugenhaupt, S., Walkley, S.U., Ballabio, A. (2012). Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy*, 8 (5), 719-730.
5. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451 (7182), 1069-1075.
6. Arslan, D.Ö., Korkmaz, G., Gözüaçık, D. (2011). Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2 (4), 184-194.
7. Xie, Z., Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9 (10), 1102-1109.
8. Dvir, H., Harel, M., McCarthy, A.A, Toker, L., Silman, I., Futerman, A.H., Sussman, J.L. (2003). X-ray structure of human acid-beta-

- glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Reports*, 4 (7): 704-709.
9. Tatti, M., Motta, M., Di Bartolomeo, S., Scarpa, S., Cianfanelli, V., Cecconi, F. ve diğerleri. (2012). Reduced cathepsins B and D cause impaired autophagic degradation that can be almost completely restored by overexpression of these two proteases in Sap C-deficient fibroblasts. *Human Molecular Genetics*, 21 (23), 5159-5173.
  10. Tatti, M., Motta, M., Salvioli, R. (2011). Autophagy in Gaucher disease due to saposin C deficiency. *Autophagy*, 7 (1), 94-95.
  11. Lawrence, B.P., Brown, W.J. (1992). Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *Journal Of Cell Science*, 102 ( Pt 3), 515-526.
  12. Dell'Angelica, E.C., Mullins, C., Caplan, S., Bonifacino, J.S. (2000). Lysosome-related organelles. *FASEB Journal*, 14 (10), 1265-1278.
  13. Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., Saftig, P. (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends In Cell Biology*, 13 (3), 137-145.
  14. Ruivo, R., Anne, C., Sagne, C., Gasnier, B. (2009). Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793 (4), 636-649.
  15. Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W. ve diğerleri. (2010.) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 90 (4), 1383-1435.
  16. Yang, Z., Klionsky, D.J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, 12 (9), 814-822.

17. Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differentiation*. 18(4):571-80.
18. Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 27, 107-132.
19. Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, 40 (2), 280-293.
20. Kuma, A., Mizushima, N. (2010). Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 21 (7), 683-690.
21. Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., Elazar, Z. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 29 (11), 1792-1802.
22. Young, A.R., Chan, E.Y., Hu, X.W., Kochl, R., Crawshaw, S.G., High, S. ve diğeri. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal Of Cell Science*, 119 (Pt 18), 3888-3900.
23. Longatti, A., Tooze, S.A. (2009). Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death And Differentiation*, 16 (7), 956-965.
24. Pattingre, S., Levine, B. (2006). Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Research*, 66 (6), 2885-2888.
25. Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J.M., Carnuccio, R. ve diğeri. (2009). Control of autophagy by oncogenes

- and tumor suppressor genes. *Cell Death And Differentiation*, 16 (1), 87-93.
26. Levine, B., Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, 6 (4), 463-477.
27. Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132 (1), 27-42.
28. Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T. ve diğerleri. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131 (6), 1149-1163.
29. Scott, R.C., Schuldiner, O., Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental Cell*, 7 (2), 167-178.
30. Bellot G., Garcia-Medina R., Gounon P. ve diğerleri. (2009). Hypoxia-Induced Autophagy is Mediated Through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains, *Molecular Cell Biology*, 29, 2570–2581.
31. Chen J., Ohsaki Y., Tauchi-Sato K., Fujita A., Fujimoto T. (2006). Cholesterol Depletion Induces Autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351, 246–52.
32. Martinez-Vicente M., Talloczy Z., Wong E. ve diğerleri. (2010). Cargo Recognition Failure is Responsible for Inefficient Autophagy in Huntington's Disease. *Nature Neuroscience*, 13, 567–576.
33. Matsuda N., Tanaka K. (2010). Does Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System or the Autophagy-Lysosome Pathway Predispose

Individuals to Neurodegenerative Disorders such as Parkinson's Disease?, *Journal of Alzheimers Disease*, 19, 1–9.

34. Martinet, W., De Meyer, G.R. (2009). Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. *Circulation Research*, 104 (3), 304-317.
35. Melendez, A., Talloczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H., Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*, 301 (5638), 1387-1391.
36. Wang, A.L., Lukas, T.J., Yuan, M., Du, N., Tso, M.O., Neufeld, A.H. (2009). Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *PloS One*, 4 (1), e4160.
37. Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R. ve diğerleri. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441 (7095), 885-889.
38. Nassif, M., Hetz C. (2012). Autophagy impairment: a crossroad between neurodegeneration and tauopathies. *BMC Biology*, 10:78.
39. Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G. ve diğerleri. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 10 (1), 51-64.
40. Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.Y. ve diğerleri. (2009). Autophagy supresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*, 137 (6), 1062-1075.

41. Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 30; 458 (7242) :1131-5.
42. Liao, G., Yao, Y., Liu, J., Yu, Z., Cheung, S., Xie, A. ve diğerleri. (2007). Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction and autophagic stress in *Npc1* <sup>-/-</sup> mouse brain. *The American Journal Of Pathology*, 171 (3), 962-975.
43. Pacheco, C.D., Kunkel, R., Lieberman, A.P. (2007). Autophagy in Niemann-Pick C disease is dependent upon Beclin-1 and responsive to lipid trafficking defects. *Human Molecular Genetics*, 16 (12), 1495-1503.
44. Takamura, A., Higaki, K., Kajimaki, K., Otsuka, S., Ninomiya, H., Matsuda, J. ve diğerleri. (2008). Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 367 (3), 616-622.
45. Fukuda, T., Roberts, A., Ahearn, M., Zaal, K., Ralston, E., Plotz, P.H. ve diğerleri. (2006). Autophagy and lysosomes in Pompe disease. *Autophagy*, 2 (4), 318-320.
46. Saftig, P., Beertsen, W., Eskelinen, E.L. (2008). LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*, 4 (4): 510-2.
47. Grabowski, G. (2012). Gaucher disease and other storage disorders. *American Society of Hematology*, 13-18.
48. Cabrera-Salazar, M.A., Deriso, M., Bercury, S.D., Li, L., Lydon, J.T., Weber, W., Pande, N., Cromwell, M.A., Copeland, D., Leonard, J., Cheng, S.H., Scheule, R.K. (2012). Systemic delivery of a glucosylceramide synthase inhibitor reduces CNS substrates and increases lifespan in a mouse model of type 2 Gaucher disease. *PLoS One*, 7(8):e43310.



49. Beutler, E., Gelbart, T., West, C. (1993). Identification of six new Gaucher disease mutations. *Genomics* 15, 203-205.
50. Hruska, K.S., LaMarca, M.E., Scott, C.R., Sidransky, E. (2008). Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Human Mutation*, 29 (5), 567-583.
51. Beutler, E., Gelbart, T., Scott, C.R. (2005). Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 35 (3), 355-364.
52. Emre, S., Gurakan, F., Yuce, A., Rolf, A., Scott, R., Ozen, H. (2008). Molecular analysis of Turkish Gaucher disease patients: identification of novel mutations in glucocerebrosidase (GBA) gene. *European Journal Of Medical Genetics*, 51 (4), 315-321.
53. Salvioli, R., Tatti, M., Scarpa, S., Moavero, S.M., Ciaffoni, F., Felicetti, F. ve diğ erleri. (2005). The N370S (Asn370-->Ser) mutation affects the capacity of glucosylceramidase to interact with anionic phospholipid-containing membranes and saposin C. *The Biochemical Journal*, 390 (Pt 1), 95-103.
54. Bleijlevens, B., van Breemen, M.J., Donker-Koopman, W.E., de Koster, C.G., Aerts, J.M. (2008). Detection of mutant protein in complex biological samples: glucocerebrosidase mutations in Gaucher's disease. *Analytical Biochemistry*, 372 (1), 52-61.
55. Chabas, A., Gort, L., Montfort, M., Castello, F., Dominguez, M.C., Grinberg, D. ve diğ erleri. (1998). Recurrence of the D409H mutation in Spanish Gaucher disease patients: description of a new homozygous patient and haplotype analysis. *Journal Of Medical Genetics*, 35 (9), 775-777.

56. Santamaria, R., Michelakakis, H., Moraitou, M., Dimitriou, E., Dominişşini, S., Grossi, S. ve diğerleri. (2008). Haplotype analysis suggests a single Balkan origin for the Gaucher disease [D409H;H255Q] double mutant allele. *Human Mutation*, 29 (6), E58-67.
57. Fuller, M., Rozaklis, T., Lovejoy, M., Zarrinkalam, K., Hopwood, J.J., Meikle, P.J. (2008). Glucosylceramide accumulation is not confined to the lysosome in fibroblasts from patients with Gaucher disease. *Molecular Genetics And Metabolism*, 93 (4), 437-443.
58. Sun, Y., Qi, X., Grabowski, G.A. (2003). Sapozin C is required for normal resistance of acid beta-glucosidase to proteolytic degradation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278 (34), 31918-31923.
59. Sun, Y., Liou, B., Ran, H., Skelton, M.R., Williams, M.T., Vorhees, C.V. ve diğerleri. (2010). Neuronopathic Gaucher disease in the mouse: viable combined selective sapozin C deficiency and mutant glucocerebrosidase (V394L) mice with glucosylsphingosine and glucosylceramide accumulation and progressive neurological deficits. *Human Molecular Genetics*, 19 (6), 1088-1097.
60. Barak, V., Acker, M., Nisman, B., Kalickman, I., Abrahamov, A., Zimran, A. ve diğerleri. (1999). Cytokines in Gaucher's disease. *European Cytokine Network*, 10 (2), 205-210.
61. Hollak, C.E., Evers, L., Aerts, J.M., van Oers, M.H. (1997). Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 23 (2), 201-212.
62. Hughes, D.A., Pastores, G.M. (2010). The pathophysiology of GD - current understanding and rationale for existing and emerging therapeutic approaches. *Wien Med Wochenschr*, 160 (23-24), 594-599.

63. Ron, I., Horowitz, M. (2005). ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Human Molecular Genetics*, 14 (16), 2387-2398.
64. Deganuto, M., Pittis, M.G., Pines, A., Dominissini, S., Kelley, M.R., Garcia, R., Quadrioglio, F., Bembi, B., Tell, G. (2007). Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*, 212 (1): 223-35.
65. Bustin, S.A., Bebes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR- a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 597-601.
66. Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.E. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3): 1559-1582.
67. Bustin, S.A. ve Mueller, R. (2005). Review: Real-time reverse transcription PCR (qrt-pcr) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109, 365-379.
68. Womg, M.L. ve Medrano, J.F. (2005). Review: Real-time PCR for mRNA quantitation biotechniques, 39 (1), 75-85.
69. Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29-E45.
70. Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23-39.
71. Gözüaçık, D., Kimchi, A. (2004). Autophagy As a Cell Death and Tumor Suppressor Mechanism, *Oncogene*, 23, 2891–2906.

72. Kuznetsov, S.A., Gelfand V.I. (1987). 18 kDa microtubule associated protein: identification as a new light chain (LC-3) of microtubule-associated protein 1 (MAP- 1). *FEBS Letters*, 212(1), 145-148.
73. Jiang, S., Wells, C.D., Roach, P.J. (2011). Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1 *Biochem Biophys Res Commun*, 413(3), 420–425.
74. Ciechomska, I.A., Goemans, G.C., Skepper, J.N., Tolkovsky, A.M. (2009). Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene*, 28, 2128-2141.
75. Cho DH, Jo YK, Hwang JJ, Lee YM, Roh SA, Kim JC. (2009). Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Letters*, 274 (1): 95-100.
76. Wirawan, E., Vande, W.L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I. ve diğerleri. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death & Disease* . 1: e18.
77. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L ve diğerleri. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 8(4):445-544.

