

**KALITSAL METABOLİK HASTALIKLARDA
ANTIOKSİDAN YANIT VE OTOFAJİNİN
P62/NRF2/KEAP1 YOLAĞI ARACILIĞIYLA
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT RESPONSE AND
AUTOPHAGY BY P62/NRF2/KEAP1 PATHWAY IN
INHERITED METABOLIC DISEASES**

NEŞE VARDAR ACAR

PROF. DR E. SİBEL SÜMER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

Metabolizma Ünitesine yolu düşen tüm güzel çocuklarıma

ve

kıymetli ailelerine

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

15 / 06 / 2020



NEŞE VARDAR ACAR

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

15... / 06. /2020



NEŞE VARDAR ACAR

ÖZET

KALITSAL METABOLİK HASTALIKLARDA ANTİOKSİDAN YANIT VE OTOFAJİNİN P62/NRF2/KEAP1 YOLAĞI ARACILIĞIYLA ARAŞTIRILMASI

Neşe VARDAR ACAR

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. E. Sibel SÜMER

Eş Danışman: Prof. Dr. R. Köksal Özgül

Haziran 2020, 183 sayfa

Metabolik yollarda yer alan enzim, enzim kofaktörü, taşıyıcı eksikliği ya da bozukluğu sebebiyle, substratın birikmesi ve/veya son ürün eksikliğine neden olan kalıtsal metabolik hastalıklar (KMH'lar), çocukluk dönemi morbidite ve mortalitenin önemli nedenleri arasında olan tek gen bozukluklarıdır. Patofizyolojik bir bakış açısıyla metabolik bozukluklar, intoksikasyon tipi, enerji eksikliği tipi ve depolama tipi olmak üzere üç ana grupta incelenmektedir.

KMH'ların da dahil olduğu pek çok hastalığın patofizyolojisinde oksidatif stres (OS), önemli bir rol oynamaktadır. KMH'larda, biriken toksik metabolitler kadar, ROS (reaktif oksijen türleri) ve RNS (reaktif nitrojen türleri) de hastalık patofizyolojisine önemli katkıda bulunmaktadır. OS'nin mitokondriyal işlev bozukluğuna, hücresel yollardaki metabolitlerin değişimine, proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın da dahil olduğu moleküllerde hasara neden olduğu bilinmektedir. En az OS kadar azaltıcı stres de; hücre

büyüme tepkilerini azaltması, proteinlerde disülfür bağlarının oluşumunda değişikliklere yol açması, mitokondriyal fonksiyonu ve hücrel metabolizmayı azaltması ile hücre homeostazının sağlanmasında tehlike arz etmektedir.

Hücrel strese karşı hücrel savunma mekanizmalarının ana düzenleyicisi olarak kabul edilen Nrf2/Keap1 yolağı, hasarlı makromoleküllerin onarımında veya ortadan kaldırılmasında görev alan çeşitli hücre koruyucu protein ağlarına ait gen ekspresyonlarını düzenleyerek, hücrenin stres koşullarında hayatta kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca seçici otofaji, Nrf2/Keap1/p62 yoluyla bağlantılıdır. Artan OS ile hücre ölüme yönlendirilmeden önce koruyucu bir alarm sistemi gibi işlev gören p62, otofaji için kargo reseptörü olarak işlev görür.

Bu çalışmanın amacı, KMH'larda OS, mitokondriyal disfonksiyon ve otofaji arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, 6 sağlıklı ve 45 KMH sahibi birey (metilmalonik (MMA), propiyonik (PA), izovalerik (İVA) asidemi, mitokondriyal hastalıklar (MİT) ve mukopolisakkaridoz IV (MPS IV)) incelenmiştir. TAS (Total Antioksidan Seviye)/TOS (Total Oksidan Seviye) analizleri; hücre içi ATP, ROS ve mitokondri membran potansiyelinin (MMP) ölçümü ve hücre görüntülemesi; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ve Western Blot analizleri olmak üzere periferik kan kullanılarak 6 farklı deney planı oluşturulmuştur.

TAS/TOS analizleri sonucu sağlıklı gruba göre en yüksek antioksidan cevap MMA grubunda saptanmıştır. Hücre deneylerinde MMA ve İVA grubunda sağlıklıya göre yüksek ROS değerleri saptanırken; PA, MİT ve MPS IV gruplarında düşük ROS değerleri tespit edilmiştir. Hücre içi ATP miktarlarının değişimleri KMH gruplarının ROS değişimleri ile uyumludur. KMH gruplarında sağlıklı gruba kıyasla MMP'de büyük değişimler saptanmamakla birlikte mitokondriyal fonksiyonda değişiklikler tespit edilmiştir. Hücre görüntüleme deneyleri, KMH gruplarında yer alan her bir hasta bireyin ayrı olarak değerlendirilmesi gerekliliğini göstermektedir. Tüm KMH gruplarında sağlıklı gruba kıyasla Nrf2/Keap1/p62 yolağında indüksiyon saptanmış, HMOX1'deki artış temel detoksifikasyon enziminin HO-1 olduğuna işaret etmiştir. MİT ve MPS IV gruplarında saptanan LC3B-II ve p62'deki artış, otofajik akışta problem olduğuna işaret etmekle birlikte; MMA, PA ve İVA gruplarında artan LC3B-II ve azalan p62, otofajik

akış indüksiyonunu göstermektedir. Tüm KMH'larda gözlenen kısmi Beclin1 ekspresyonu, hücrelerin ölüm yollarına yönlendirilmeden, otofaji aktivasyonunu sağlayan bir adaptasyon olarak karşımıza çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kalıtsal metabolik hastalıklar, oksidatif stres, Nrf2/Keap1 yolağı, p62, antioksidan yanıt, mitokondriyal disfonksiyon, otofaji.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT RESPONSE AND AUTOPHAGY BY P62/NRF2/KEAP1 PATHWAY IN INHERITED METABOLIC DISEASES

Neşe VARDAR ACAR

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sibel SÜMER

Co- Supervisor: Prof. Dr. R. Köksal Özgül

June 2020, 183 pages

Due to the enzyme, enzyme cofactor, carrier deficiency or disorder in the metabolic pathways, Inherited Metabolic Diseases (IMDs) cause the accumulation of the substrate and / or end product deficiency that are the single gene disorders, among the important causes of childhood morbidity and mortality. From a pathophysiological point of view, metabolic disorders are examined in three main groups: intoxication type, energy deficiency type and storage type.

Oxidative stress (OS) plays an important role in the pathophysiology of many diseases, including IMDs. In IMDs, ROS (reactive oxygen species) and RNS (reactive nitrogen species) contribute significantly to disease pathophysiology as well as accumulated toxic metabolites. It is known that OS causes mitochondrial dysfunction, the change of metabolites in cellular pathways, damage to molecules including proteins, lipids and

DNA. Reductive stress is dangerous for ensuring cell homeostasis as OS that reduce cell growth responses, cause changes in the formation of disulfide bonds in proteins, decrease mitochondrial function and cellular metabolism.

The Nrf2/Keap1 pathway is considered the main regulator of cellular defense mechanisms against cellular stress that allows the cell to survive in stress conditions by regulating gene expressions of various cell protective protein networks involved in repairing or eliminating damaged macromolecules. Also, selective autophagy is linked via Nrf2/Keap1/p62. Before the cell is directed to death with increased OS, p62 functions as a protective alarm system, as a cargo receptor for autophagy.

The aim of this study is to investigate the relationship between OS, mitochondrial dysfunction and autophagy in IMDs. For this purpose, 6 healthy and 45 individuals with IMD (methylmalonic (MMA), propionic (PA), isovaleric (IVA) acidemia, mitochondrial diseases (MIT) and mucopolysaccharidosis IV (MPS IV) were examined. Six different experimental plans were created using peripheral blood including TAS (Total Antioxidant Status)/TOS (Total Oxidant Status) analysis, intracellular ATP, ROS and mitochondrial membrane potential (MMP) measurement and cell imaging, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis.

As a result of TAS/TOS analysis, the highest antioxidant response was found in the MMA group compared to the healthy group. In cell experiments, while high ROS values were determined in the MMA and IVA groups compared to healthy ones; low ROS values were detected in PA, MIT and MPS IV groups. In intracellular ATP amounts of alteration are compatible with ROS changes of IMD groups. Although there are no major changes in MMP in IMD groups compared to the healthy group, alteration of mitochondrial function have been detected. Cell imaging experiments demonstrate that each patient in the IMD groups should be evaluated separately. Induction of the Nrf2/Keap1/p62 pathway was detected in all IMD groups compared to the healthy group, and the increase in HMOX1 expression indicated that the main detoxification enzyme was HO-1.

The increase in LC3B-II and p62 protein expression detected in MIT and MPS IV groups indicates that there is a problem in autophagic flux; increased LC3B-II and decreased p62

in the MMA, PA and IVA groups indicate autophagic flux induction. Partial expression of Beclin1 observed in all IMDs is an adaptation that enables autophagy activation without directing the cells to the death pathways.

Keywords: Inherited metabolic diseases, oxidative stress, Nrf2/Keap1 pathway, p62, antioxidant response, mitochondrial dysfunction, autophagy.