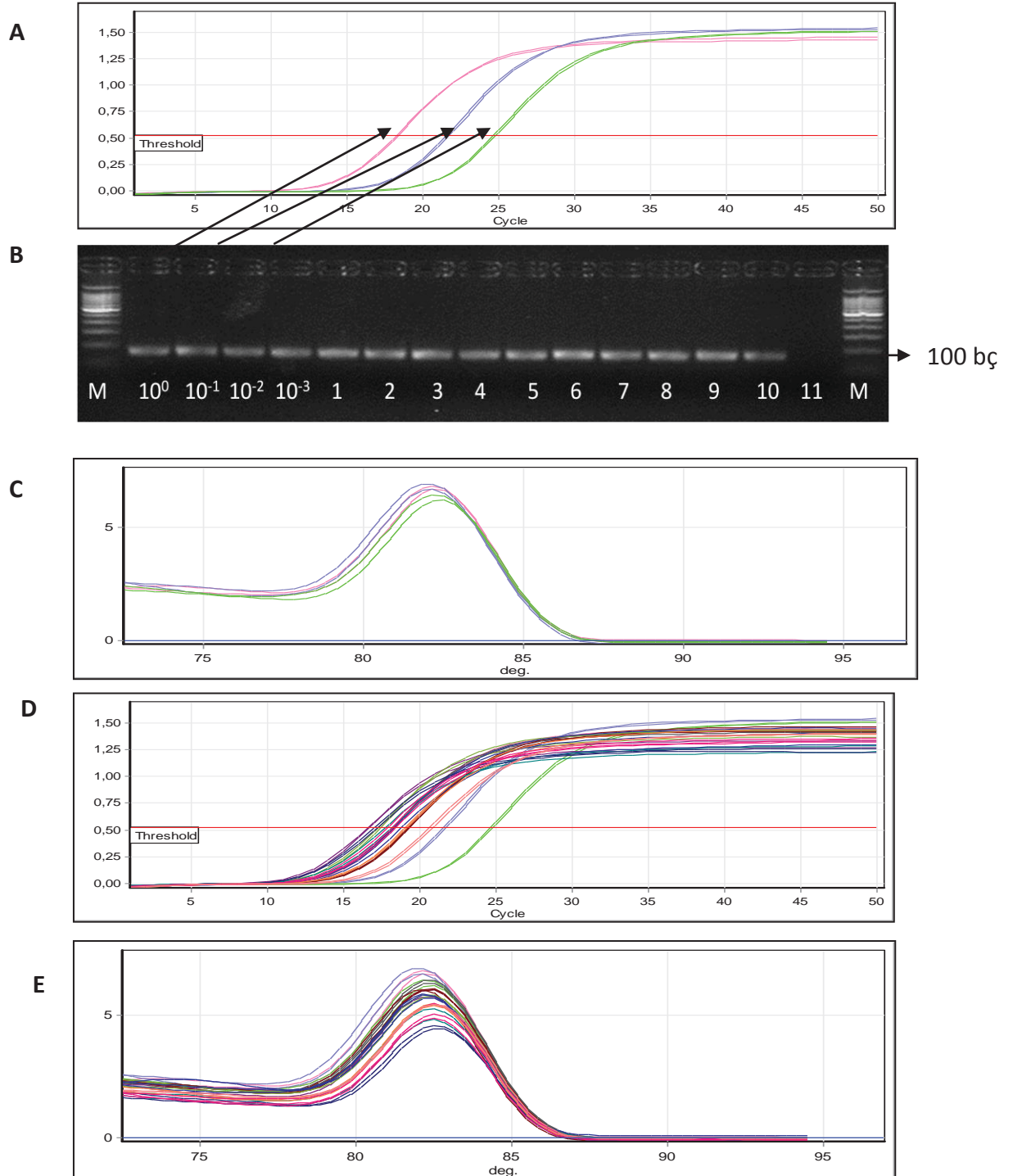
## EKLER

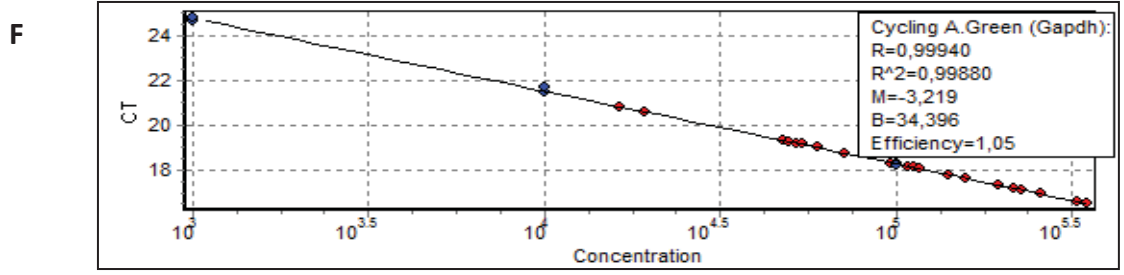
EK 1. Gaucher hastalarında otofaji gen ifadelerinin nicel analizi

Otofagozom oluşum aşamaları		Başlama		Vezikül Uzaması						Vezikül Tamamlanması							
				Beklin-1		ATG3		ATG5		ATG12		ATG4C		LC3		GABARAP	
İsim	Tanı	Non-stv	Stv	Non-stv	Stv	Non-stv	Stv	Non-stv	Stv	Non-stv	Stv	Non-stv	Stv	Non-stv	Stv	Non-stv	Stv
Kontrol	-	1,00	2,50	1,06	1,41	1,06	2,62	1,00	1,94	1,02	1,81	1,03	2,47	1,06	2,49		
GH1	Tip I	0,94	0,66	0,85	0,24	0,35	0,63	1,59	0,36	0,27	0,05	1,68	1,63	0,71	1,65		
GH2	Tip III	0,66	1,91	0,95	0,48	0,91	0,23	0,68	0,64	0,15	0,14	1,08	2,08	3,33	3,56		
GH3	Tip III	0,55	1,55	0,45	0,68	0,47	0,45	0,64	0,41	0,15	0,06	0,83	1,55	0,99	1,41		
GH4	Tip III	0,64	0,79	1,00	0,62	0,28	1,33	0,51	0,56	0,11	0,08	1,00	1,46	1,15	1,05		
GH5	Tip III/I	4,73	1,65	1,10	0,81	0,78	0,85	1,67	1,96	0,67	0,89	1,10	1,03	0,95	1,14		
GH6	Tip III/I	0,72	0,46	0,51	0,40	0,59	0,45	1,99	1,40	0,39	0,20	0,36	1,07	0,68	1,43		

Tablo 4.10. Gaucher hastalarında otofaji gen ifadelerinin nicel analizi

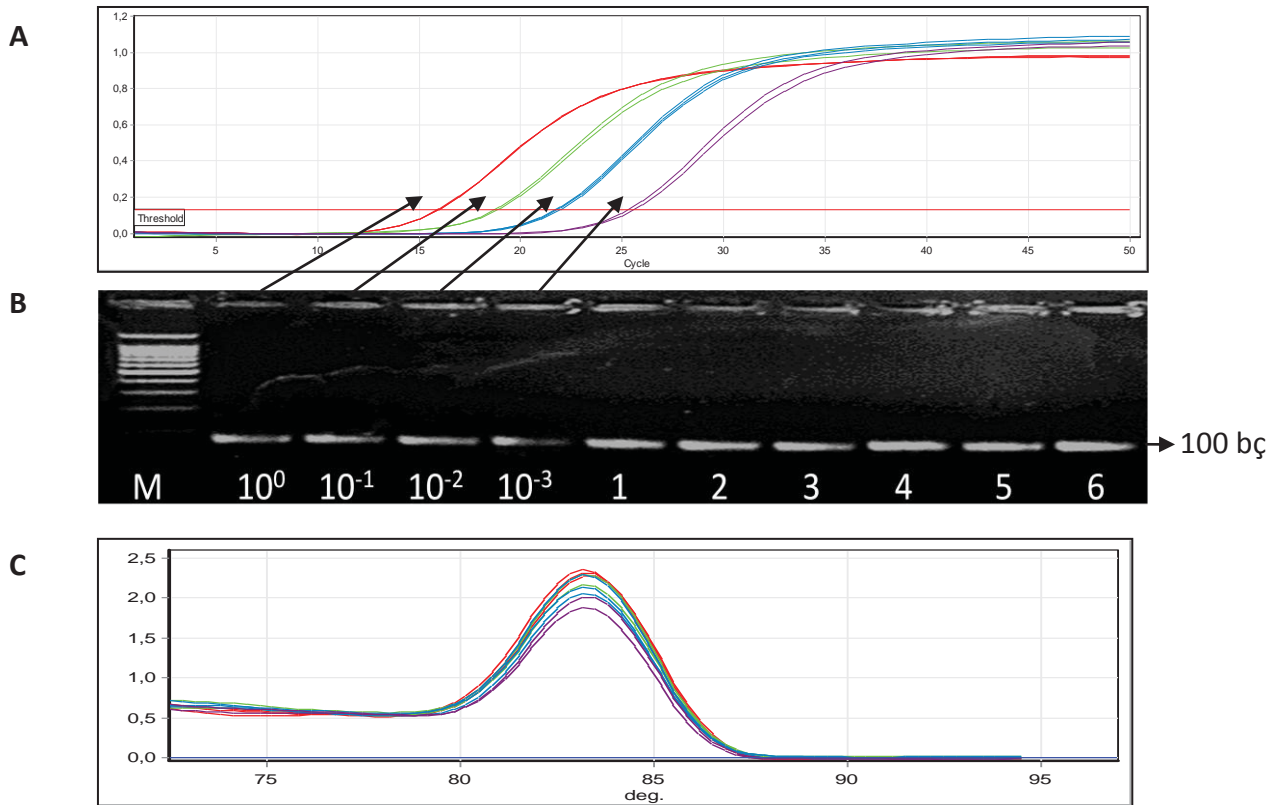
## EK 2. GAPDH gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

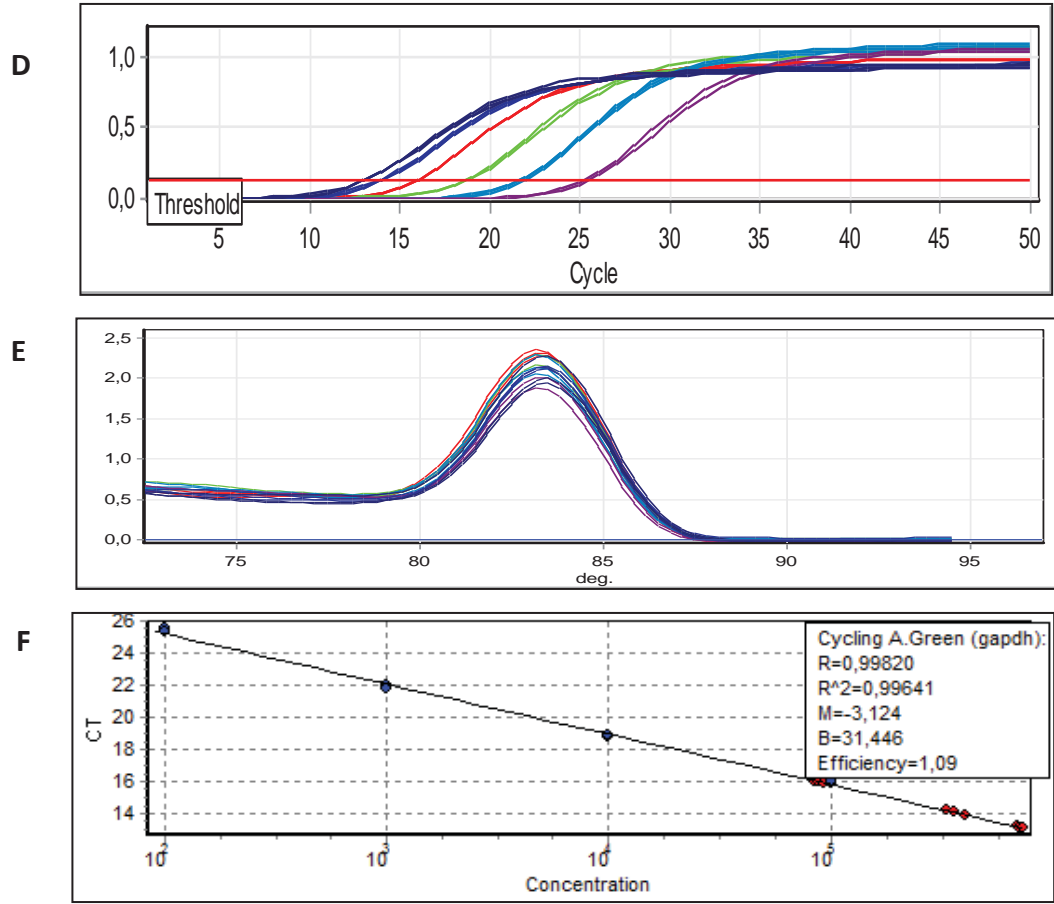




**Şekil 4.10.** GAPDH gen ifadesinin GH1,GH2,GH3,GH4 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B.** GAPDH geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH1, **3:** GH2, **4:** GH3, **5:** GH4, **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **7:** GH1 (açlık), **8:** GH2 (açlık), **9:** GH3 (açlık), **10:** GH4 (açlık), **11:** Negatif kontrol **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.



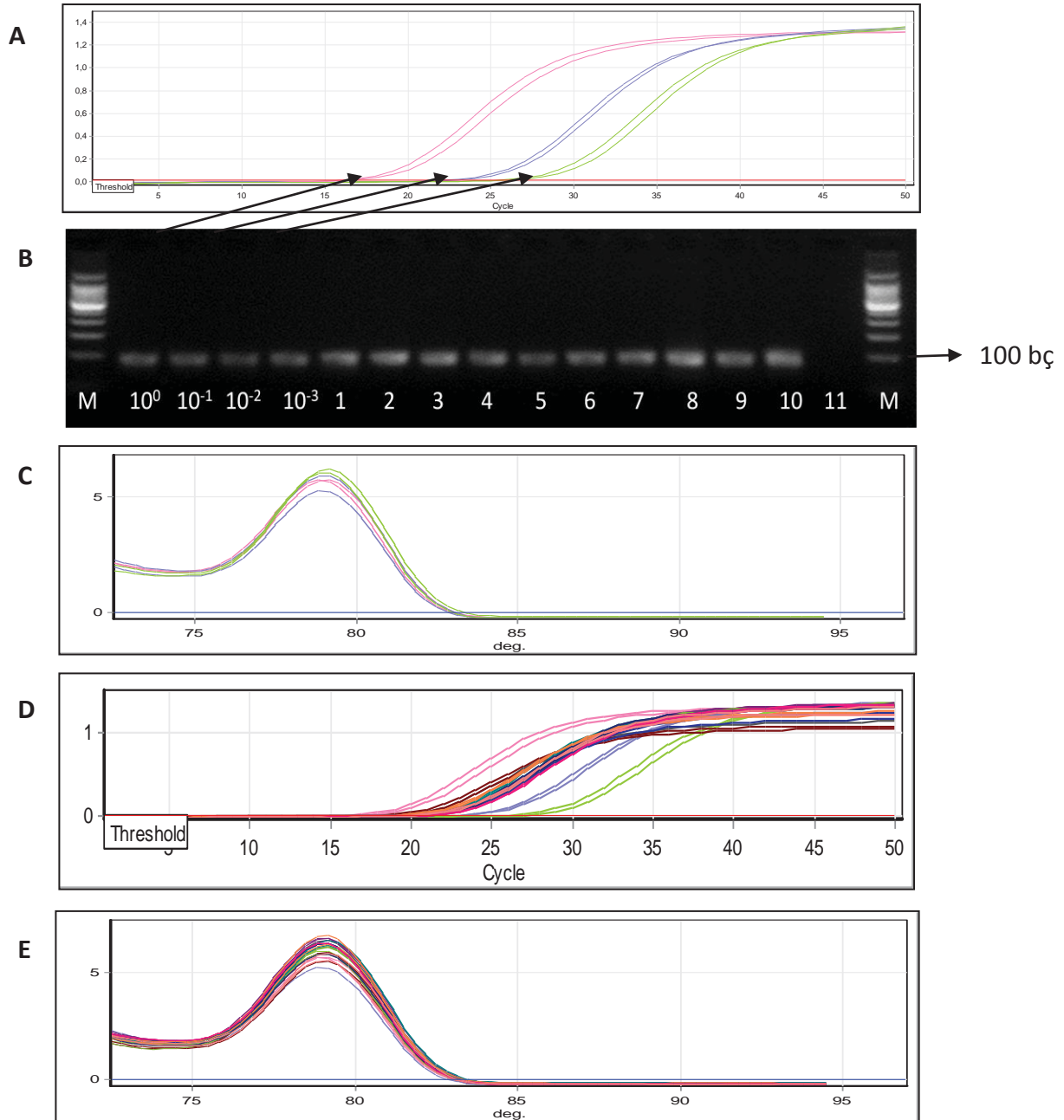


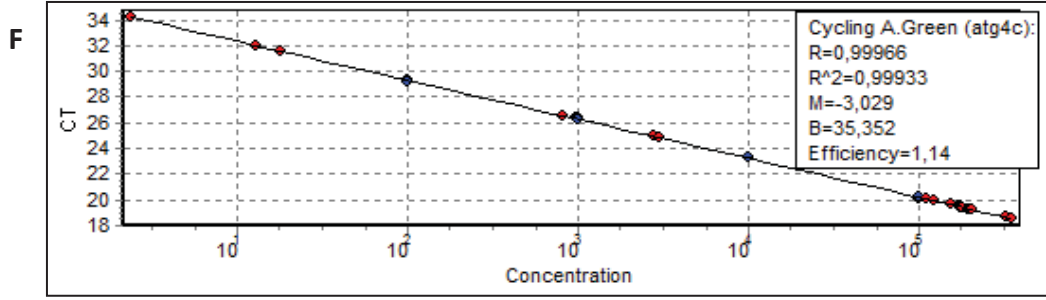
**Şekil 4.11.** GAPDH gen ifadesinin GH5,GH6 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B.** GAPDH geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH5, **3:** GH6, **4:** Kontrol fibroblast (açlık), **5:** GH5 (açlık), **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.



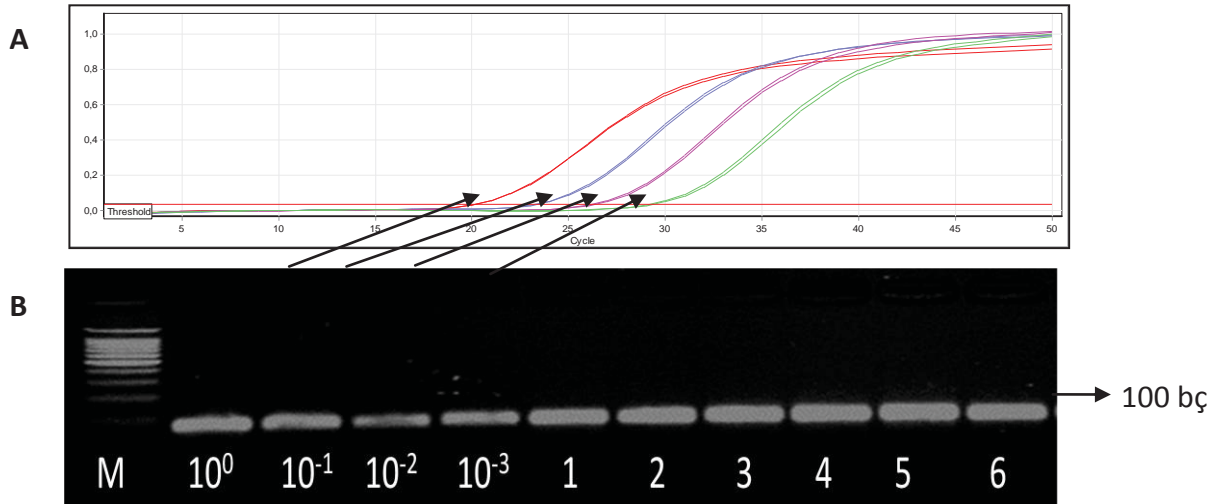
### EK 3. ATG4C gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

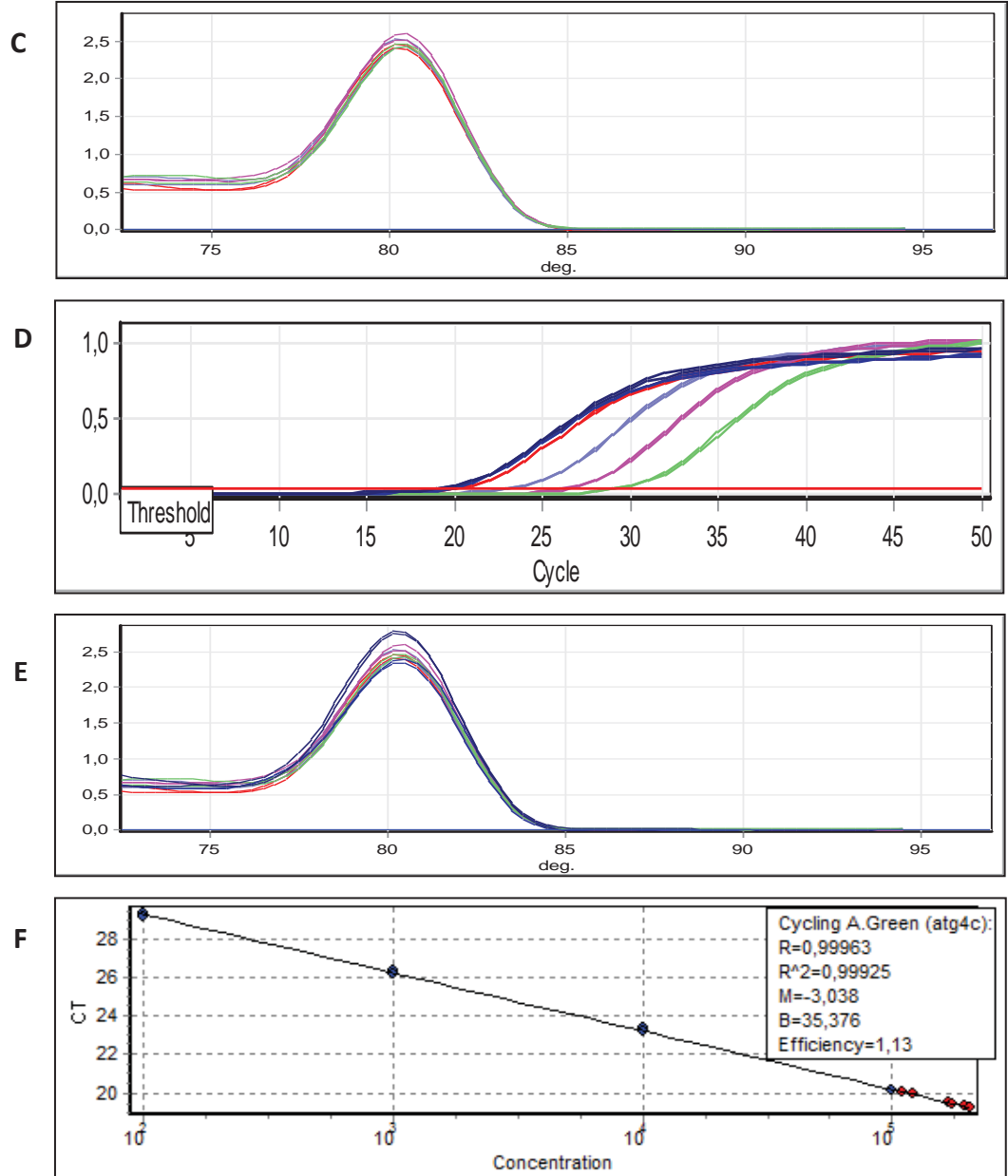




**Şekil 4.12.** ATG4C gen ifadesinin GH1,GH2,GH3,GH4 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B.** ATG4C geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH1, **3:** GH2, **4:** GH3, **5:** GH4, **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **7:** GH1 (açlık), **8:** GH2 (açlık), **9:** GH3 (açlık), **10:** GH4 (açlık), **11:** Negatif kontrol **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.



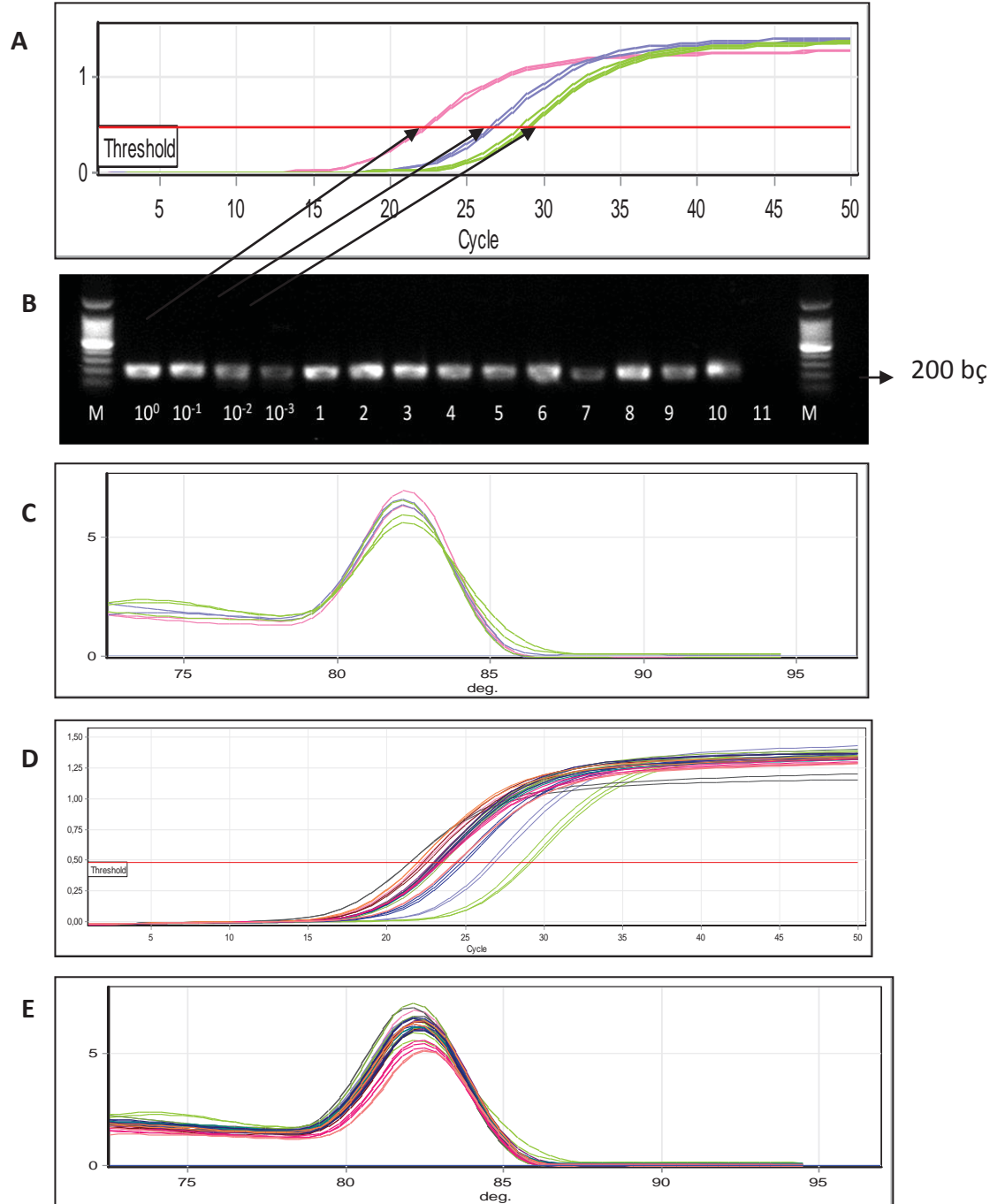


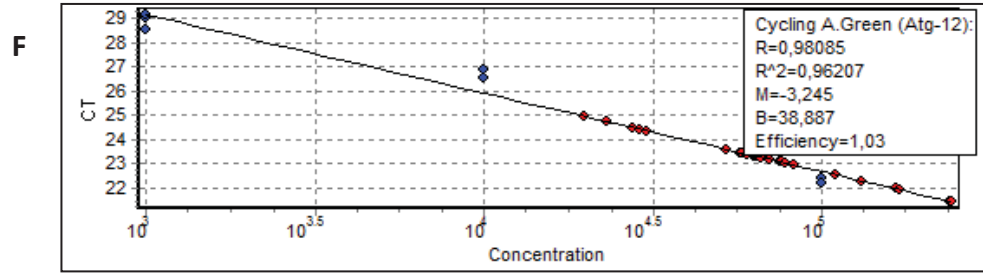
**Şekil 4.13.** ATG4C gen ifadesinin GH5,GH6 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B.** ATG4C geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH5, **3:** GH6, **4:** Kontrol fibroblast (açlık), **5:** GH5 (açlık), **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart

ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.