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden bu yana tecrübesi, anlayışı ve sevgisiyle yanımda olan, tezimi tamamlayabilmem için yeni yollar açan değerli danışmanım Sayın Prof.Dr. E. Sibel SÜMER'e; tez çalışmalarımın yapılmasında tüm olanaklarını sunan, çalışmalarım süresince kıymetli bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen, beni sabırla dinleyen, önümdeki tüm engelleri kaldırarak bu yolda yürümemi sağlayan, gönül borcumu hiçbir zaman ödeyemeyeceğim değerli hocam Sayın Prof.Dr. R. Köksal Özgül'e; beni kendi öğrencilerinden ayırmayan, tezimin biyolojik materyallerinin toplanmasında büyük bir titizlikle yardımcı olan Sayın hocam Prof.Dr. Ali DURSUN'a; çalışmam boyunca desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen, beni sabırla dinleyen canım hocalarım Dr.Öğr. Üyesi Didem YÜCEL YILMAZ ve Doç.Dr. Basri GÜLBAKAN'a; tez çalışmalarımın yapılabilmesi için her türlü imkanı sağlayan, yıllardır öğrencisiymişim gibi beni sahiplenen, hiç bıkmadan dinleyen, güler yüzüyle parlayan Sayın hocam Prof.Dr. İncilay LAY'a; çalışmamın yapılmasında desteklerini esirgemeyen, Hacettepe Ü. Tıp Fak. Pediatrik Metabolizma ve Tıbbi Biyokimya ABD'lerindeki tüm hocalarıma; desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen Sayın hocam Doç.Dr. Esra BİR BEN'e ve Uzm.Dr. Eda ÖZAYDIN'a; yardımları ve güler yüzüyle kapıları sonuna kadar açan Onur AKTAN'a, özveriyle yardımcı olan Gizem ÖNAL'a, hücrelerimi görünür kılan Özge B. ŞAHAN ve Selda AYHAN'a, tezin istatistiksel değerlendirilmesini yapan Merve KAŞIKÇI'ya; çalışmamda biyolojik örneklerin toplanmasında büyük bir sabır ve emekle yardımcı olan, güler yüzlerini ve hoş sohbetlerini esirgemeyen Metabolizma Bilim Dalı sekreterleri, hemşireleri ve postasına; elim, gözüm, kulağım, kalbim, kardeşim, ablam olan, benimle ağlayıp benimle gülen, başta sayelerinde çalışmamın sonunu görebilmemi sağlayan Damla AYGÜN, H. Esra GÜRSES CİLA, Can KOŞUKÇU olmak üzere, Esin GÖKSUN, Buket YURTERİ, Fatma KARADOĞAN, Damla YILDIZ'a; beni bıkmadan sabırla dinleyen canımın içi arkadaşlarım İpek İKİZ, Nütiye ÖZKAN ve Gülden İNAL'a; gönlümün gülen yüzü, sabrı, emeği, fikirleri ile hep yanımda olan yol arkadaşım, eşim Tarık ACAR'a; destekleri ve anlayışları için eşimin sevgili ailesine; her düşüğümde ayağa kaldıran, olağanüstü bir sabırla beni dinleyen, benden çok bana inanan, evlatları olmaktan büyük gurur duyduğum bitanelerim sevgili **babama** ve **anneme**; her daim yanımda olan, canlarım, bitanelerim, ablalarım Melike VARDAR BÜYÜKBAKKAL, Meltem VARDAR ve Doç.Dr. Naciye VARDAR YAĞLI'ya içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	4
2.1.2. Kalıtım.....	5
2.1.3. Patofizyoloji.....	6
2.1.4. Sınıflandırma.....	6
2.1.4.1. İntoksikasyona Neden Olan Bozukluklar.....	8
2.1.4.2. Enerji Metabolizmasını İlgilendiren Bozukluklar.....	8
2.1.4.3. Karmaşık Molekülleri İçeren Bozukluklar.....	9
2.2. KMH'larda Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Disfonksiyon.....	10
2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	10
2.2.1.1. ROS Dengesi ve Antioksidan Savunma Sistemi.....	13
2.2.1.2. ROS'un Fizyolojik Rolü.....	15
2.2.2. Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Disfonksiyon.....	17
2.2.3. KMH'ların Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Disfonksiyon İle İlişkisi	20
2.3. Oksidatif Stres Cevabı: Nrf2.....	22
2.3.1. Nrf2'nin Hücrel Fonksiyonu.....	22
2.3.2. Nrf2'nin Regülasyonu.....	27
2.3.2.1. Klasik (Kanonik) Nrf2 Aktivasyonu: Nrf2/Keap1 Yolağı.....	28
2.3.2.1.1. Nrf2/Keap1 Yolağı Bileşenleri.....	28
2.3.2.1.2. Nrf2/Keap1 Yolağı.....	31
2.3.2.2. Alternatif (Nonkanonik) Nrf2 Aktivasyonu.....	33

2.4. Oksidatif Stres ve Otofaji İlişkisi: p62/Nrf2/Keap1 Yolağı.....	37
2.4.1. Otofaji.....	37
2.4.1.1. Otofaji Çeşitleri.....	38
2.4.1.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması.....	41
2.4.2. Otofaji ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki	53
2.4.3. Otofaji ve Kalıtsal Metabolik Hastalıklar.....	58
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	62
3.1. Hasta ve Sağlıklı Gruplarından Biyolojik Örneklerin Toplanması.....	62
3.2. Serum, Plazma ve Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PBMC) Eldesi.....	65
3.3. Oksidatif Stres, Mitokondriyal Disfonksiyon ve Otofaji Yolaklarının İncelenmesi	67
3.3.1. TAS (Total Antioksidan Seviye) / TOS (Total Oksidan Seviye) Analizleri	67
3.3.2. Oksidatif Stres, Antioksidan Enzimler ve Otofaji İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin RT-PZR Yöntemi İle Saptanması	69
3.3.3. Hücre İçi ROS Miktarı, Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Hücre İçi ATP Miktarının Ölçümü.....	74
3.3.3.1. Hücre İçi ROS Miktarı, Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Hücre İçi ATP Miktarının Ölçümlerinde Yapılan Kontrol Deneyleri.....	75
3.3.3.2. Hücrelerin Çözünmesi	77
3.3.3.3. Hücre İçi ATP Miktarının Ölçümü.....	77
3.3.3.4. Mitokondri Membran Potansiyelinin (MMP) Ölçümü.....	78
3.3.3.5. Hücre İçi ROS Miktarının Ölçümü.....	78
3.3.3.6. Hücre Görüntüleme Deneyleri.....	79
3.3.4. Oksidatif Stres, Antioksidan Enzimler ve Otofaji İlişkili Gen Ürünü Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Saptanması	79
3.4. İstatistiksel Analiz.....	84
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	85
4.1. SONUÇLAR	85
4.1.1. TAS (Total Antioksidan Seviye) /TOS (Total Oksidan Seviye) Analizleri	85
4.1.1.1. TAS Analiz Sonuçları.....	85