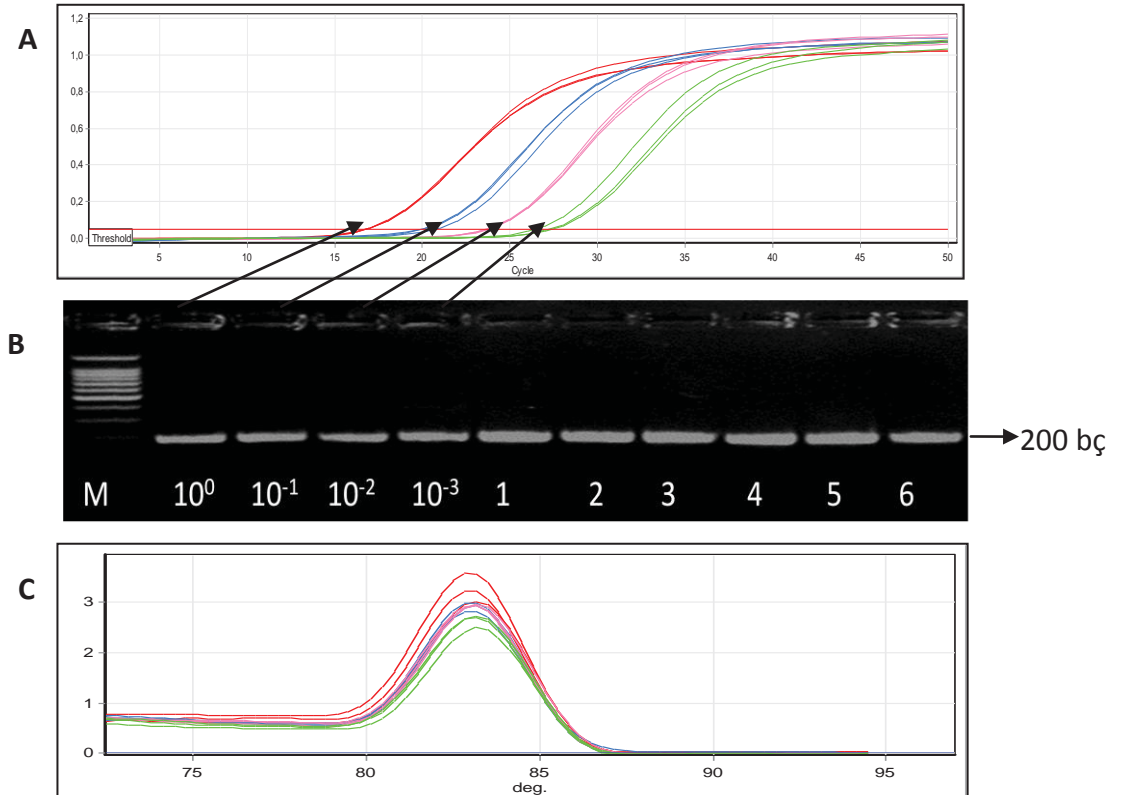
**EK 4.** ATG12 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

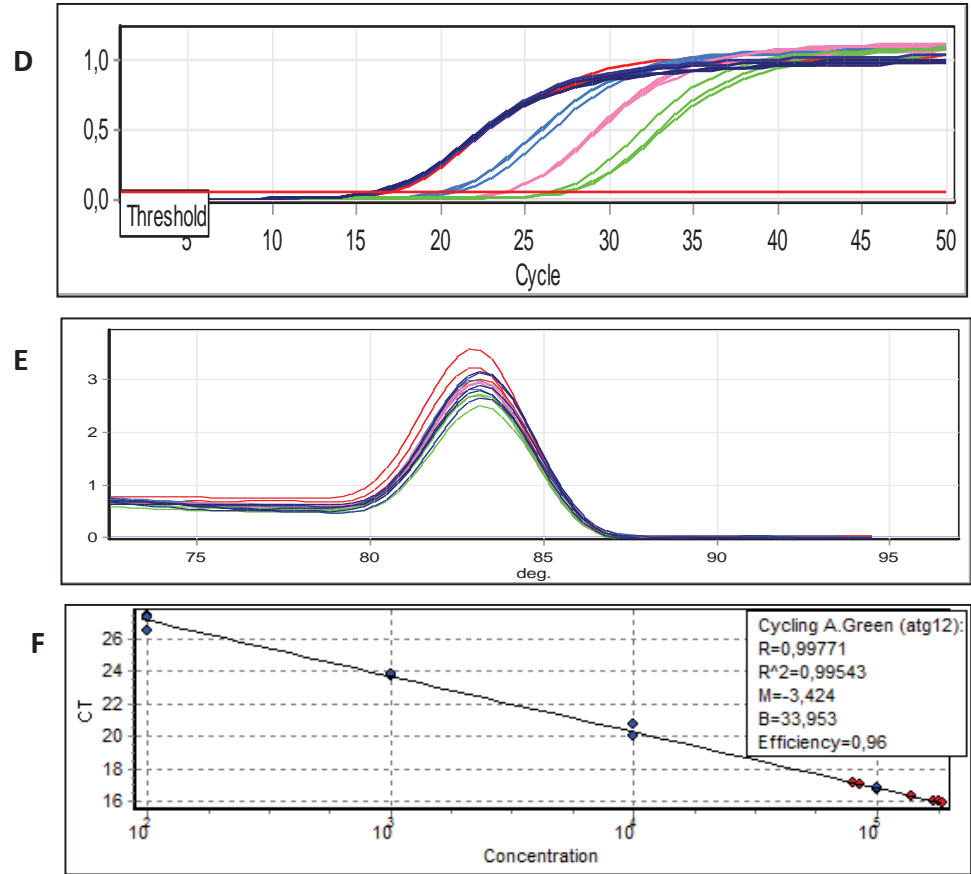




**Şekil 4.14.** ATG12 gen ifadesinin GH1,GH2,GH3,GH4 için gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için gerçek zamanlı amplifikasyon **B.** ATG12 geni *Real Time*-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH1, **3:** GH2, **4:** GH3, **5:** GH4, **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **7:** GH1 (açlık), **8:** GH2 (açlık), **9:** GH3 (açlık), **10:** GH4 (açlık), **11:** Negatif kontrol **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.

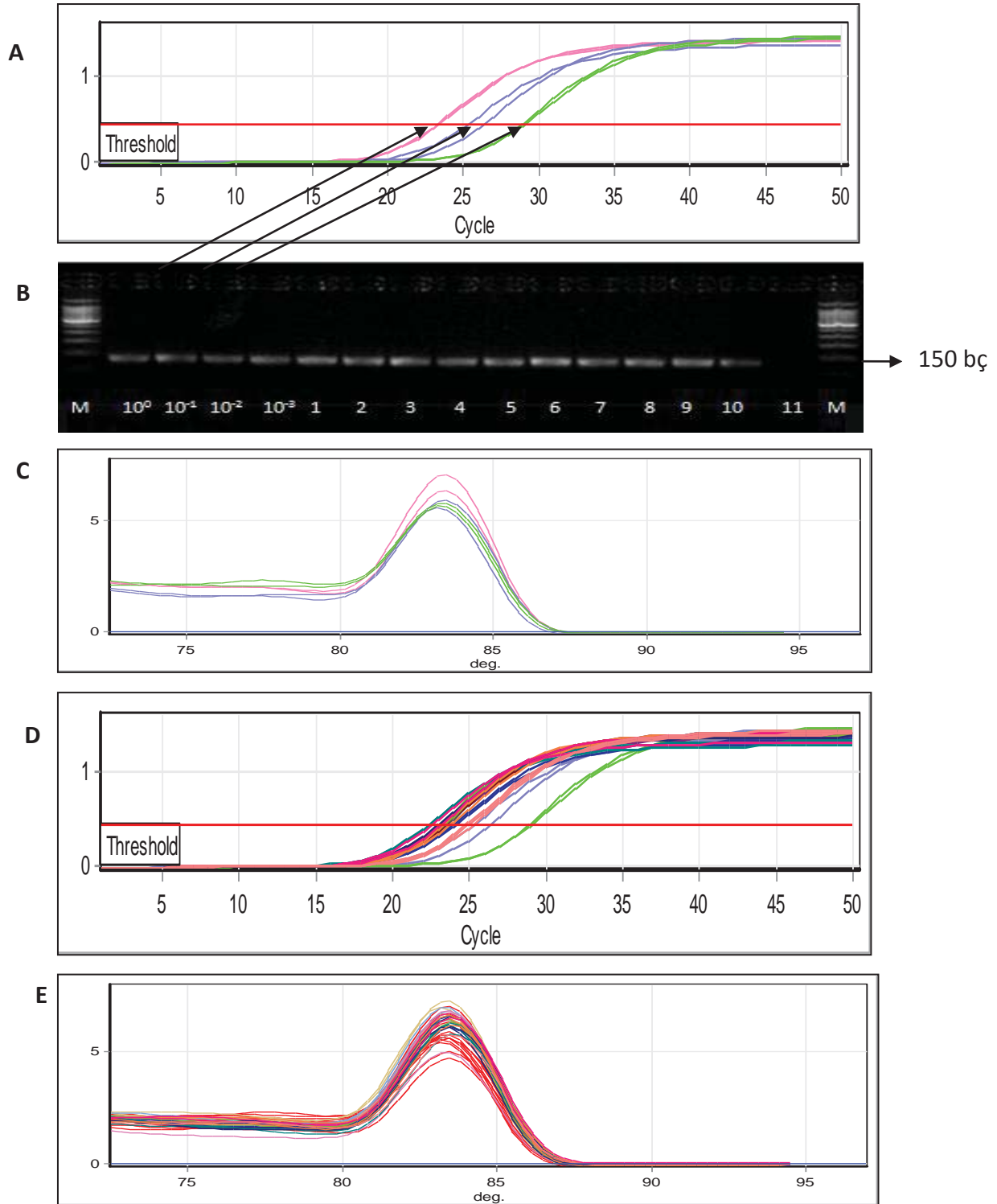


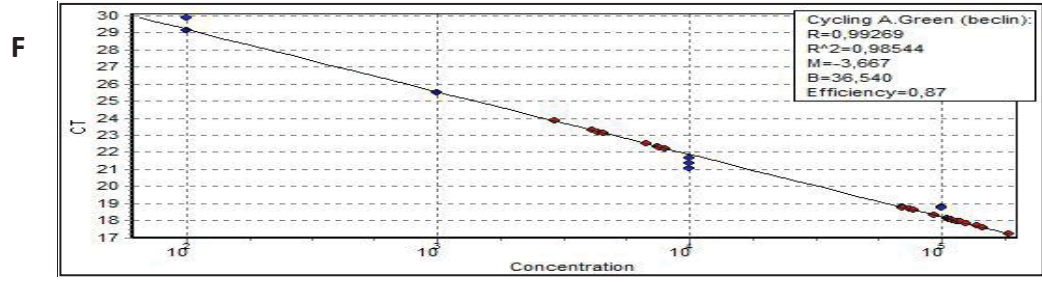


**Şekil 4.15.** ATG12 gen ifadesinin GH5,GH6 için gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B.** ATG12 geni *Real Time*-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>,10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH5, **3:** GH6, **4:** Kontrol fibroblast (açlık), **5:** GH5 (açlık), **6:** GH6 (açlık), **M:** 100 bp'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.

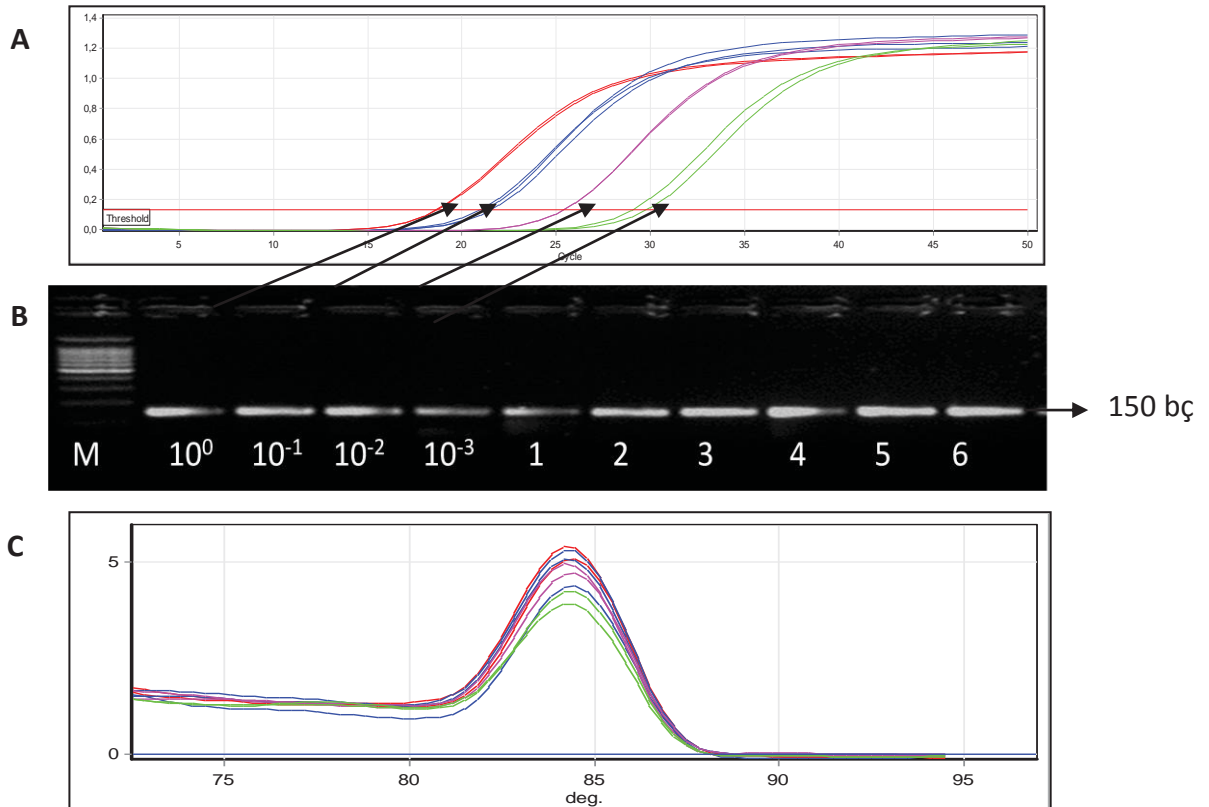
**EK 5.** Beklin-1 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi



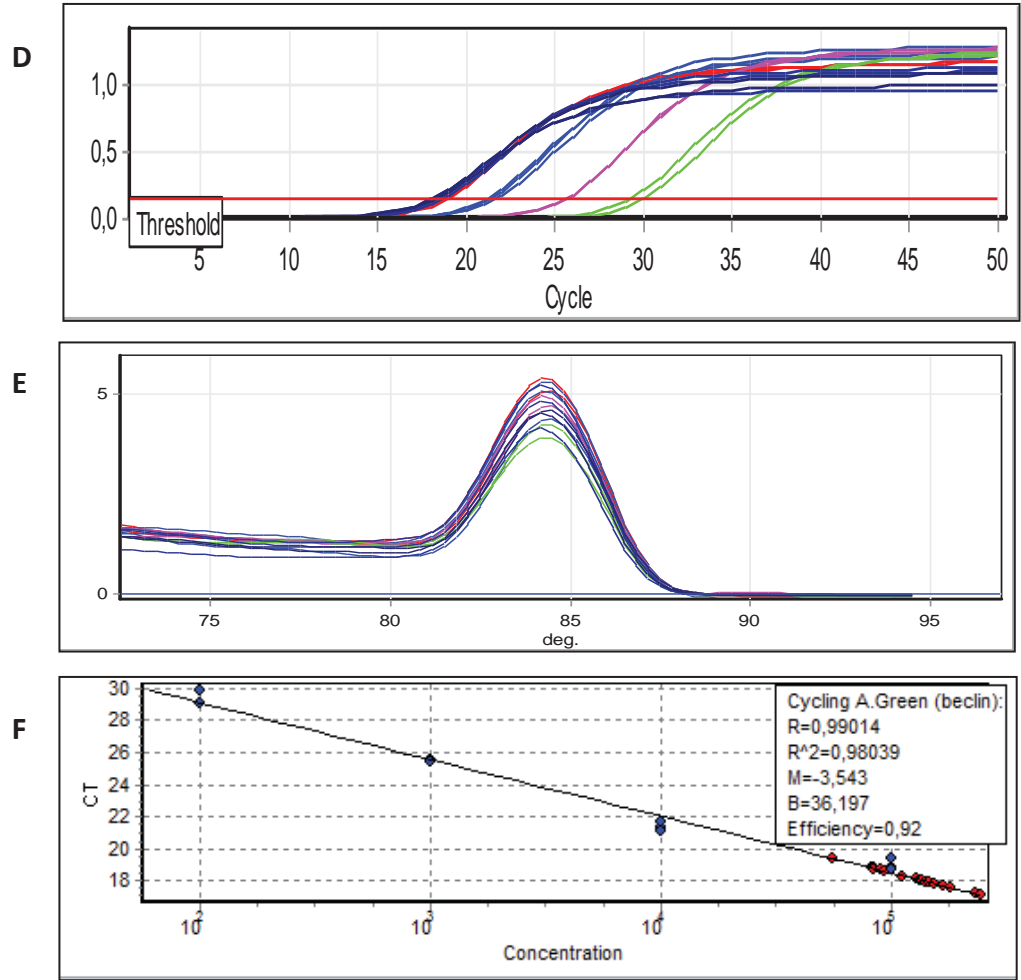


**Şekil 4.16.** Beklin-1 gen ifadesinin GH1,GH2,GH3,GH4 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon **B.** Beklin-1 geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH1, **3:** GH2, **4:** GH3, **5:** GH4, **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **7:** GH1 (açlık), **8:** GH2 (açlık), **9:** GH3 (açlık), **10:** GH4 (açlık), **11:** Negatif kontrol **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.



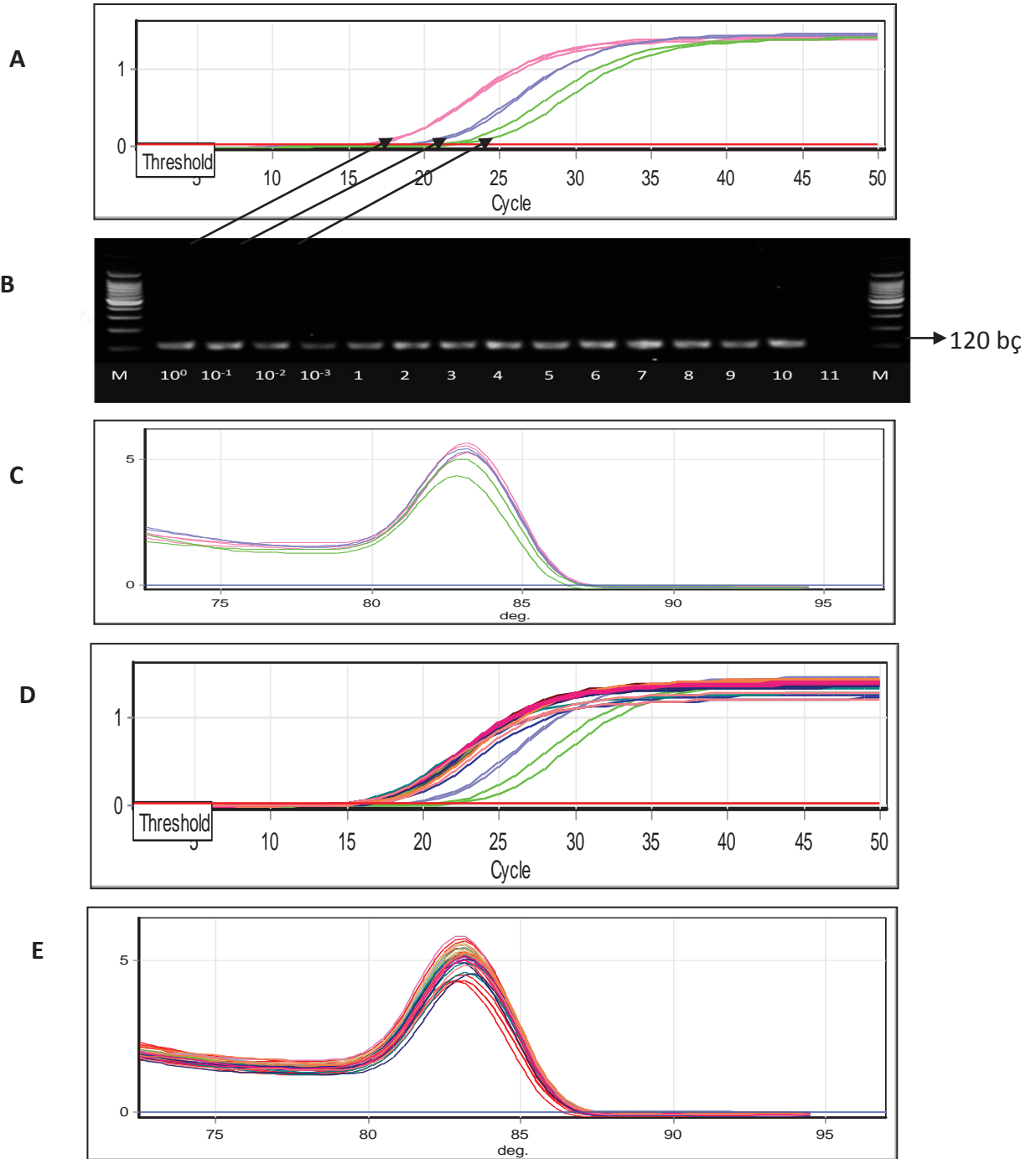


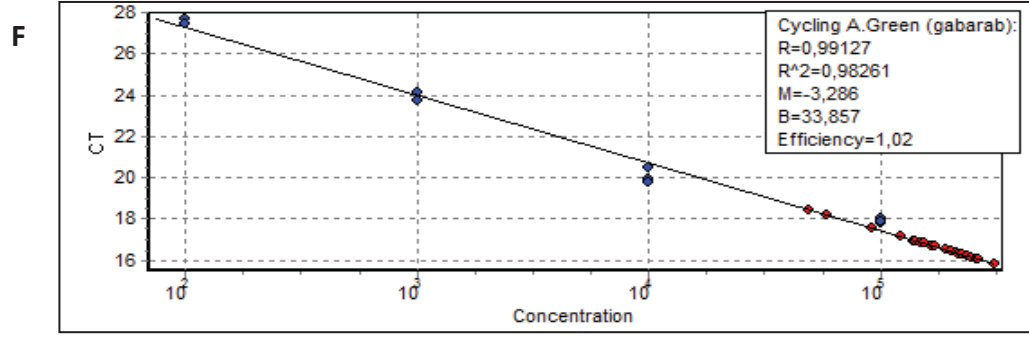


**Şekil 4.17.** Beklin-1 gen ifadesinin GH5,GH6 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B.** Beklin-1 geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH5, **3:** GH6, **4:** Kontrol fibroblast (açlık), **5:** GH5 (açlık), **6:** GH6 (açlık), **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.

**EK 6.** GABARAP gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

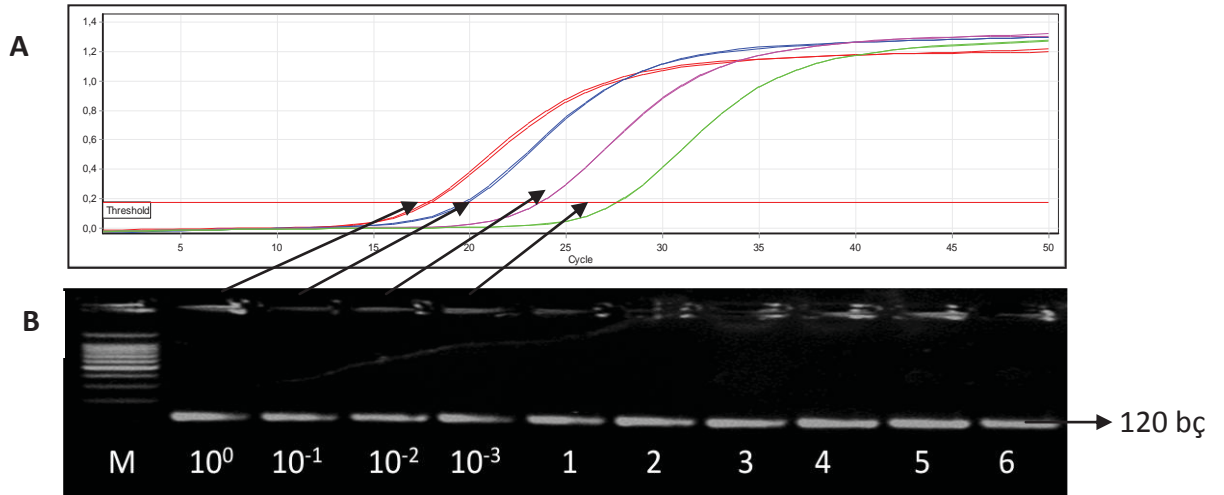


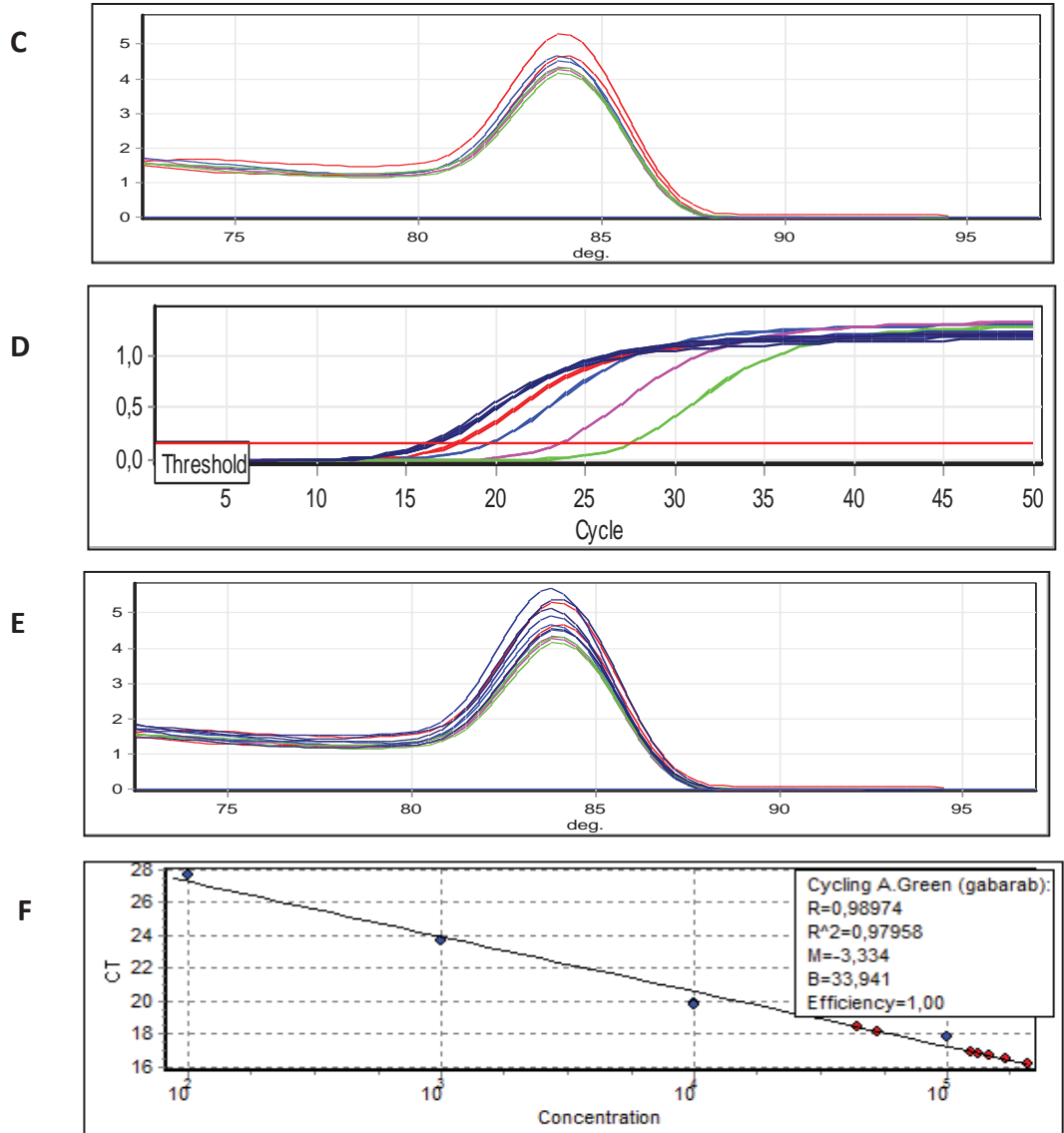


**Şekil 4.18.** GABARAP gen ifadesinin GH1,GH2,GH3,GH4 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon

**B.** GABARAP geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH1, **3:** GH2, **4:** GH3, **5:** GH4, **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **7:** GH1 (açlık), **8:** GH2 (açlık), **9:** GH3 (açlık), **10:** GH4 (açlık), **11:** Negatif kontrol **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.