4.1.1.2.	TOS Analiz Sonuçları	89
4.1.1.3.	OSİ Analiz Sonuçları	94
4.1.2.	RT-PZR Analizleri	98
4.1.3.	Hücre İçi ROS Miktarı, Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Hücre İçi ATP Miktarı Ölçüm Analizleri	109
4.1.3.1.	Kontrol Deneyleri Sonuçları	109
4.1.3.2.	Hücre İçi ATP Miktarının Ölçüm Analizleri	111
4.1.3.3.	Hücre İçi ROS Miktarının Ölçüm Analizleri	116
4.1.3.4.	Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP) Ölçüm Analizleri.....	120
4.1.3.5.	Görüntüleme Sonuçları	125
4.1.4.	Western Blot Analizleri	131
4.2.	TARTIŞMA.....	138
5.	YORUM	158
6.	KAYNAKLAR.....	160
EKLER		181
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi		181
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu		182
ÖZGEÇMİŞ		183

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	KMH'larda genel patofizyoloji	6
Şekil 2.2.	Dört ve bir elektron şemaları ile moleküler oksijenin indirgenmesi	10
Şekil 2.3.	ROS üretiminin hücrel kaynakları.....	13
Şekil 2.4.	a)Enzimatik antioksidanlar. b) Glutasyon sisteminin mekanizması. c) Tiyoredoksin sisteminin mekanizması	15
Şekil 2.5.	Biyolojik sistemlerde ROS dinamiği.....	21
Şekil 2.6.	Nrf2'nin hedef genleri tarafından uyarılan hücrel yollar	23
Şekil 2.7.	Nrf2 regülasyonu	27
Şekil 2.8.	Nrf2'nin yapısı.....	29
Şekil 2.9.	Keap1'in yapısı.....	30
Şekil 2.10.	Potansiyel ARE bağlayıcı transkripsiyon faktörü kompleksleri.....	31
Şekil 2.11	Nrf2'nin Keap1 tarafından regülasyonu	33
Şekil 2.12.	Nrf2'nin kinazlar tarafından regülasyonu.....	35
Şekil 2.13.	p62-aracılı Nrf2/Keap1 yolağı.....	37
Şekil 2.14.	Memeli hücrelerindeki otofajik yollar	39
Şekil 2.15.	Otofaji sürecine genel bakış	43
Şekil 2.16.	mTOR komplekslerinin yapısı ve sinyal yolları.....	44
Şekil 2.17.	mTORC1 aracılığıyla otofaji regülasyonu	45
Şekil 2.18.	ULK1 kompleksinin mTORC1 ve AMPK tarafından regülasyonu	47
Şekil 2.19.	Otofagozom transportu (A), otofagozom-lizozom füzyonu (B).....	53
Şekil 2.20.	ROS'un aracılık ettiği otofaji regülasyonu	55
Şekil 2.21.	Otofajinin ROS tarafından transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel regülasyonu.....	56
Şekil 2.22.	MMA, PA ve İVA organik asidemilerinin önerilen biyokimyasal patogenezi	59
Şekil 3.1.	Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylerden oluşan çalışma grubu sayıları	62
Şekil 3.2.	PBS ilave edilmiş periferik kan örneğinin fikole yayılması.....	66
Şekil 4.1.	Sağlıklı ve KMH gruplarının TAS ortalaması.....	86
Şekil 4.2.	Sağlıklı ve MMA gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması..	87

Şekil 4.3.	Sağlıklı ve PA gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması	87
Şekil 4.4.	Sağlıklı ve İVA gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması	88
Şekil 4.5.	Sağlıklı ve mitokondriyal gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması	88
Şekil 4.6.	Sağlıklı ve MPS IV gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması.	89
Şekil 4.7.	Sağlıklı ve KMH gruplarının TOS ortalaması	90
Şekil 4.8.	Sağlıklı ve MMA gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması ..	91
Şekil 4.9.	Sağlıklı ve PA gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması	92
Şekil 4.10.	Sağlıklı ve İVA gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması.	92
Şekil 4.11.	Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması.	93
Şekil 4.12.	Sağlıklı ve MPS IV gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması.	93
Şekil 4.13.	Sağlıklı ve KMH gruplarının OSİ ortalaması	95
Şekil 4.14.	Sağlıklı ve MMA gruplarının OSİ değerleri açısından karşılaştırılması ...	96
Şekil 4.15.	Sağlıklı ve PA gruplarının OSİ değerleri açısından karşılaştırılması	96
Şekil 4.16.	Sağlıklı ve İVA gruplarının OSİ değerleri açısından karşılaştırılması	97
Şekil 4.17.	Sağlıklı ve mitokondriyal gruplarının OSİ değerleri açısından karşılaştırılması	97
Şekil 4.18.	Sağlıklı ve MPS IV gruplarının OSİ değerleri açısından karşılaştırılması.	98
Şekil 4.19.	Sağlıklı ve MMA gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri	100
Şekil 4.20.	Sağlıklı ve PA gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri.....	101
Şekil 4.21.	Sağlıklı ve İVA gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri.....	102
Şekil 4.22.	Sağlıklı ve mitokondriyal gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri	103
Şekil 4.23.	Sağlıklı ve MPS IV gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri	104