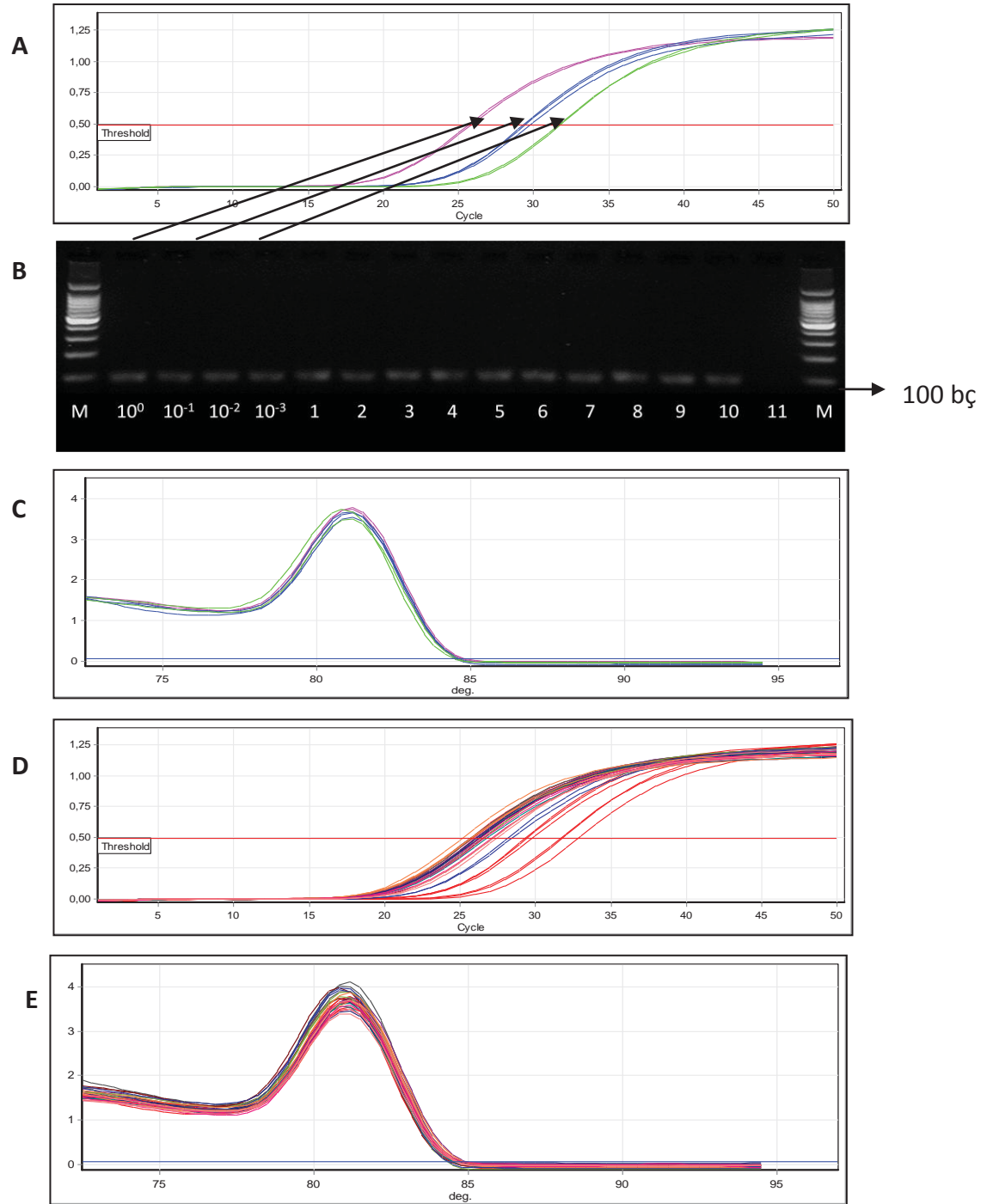


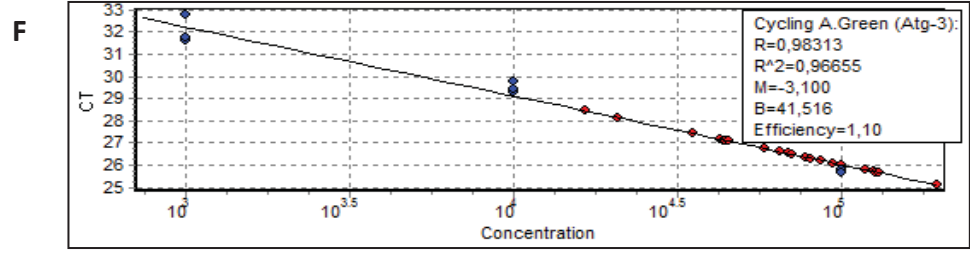


**Şekil 4.19.** GABARAP gen ifadesinin GH5,GH6 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B.** GABARAP geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH5, **3:** GH6, **4:** Kontrol fibroblast (açlık), **5:** GH5 (açlık), **6:** GH6 (açlık), **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.

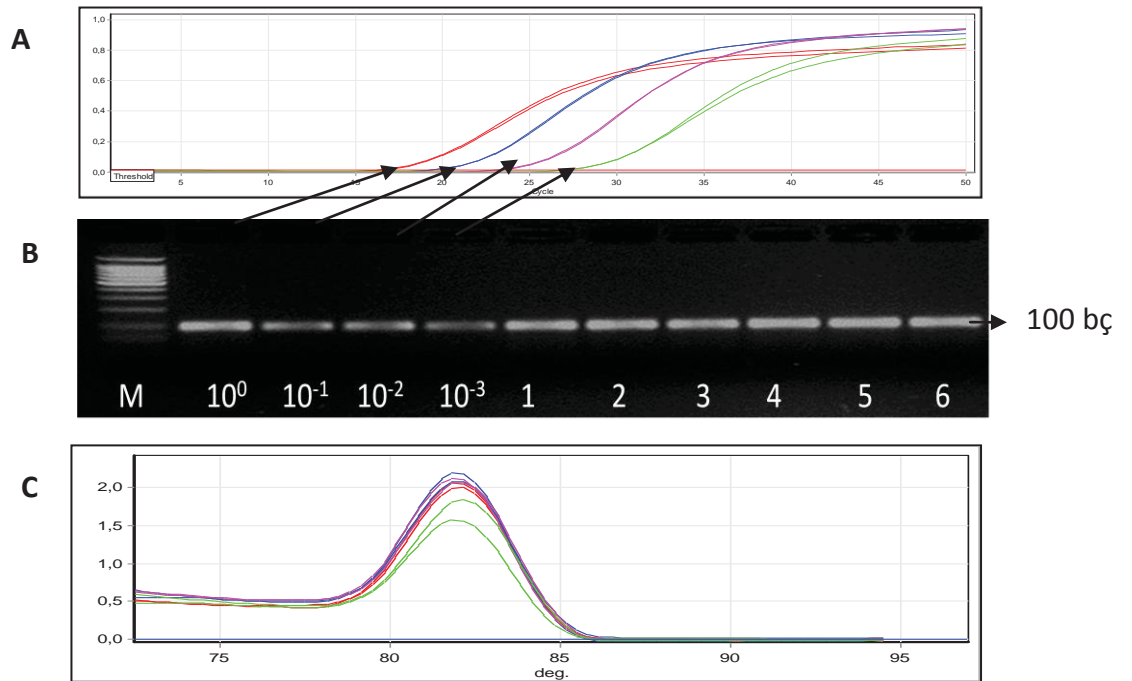
### EK 7. ATG3 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

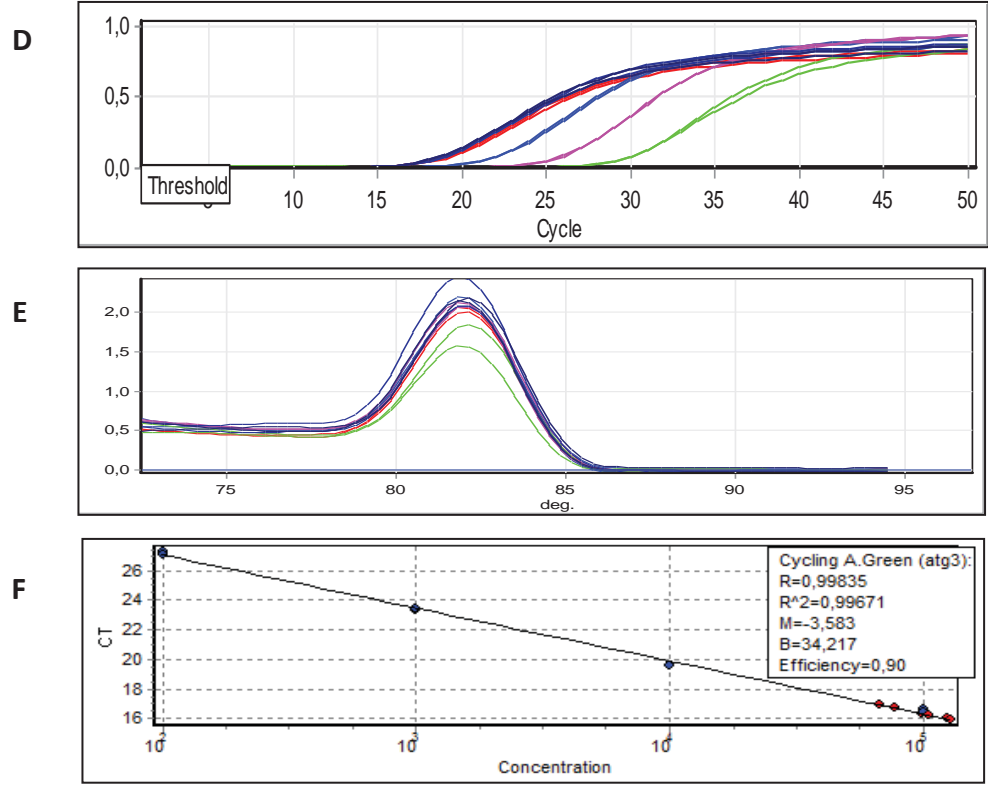




**Şekil 4.20.** ATG3 gen ifadesinin GH1,GH2,GH3,GH4 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

- A.** Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon  
**B.** ATG3 geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH1, **3:** GH2, **4:** GH3, **5:** GH4, **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **7:** GH1 (açlık), **8:** GH2 (açlık), **9:** GH3 (açlık), **10:** GH4 (açlık), **11:** Negatif kontrol **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.

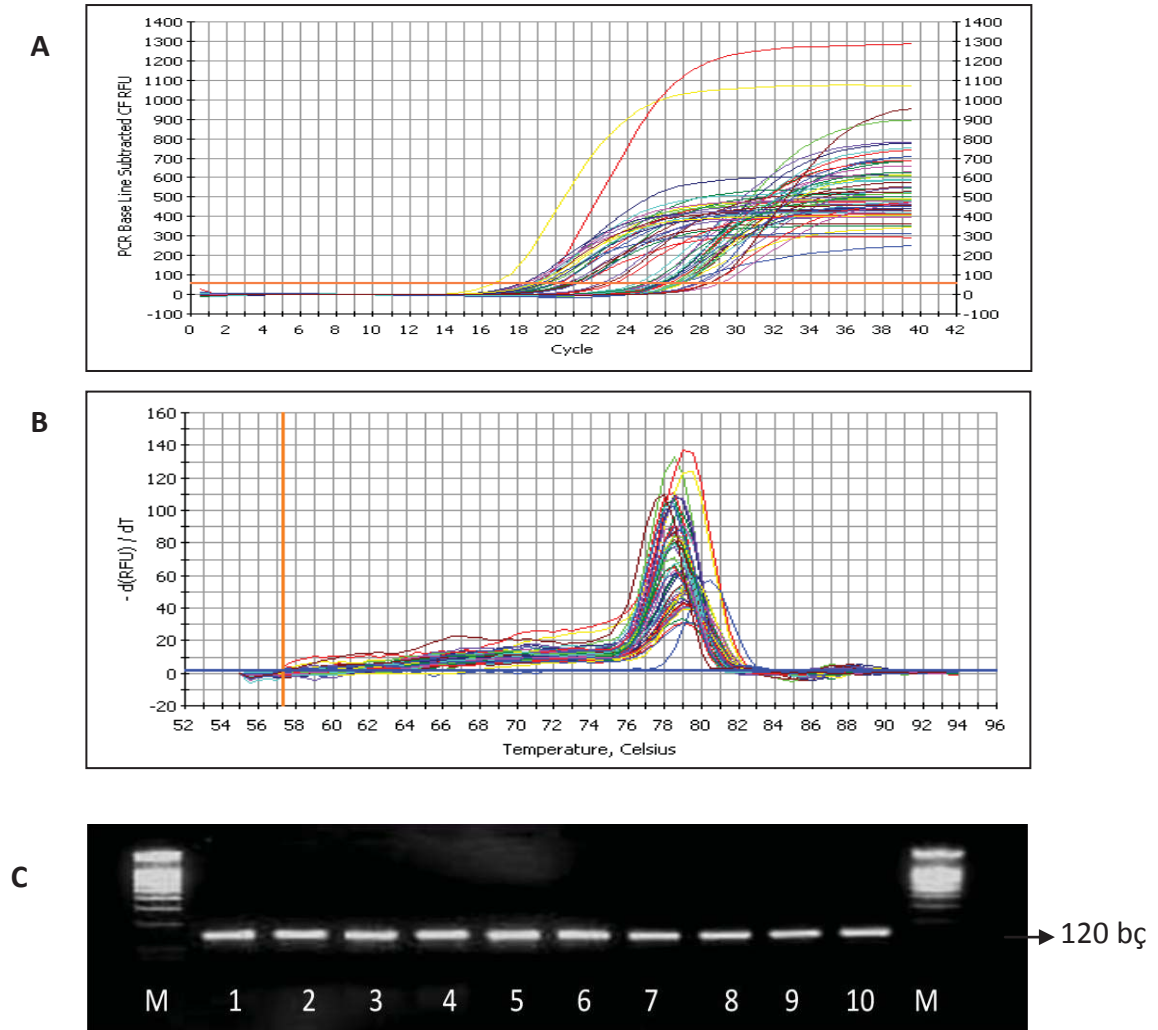




**Şekil 4.21.** ATG3 gen ifadesinin GH5,GH6 için nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.**Standart, standart<sup>-1</sup>, standart<sup>-2</sup> için nicel gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri. **B.** ATG3 geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü: sırasıyla 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>,10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> standart seyreltmeler **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH5, **3:** GH6, **4:** Kontrol fibroblast (açlık), **5:** GH5 (açlık), **6:** GH6 (açlık), **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi **C.** Standartların erime eğrileri **D.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri. **E.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **F.** Standart grafik.