Şekil 4.24.	Sağlıklı ve KMH gruplarının RT-PZR % kat değişimleri A) <i>NRF2</i> ekspresyonu, <i>KEAP1</i> ekspresyonu	105
Şekil 4.25.	Sağlıklı ve KMH gruplarının RT-PZR % kat değişimleri A) <i>SOD1</i> ekspresyonu, <i>NQO1</i> ekspresyonu.....	106
Şekil 4.26.	Sağlıklı ve KMH gruplarının RT-PZR % kat değişimleri A) <i>HMOX1</i> ekspresyonu, B) <i>p62</i> ekspresyonu	107
Şekil 4.27	Sağlıklı ve KMH gruplarının RT-PZR % kat değişimleri A) <i>mTOR</i> ekspresyonu, B) <i>BECN1</i> ekspresyonu.....	108
Şekil 4.28.	Sağlıklı ve KMH gruplarının <i>LC3B</i> RT-PZR % kat değişimleri.	109
Şekil 4.29.	Hücre içi ATP miktar ölçümü deneyinde optimum stresin indüklendiği H_2O_2 miktarının belirlenmesi.....	110
Şekil 4.30.	Hücre içi ATP miktarı ölçüm deneyinde optimum hücre sayısının doğrulanması	110
Şekil 4.31.	Hücre içi ROS miktarının ölçümü deneyinde optimum hücre sayısının doğrulanması ve H_2O_2 etkisi.....	111
Şekil 4.32.	Mitokondri membran potansiyelinin ölçümü deneyinde optimum hücre sayısının doğrulanması ve H_2O_2 etkisi.....	111
Şekil 4.33.	Sağlıklı ve KMH gruplarında hücre içi ATP miktarının ortalaması	112
Şekil 4.34	Sağlıklı ve MMA gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.....	113
Şekil 4.35.	Sağlıklı ve PA gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.....	114
Şekil 4.36.	Sağlıklı ve İVA gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.....	114
Şekil 4.37.	Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.	115
Şekil 4.38.	Sağlıklı ve MPS IV hasta gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.....	115
Şekil 4.39.	Sağlıklı ve KMH gruplarında hücre içi ROS miktarının ortalaması	117
Şekil 4.40.	Sağlıklı ve MMA gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması.....	118
Şekil 4.41.	Sağlıklı ve PA gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması.....	118

Şekil 4.42.	Sağlıklı ve İVA gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması	119
Şekil 4.43.	Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması	119
Şekil 4.44.	Sağlıklı ve MPS IV gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması	120
Şekil 4.45.	Sağlıklı ve KMH gruplarında hücre içi MMP miktarının ortalaması	121
Şekil 4.46.	Sağlıklı ve MMA gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması	122
Şekil 4.47.	Sağlıklı ve PA gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması	123
Şekil 4.48.	Sağlıklı ve İVA gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması	123
Şekil 4.49.	Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması	124
Şekil 4.50.	Sağlıklı ve MPS IV hasta gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması	124
Şekil 4.51.	Sağlıklı ve MMA hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi.....	125
Şekil 4.52.	Sağlıklı ve PA hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi.....	126
Şekil 4.53.	Sağlıklı ve İVA hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi.....	126
Şekil 4.54.	Sağlıklı ve MİT hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi.....	127
Şekil 4.55.	Sağlıklı ve MPS IV hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi.....	127
Şekil 4.56.	Sağlıklı ve MMA hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi.....	128
Şekil 4.57.	Sağlıklı ve PA hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi.....	128
Şekil 4.58.	Sağlıklı ve İVA hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi.....	129

Şekil 4.59.	Sağlıklı ve MİT hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi	129
Şekil 4.60.	Sağlıklı ve MPS IV hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi	130
Şekil 4.61.	MMA ve İVA hasta gruplarında Mitotracker Red ve DAPI görüntülenmesi.	130
Şekil 4.62.	MMA ve İVA hasta gruplarında H ₂ DCFDA ve DAPI görüntülenmesi..	131
Şekil 4.63.	Sağlıklı ve KMH gruplarında Nrf2 western blot analizi	132
Şekil 4.64.	Sağlıklı ve KMH gruplarında mTOR western blot analizi.....	132
Şekil 4.65.	Sağlıklı, MMA ve MPS IV gruplarında Keap1 western blot analizi	133
Şekil 4.66.	Sağlıklı, PA ve İVA gruplarında Keap1 western blot analizi.....	133
Şekil 4.67.	Sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında Keap1 western blot analizi.	134
Şekil 4.68.	Sağlıklı ve MMA gruplarında p62 western blot analizi	134
Şekil 4.69.	Sağlıklı, PA ve İVA gruplarında p62 western blot analizi	135
Şekil 4.70.	Sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında p62 western blot analizi.....	135
Şekil 4.71.	Sağlıklı ve MMA gruplarında Beclin1 western blot analizi.....	136
Şekil 4.72.	Sağlıklı, PA ve İVA gruplarında Beclin1 western blot analizi.....	136
Şekil 4.73.	Sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında Beclin1 western blot analizi	137
Şekil 4.74.	Sağlıklı ve PA gruplarında LC3B western blot analizi	137
Şekil 4.75.	Sağlıklı, MMA ve İVA gruplarında LC3B western blot analizi	138
Şekil 4.76.	Sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında LC3B western blot analizi.....	138