**EK 8.** ATG5 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

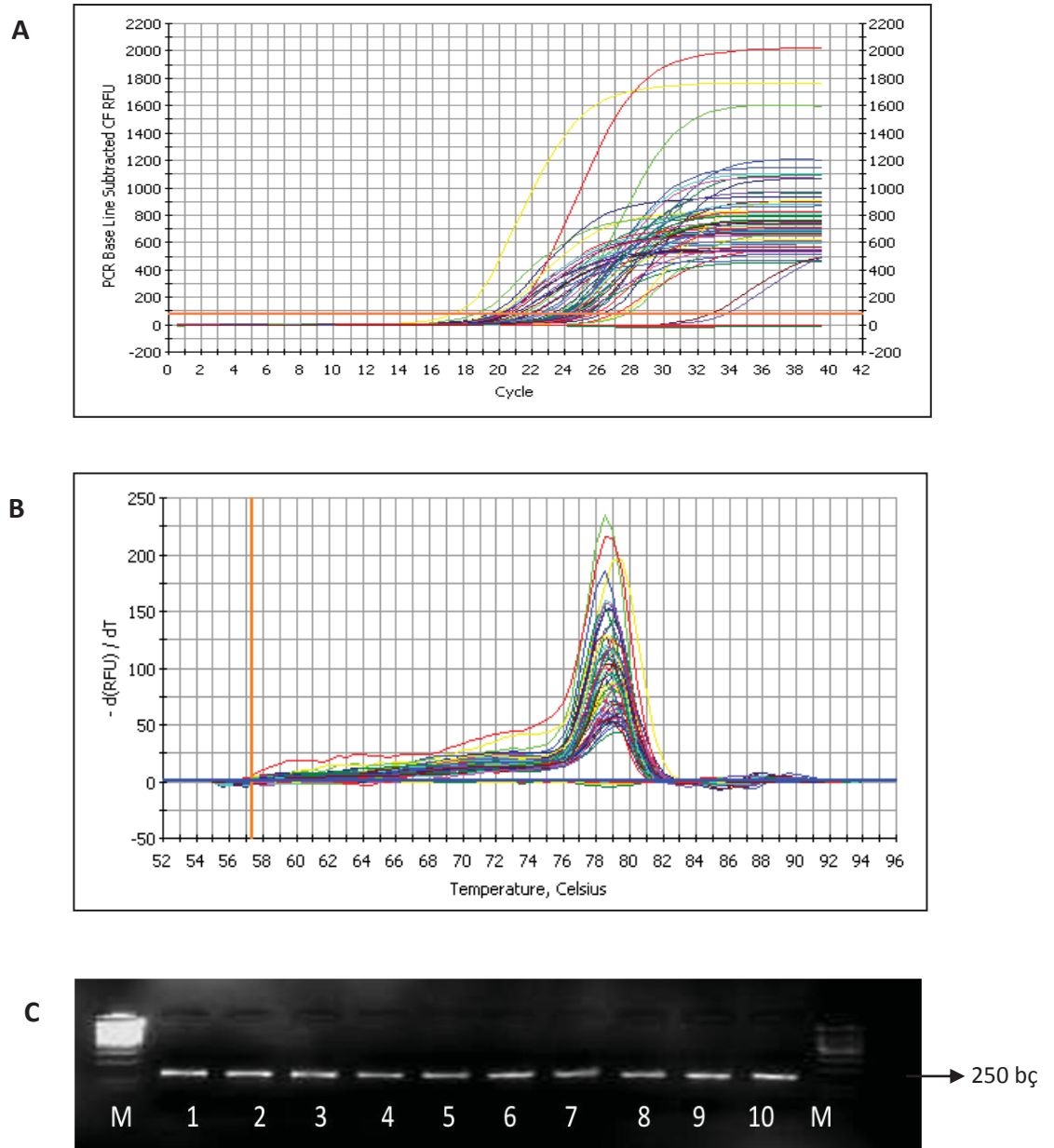


**Şekil 4.22.** ATG5 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri **B.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **C.** Atg5 geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü; sırasıyla **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH1, **3:** GH2, **4:** GH3, **5:** GH4, **6:** Kontrol fibroblast (açlık), **7:** GH1 (açlık), **8:** GH2 (açlık), **9:** GH3 (açlık), **10:** GH4 (açlık), **M:** 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi



### EK 9. LC3 gen ifadesinin nicel gerçek zamanlı PZR ile miktar analizi

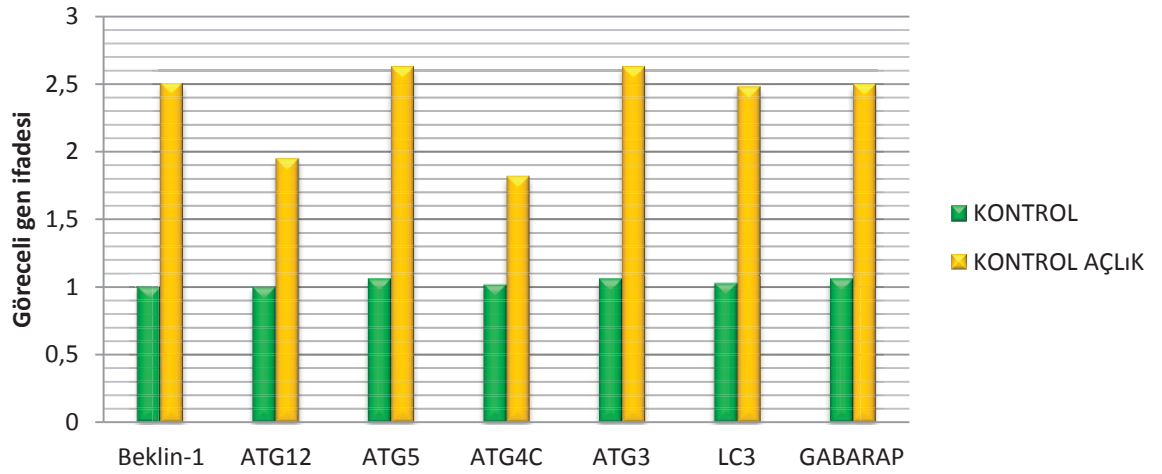


**Şekil 4.23.** LC3 gen ifadesinin Nicel Gerçek Zamanlı PZR ile miktar analizi

**A.** Standart ve örneklerin amplifikasyon eğrileri **B.** Standart ve örneklerin erime eğrileri. **C.** LC3 geni nicel gerçek zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü; sırasıyla **1:** Kontrol fibroblast, **2:** GH1, **3:** GH2, **4:** GH3, **5:** GH4, **6:**

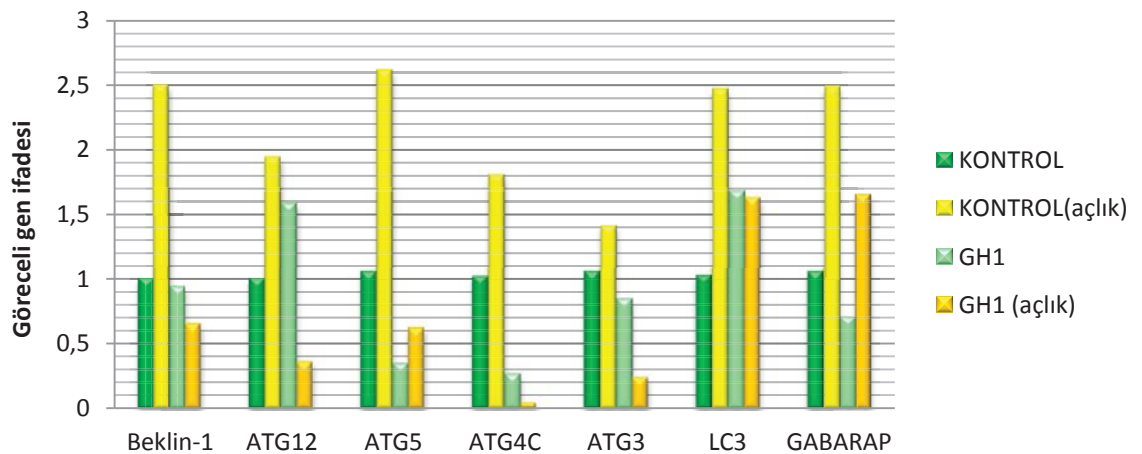
Kontrol fibroblast (açlık), **7**: GH1 (açlık), **8**: GH2 (açlık), **9**: GH3 (açlık), **10**: GH4 (açlık), **M**: 100 bç'lik moleküler ağırlık belirleyicisi.

**EK 10.** Otofaji gen ifadelerinin normal ve açlık koşullarında kontrol fibroblast hücrelerindeki değişimi

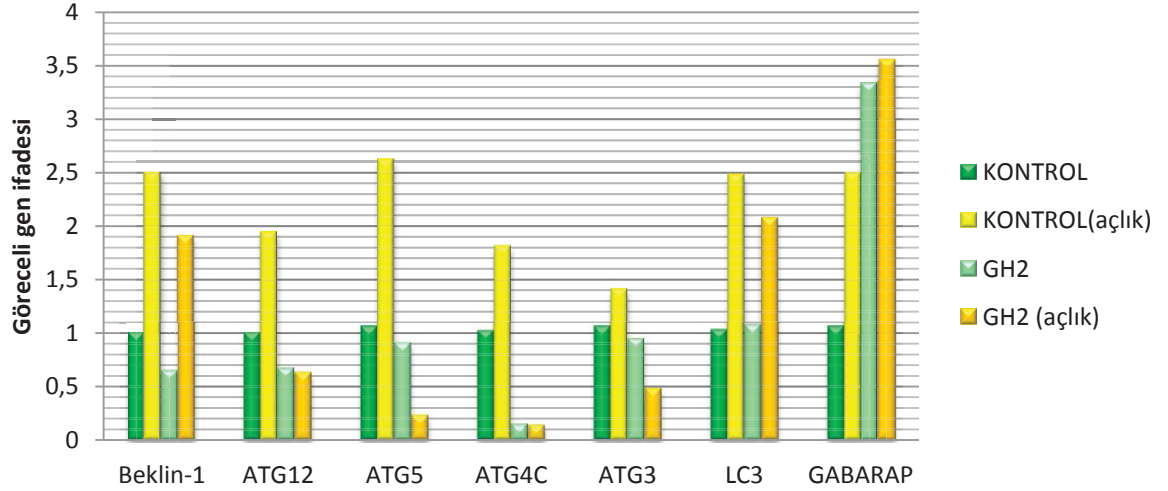
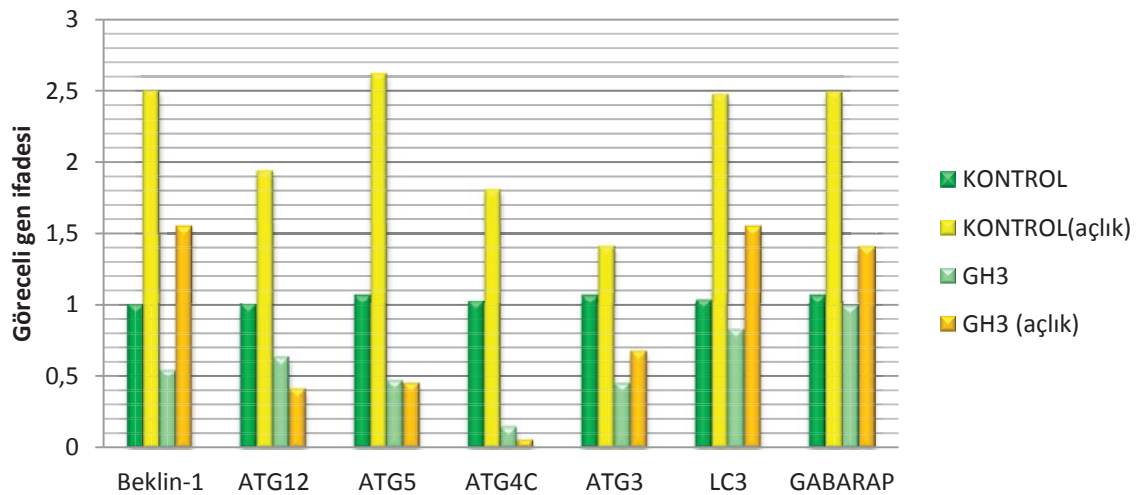