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. KMH' ların klinik sınıflandırması	7
Çizelge 2.2. Serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türler	11
Çizelge 2.3. ROS'un temel fizyolojik rolleri	16
Çizelge 3.1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylerin hastane bilgileri	63
Çizelge 3.2. TAS kit içeriği.....	67
Çizelge 3.3. TOS kit içeriği.....	68
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan RT karışımı.....	70
Çizelge 3.5. RT reaksiyonu için PZR cihazı koşulları	70
Çizelge 3.6. Analiz edilen genler, gradient PZR koşulları ve RT-PZR için belirlenen primer Tm sıcaklığı.....	71
Çizelge 3.7. Çalışılan genler ve RT-PZR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri ...	72
Çizelge 3.8. RT-PZR reaksiyonlarına ait protokol.....	73
Çizelge 3.9. RT-PZR reaksiyonu için termal döngü cihaz koşulları.....	73
Çizelge 3.10. Hücre içi ATP miktarının ölçümünde kullanılan standart tamponun hazırlanması	78
Çizelge 3.11. Çalışılan proteinler, ağırlıkları ve kullanılan jel yüzdeleri	81
Çizelge 3.12. Western blot jeli için gerekli kimyasalların hazırlanması.....	81
Çizelge 3.13. Western blot çalışmasında hazırlanan jeller.....	82
Çizelge 3.14. Western blot yönteminde kullanılan antikorlar.....	84
Çizelge 4.1. Sağlıklı ile KMH gruplarının TOS değerleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması	90
Çizelge 4.2. Sağlıklı ile KMH gruplarının OSİ değerleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması	94
Çizelge 4.3. Sağlıklı ile MMA gruplarının <i>EF1a</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri.....	99
Çizelge 4.4. Sağlıklı ile PA hastalarının <i>EF1a</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri.....	100
Çizelge 4.5. Sağlıklı ile İVA gruplarının <i>EF1a</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri.....	101

Çizelge 4.6. Sağlıklı ile mitokondriyal gruplarının <i>EF1a</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri	102
Çizelge 4.7. Sağlıklı ile MPS IV gruplarının <i>EF1a</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri	104
Çizelge 4.8. Sağlıklı ile KMH gruplarının hücre içi ATP miktarının ölçüm değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	112
Çizelge 4.9. Sağlıklı ile KMH gruplarının hücre içi ROS miktarının ölçüm değerleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması.	116
Çizelge 4.10. Sağlıklı ile KMH gruplarının hücre içi MMP miktarının ölçüm değerleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması.	121

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

>	Büyük
°C	Santigrat derece
A	Alfa
B	Beta

Kısaltmalar

ABTS	2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)
ACOX2	Asetil-CoA oksidaz 2
AdoCbl	Adenosilkobalamin
AKT	Protein kinaz B
Alfa-PAL/NRF-1	Alfa palindromik bağlayıcı protein/ nükleer solunum faktörü 1
AMBRA1	Autophagy and beclin 1 regulator 1
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
APE/REF1	Apürinik/apirimidinik endonükleaz 1/redoks faktör 1
APS	Amonyum persülfat
ARE	Antioxidant response element
ATG	Autophagy-related gene
ATM	Ataksi telenjektazi kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
BCL2	B cell lymphoma
BCLXL	B cell lymphoma extra large
B-Raf	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
b-TrCP	b-transducing repeat-containing protein
BVRD1 / 2	Biliverdin A ve B
bZIP	Bazik bölge-lösün fermuar
Ca ⁺²	Kalsiyum
CAT	Katalaz

Cbl	Kobalaminin
CBP	AMP response element-binding protein (CREB)-binding
protein RAC 3	Receptor-associated coactivator 3
CHD6	A chromo-ATPase/helicase DNA-binding protein
CHIP	HSC70-interacting protein
CNC	Cap 'n' collar
CUL3-RBX1	Cullin 3-Ring box 1
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DFCP1	Zinc- finger FYVE domain- containing protein 1
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPP3	Dipeptidyl-peptidase 3
DRAM	DNA damage regulated autophagy modulator
ER	Endoplazmik retikulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ESCRT	Endosomal-sorting complexes required for transport
ETS	Elektron taşıma zinciri
FADH ₂	Flavin adenin dinükleotit
FKÜ	Fenilketonüri
FOXO	Forkhead box
FTH1 / FLH1	Ferritinin hafif ve ağır zincirleri
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GABARAP	The GABA type A receptor- associated protein
GCL	Glutamat sistein ligaz
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSK-3 β	Glycogen synthase kinase-3 β
GST	Glutatyon-S-transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HMGB1	High mobility group box 1
HMOX1	Heme oksijenaz 1
HOP	HSP70–HSP90 organizing protein