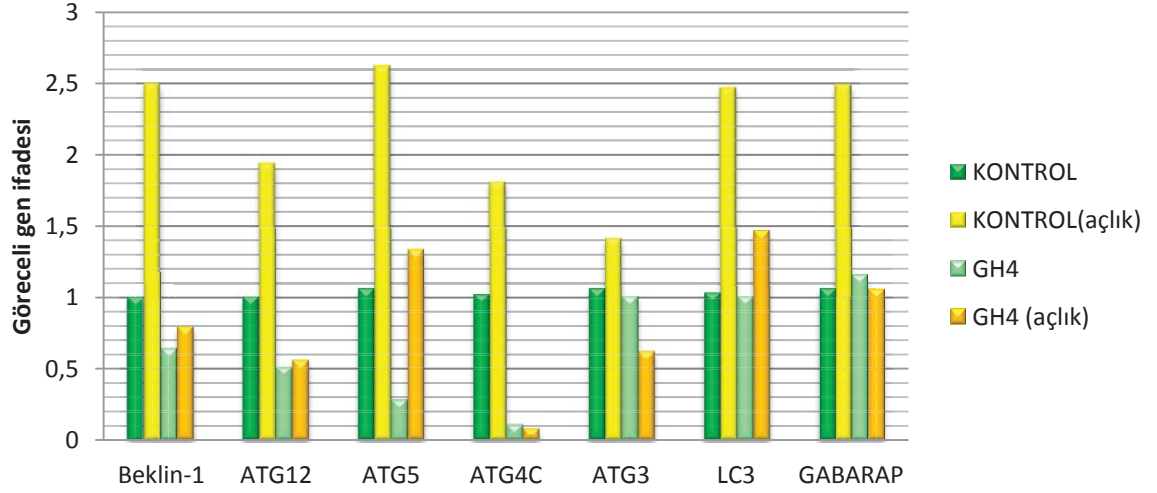
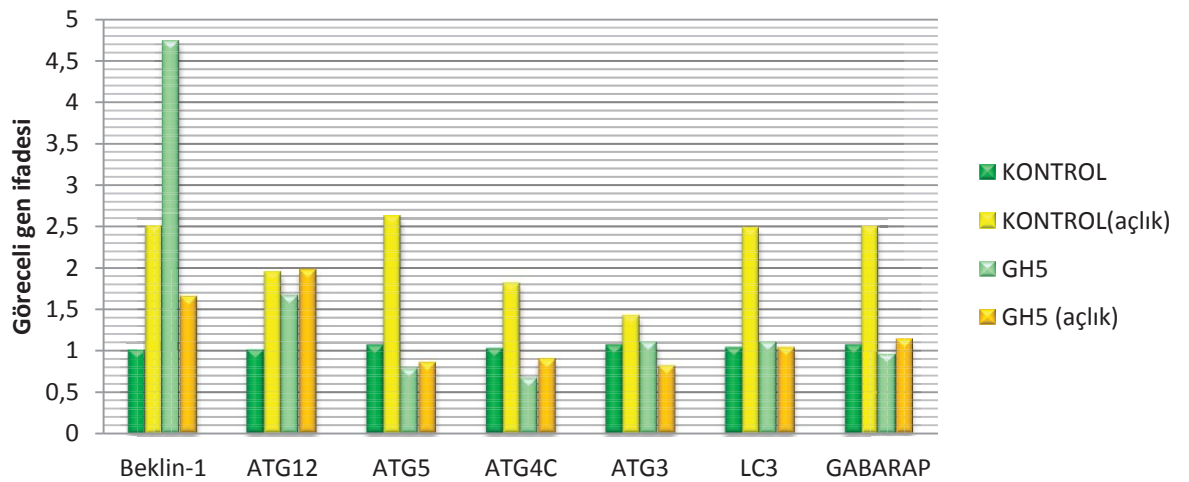
**Şekil 4.24.** Otofaji gen ifadelerinin normal ve açlık koşullarında kontrol fibroblast hücrelerindeki değişim grafiği

**EK 11.** Otofaji gen ifadelerinin GH1 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi

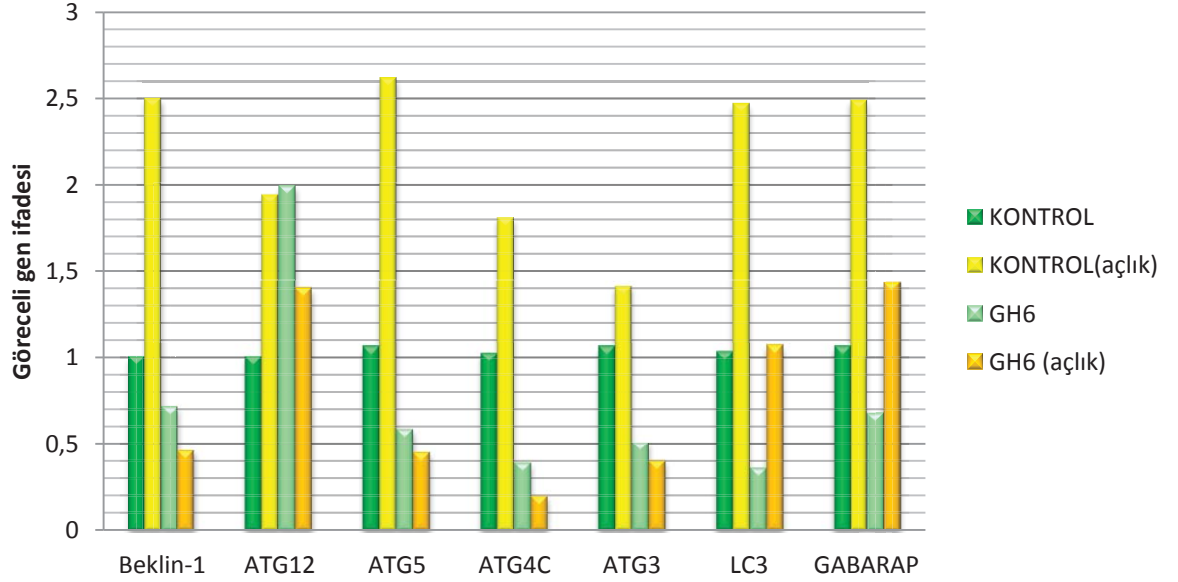


**Şekil 4.25.** Otofaji gen ifadelerinin GH1 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişim grafiği

**EK 12.** Otofaji gen ifadelerinin GH2 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi**Şekil 4.26.** Otofaji gen ifadelerinin GH2 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişim grafiği**EK 13.** Otofaji gen ifadelerinin GH3 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi**Şekil 4.27.** Otofaji gen ifadelerinin GH3 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişim grafiği

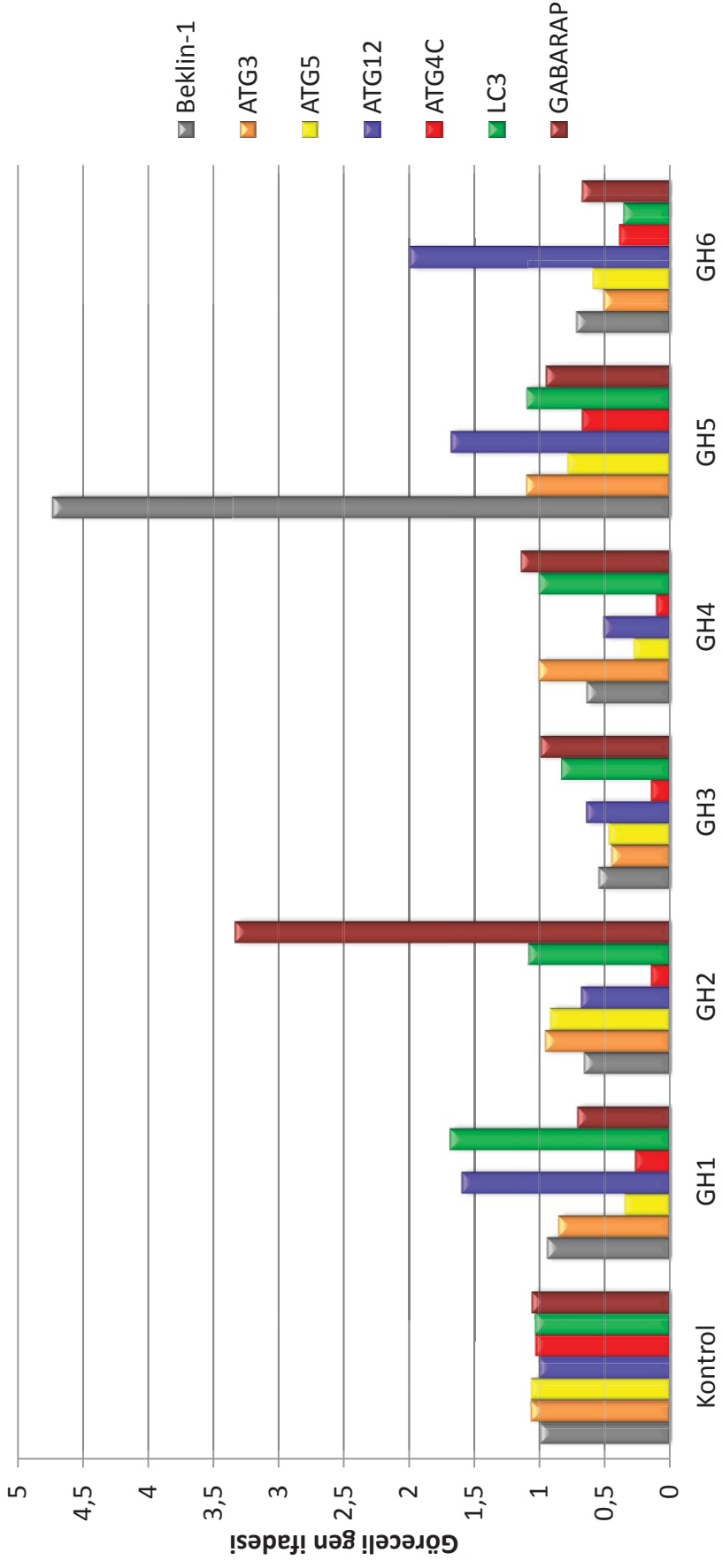
**EK 14.** Otofaji gen ifadelerinin GH4 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi**Şekil 4.28.** Otofaji gen ifadelerinin GH4 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişim grafiği**EK 15.** Otofaji gen ifadelerinin GH5 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi**Şekil 4.29.** Otofaji gen ifadelerinin GH5 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişim grafiği

**EK 16.** Otofaji gen ifadelerinin GH6 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişimi



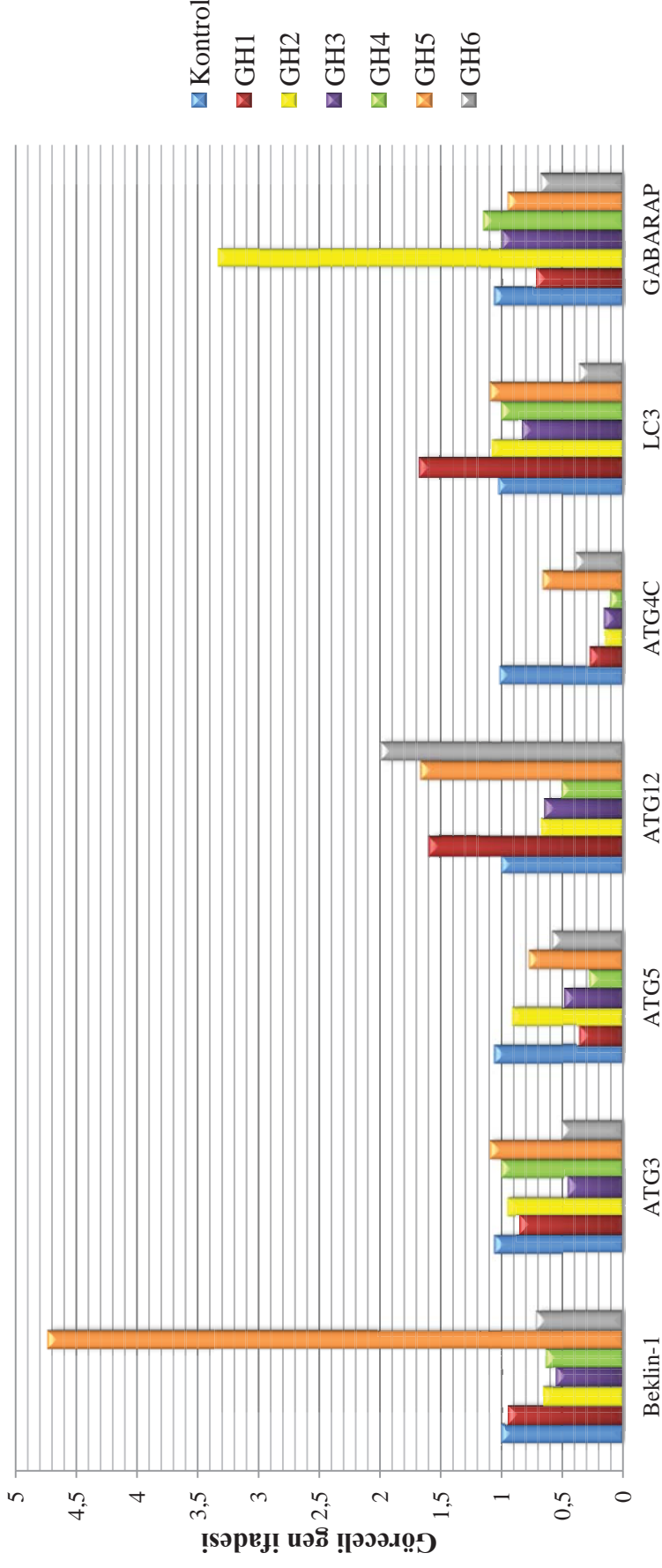
**Şekil 4.30.** Otofaji gen ifadelerinin GH6 için kontrol fibroblast hücrelerine göre değişim grafiği

**EK 17.** Hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda otofaji gen ifadelerinin kontrol fibroblastla Gaucher hastalarındaki değişimi



**Şekil 4.31.** Hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda otofaji gen ifadelerinin kontrol fibroblastla Gaucher hastalarındaki değişimi grafiği

**EK 18.** Hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda otofaji gen ifadelerinin kontrol fibroblastta kıyasla değişimi



**Şekil 4.32.** Hücre içi açlığın oluşturulmadığı koşullarda otofaji gen ifadelerinin kontrol fibroblastta kıyasla değişiminin grafiği

140

## ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 16.ŞUBAT.2012 PERŞEMBE  
 Toplantı No : 2012/01  
 Proje No : TBK 12/09 (Değerlendirme Tarihi 16.02.2012)  
 Karar No : TBK 12/09-12

Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi öğretim görevlilerinden Dr. Özlem Oral'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof. Dr. Serap Emre Dökmeci ve Prof. Dr. Aysel Yüce ile birlikte çalışacakları TBK 12/09 kayıt numaralı ve "Bir Lizozomal Depo Hastalığı Olan Gaucher Hastalığında, Otofaji Mekanizması ve Aktivitesinin Moleküler ve Hücresel Düzeyde İncelenmesi" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- |                                   |          |                                      |       |
|-----------------------------------|----------|--------------------------------------|-------|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu        | (Başkan) | 10 Prof. Dr. Songül Vaizoğlu         | (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken    | (Üye)    | 11. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan         | (Üye) |
| 3. Prof. Dr. Hakan S. Örer        | (Üye)    | 12. Doç. Dr. R. Köksal Özgül         | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. F. Sevda Müftüoğlu   | (Üye)    | 13. Doç. Dr. Cansın Saçkesen         | (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer      | (Üye)    | 14. Doç. Dr. Melahat Görduysus       | (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Bülent Sivri         | (Üye)    | 15. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan       | (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Meral Aksoy          | (Üye)    | 16. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl | (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay | (Üye)    | 17. Av. Meltem Onurlu                | (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal   | (Üye)    |                                      |       |