HOPS	The class C Vps/homotypic fusion and vacuolar protein sorting
HRD1	HMG-CoA reductase degradation 1
Hsp40/90	Heat shock protein 40/90
IDH1	İzositrat dehidrojenaz 1
IKK β	I κ B kinase β
İVA	İzovalerik Asidemi
İV-CoA	Isovaleryl-CoA
JNK	c-Jun NH2-terminal protein kinase
kDa	Kilodalton
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KMH	Kalıtsal metabolik hastalık
Kras	KRAS proto-oncogene, GTPase
LAMP2A	Lysosome-associated membrane protein type 2A
LC3	The microtubule-associated protein 1 light chain 3
LIPH	Lipaz H
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDA	Malondialdehit
ME1	Malik enzim 1
miRNA	mikroRNA
MİT	Mitokondriyal hastalık
MMA	Metilmalonik asidemi
MM-CoA	Metilmalonil-CoA
MMP	Mitokondri membran potansiyeli
MPS IVA	Mukopolisakkaridoz tip IVA
mRNA	Messenger RNA
MSUD	Akçaağaç şurubu idrar hastalığı
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mTORC 1/2	Mammalian target of rapamycin complex 1/2
MUT	Methylmalonyl-CoA mutase
Myc	MYC proto-oncogene, BHLH transcription factor
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NAGS	N-acetylglutamate synthase
nDNA	Nükleer DNA

Neh	Nrf2-ECH homology
NF- κ B	Nükleer faktör-kappa B
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali
NOX	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NQO1	NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2
O ₂ [•]	Süperoksit
OH [•]	Hidroksil
OSİ	Oksidatif stres indeksi
OXPHOS	Oksidatif fosforilasyon
p53	Transformation-related protein 53
p62/SQSTM1	Sequestosome 1
PA	Propiyonik asidemi
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PBMC	Periferel kan mononükleer hücre
PCCA/B	Propionyl-CoA carboxylase subunit alpha/beta
P-CoA	Propiyonil-koenzim A
PE	Fosfatidiletanolamin
PERK	Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PGAM5	Phosphoglycerate mutase
PGC1 α	Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatörü 1alfa
PGD	6-fosfoglukonat dehidrogenaz
PI3KC3	Class III phosphatidylinositol- 3-phosphate kinase
PIK3C3/Vps34	Vacuolar protein sorting 34
PKC	Protein kinase C
PLA2G7	Fosfolipaz A2
PML-NB	Promyelocytic leukemia-nuclear body
ProT α	Prothymosin α
PRX	Peroksiredoksin
PTEN	Fosfat ve tensin homologu
PUFA	Çoklu doymamış yağ asiti

RAD51	DNA onarım proteini RAD51 homolog 1
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
RBS	Reaktif brom türleri
RCS	Reaktif klor türleri
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	Ribo nükleik asit
RNF4	RING finger protein 4
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PZR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RXR α	RetinoidX receptor α
SCF	S-phase kinase-associated protein 1
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SIRT s	Sirtuinler
sMaf	Small musculoaponeurotic fibrosarcoma
SNAP29	Synaptosome associated protein 29
SNARE s	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors
SOD	Süperoksit dismutaz
STX17	Syntaxin 17
SUMO-1/2	Small ubiquitin-like modifier 1/2
TALDO1	Transaldolaz
TAS	Total antioksidan seviye
TBCK	TBC1 domain containing kinase
TCA	Trikarboksilik asit
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFAM	Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A
TFEB	Transcription factor EB
TIGAR	TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase
TOS	Total oksidan seviye
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex1/2
Tti1/Tel2	Tel2 interacting protein 1/telomere maintenance 2
TXN, TrxR	Tiyoredoksin redüktaz

TXN1	Tiyoredoksin 1
UGT	UDP-glukuronosil transferaz
ULK1/2	Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz
UV	Ultraviyole
UVRAG	UV radiation resistance associated
Vps15/PIK3R4	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4
WIP1s	WD repeat domain phosphoinositide- interacting proteins
WTX	Wilms tumor gene on X chromosome
XRE	Xenobiotic response element
β -TrCP	β -transducin repeat-containing protein

1. GİRİŞ

Kalıtsal metabolik hastalıklar (KMH'lar); çocukluk dönemi genetik hastalıkların önemli bir bölümünü oluşturmaktadır [1, 2]. KMH'ların çoğu, Mendel kalıtım kurallarına uyan monogenik bozukluklar olmakla birlikte, Mendel kalıtım kurallarına uymayan mitokondriyal DNA'daki (mtDNA) mutasyonlar da KMH'larda görülebilmektedir [3].

KMH'lar; metabolik yollarda yer alan enzim, enzim kofaktörü, taşıyıcı eksikliği ya da bozukluğu sebebiyle, substratın/toksik ara metabolitlerin birikmesine ve/veya son ürünün eksikliğine neden olan bir patofizyolojiye sahiptir. Patofizyolojik açıdan KMH'ların sınıflandırılması ile, intoksikasyon tipi (intoksikasyona neden olan bozukluklar), enerji eksikliği tipi (enerji metabolizmasını ilgilendiren bozukluklar) ve depolama tipi (kompleks molekülleri ilgilendiren bozukluklar) olmak üzere üç ana grup belirlenmiştir. İntoksikasyona neden olan bozukluklar, metabolik blok önünde biriken toksik metabolitler sonucu ortaya çıkmaktadır. Enerji metabolizmasını ilgilendiren bozukluklar; çeşitli dokularda enerjinin üretilmemesi ya da üretilen enerjinin kullanılmaması ile karakterizedir. Karmaşık moleküllerin sentezini veya yıkımını bozan hücreyel organellerin hastalıkları, kompleks molekülleri ilgilendiren bozukluklar olarak tanımlanmaktadır [4-6].

Toksik metabolitlerin birimi ile karakterize olan KMH'ların, temelde ortak bir patomekanizmayı paylaştıkları düşünülmektedir. i) Hücrelerde öncelikle toksik metabolitlerin birikimi ile oksidatif stres artar ve aşırı artan oksidatif stres ile başa çıkamayan antioksidan savunma sistemi sonucu mitokondriyal disfonksiyon görülür. ii.) Hastalık patofizyolojisinde ikincil olarak izlenen mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyal enzimlerin ve süreçlerin inhibisyonuna neden olarak, bozulmuş enerji metabolizmasına ve hücrede ROS seviyesinin daha da artmasına neden olur. iii) Son olarak, artan ROS seviyesi DNA, protein ve lipitlerde oksidatif hasara neden olarak, hücreyi ölüm yollarına yönlendirir. Her ne kadar KMH'larda oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon ilişkisi üzerinden ortak bir patomekanizma önerilmeye çalışılsa da, KMH'larda anormal ROS üretiminin kesin mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir ve KMH'larda redoks sinyal yolları ile ilgili yapılan araştırmalar başlangıç aşamasındadır [7-10].

Hücrelerde en az oksidatif stres kadar azaltıcı stres de, hücre büyüme tepkilerini azaltması, proteinlerde disülfür bağlarının oluşumunda değişikliklere yol açması, mitokondriyal fonksiyonu ve hücre metabolizmayı azaltması ile hücre homeostazının bozulması için tehlike oluşturmaktadır. Ancak azaltıcı stres ile ilgili yapılan çalışma sayısı oksidatif stres çalışmalarına oranla oldukça kısıtlıdır ve literatürde ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir [11-16].

Hücrel redoks homeostazının ana düzenleyicisi olan Nrf2 (nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2), antioksidan savunmasında yer alan proteinlerin ekspresyonunun indüklemesinde kilit rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2 redoks regülasyonunun yanı sıra; ksenobiyotik metabolizması, protein homeostazı, ubikuitin sistemi ve otofaji, DNA onarımı, karbonhidrat ve lipit metabolizması, NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) üretimi, demir homeostazı, transkripsiyonel regülasyon ve mitokondriyal fonksiyon dahil, çok sayıda hücrel süreçte yer alan 250'den fazla genin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar [17, 18].

Nrf2'nin hücre içerisindeki regülasyonu esas olarak, Nrf2 protein seviyelerinin ubikitinasyon ve proteozomal degradasyon yoluyla kanonik yol ile gerçekleşmektedir. Nrf2 ayrıca; transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, post-translasyonel seviyelerde ve diğer sinyal yolları, epigenetik faktörler ve bağlayıcı partnerlerin mevcudiyeti aracılığıyla nonkanonik yol ile de düzenlenir. p62/SQSTM1 (sequestosome 1) proteini aracılığıyla Nrf2 aktivasyonu, nonkanonik yolun en çok çalışılan mekanizmasıdır. Çok domainli ve çok fonksiyonlu bir protein olan p62, otofaji yolağı ve Nrf2 aktivasyonu ile hücreleri stresten korur [18-21].

Otofaji, makromolekül kompleksleri, proteinleri ve tüm organelleri içeren hücrel bileşenlerin lizozomal degradasyonunda rol oynayan, evrimsel olarak korunmuş, katabolik moleküler bir süreçtir. Makrootofaji, şaperon-aracılı otofaji ve mikrootofaji olmak üzere üç genel tipi bulunur [22, 23].

ROS ve otofaji regülasyonu arasında karşılıklı bir ilişki bulunmaktadır. ROS'un otofaji regülasyonu, oldukça karmaşık moleküler sinyal yolları ile nükleusta transkripsiyonel, sitoplazmada posttranskripsiyonel olarak kontrol edilmektedir. Otofajinin ROS

regülasyonunun temelinde ise hasarlı proteinlerin ve organellerin ortadan kaldırılmasında rol oynayan p62 yolağı ve şaperon aracılı otofaji yer almaktadır [24-27].

Otofaji ve KMH'lar arasındaki ilişki, başta KMH'ların bir grubu olan lizozomal depo hastalıkları başta olmak üzere son yıllarda artan bir ivme ile çalışılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda özellikle bozulan otofaji yolağı üzerinde durulmakla birlikte, KMH'ların bir grubu olan konjenital otofaji bozuklukları, KMH ve otofaji ilişkisinin önemini vurgulamaktadır [28, 29]. Ancak literatürde ROS, mitokondriyal disfonksiyon, Nrf2 yolağı aracılığıyla antioksidan cevap ve otofaji ilişkisini KMH'larda eş zamanlı ve birarada inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında; KMH'lar ile oksidatif stres, antioksidan cevap, mitokondriyal disfonksiyon ve otofaji yolağı arasındaki ilişkinin, Nrf2/Keap1/p62 yolağı aracılığıyla araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda TAS (Total Antioksidan Seviye)/TOS (Total Oksidan Seviye) analizleri; hücre içi ATP, ROS ve mitokondri membran potansiyelinin (MMP) ölçümü ve hücre görüntülemesi; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ve Western Blot analizleri olmak üzere KMH hastaları ve sağlıklı bireylerden elde edilen periferik kan örnekleri kullanılarak 6 farklı deney planı gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması ile KMH'larda oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve otofaji ilişkisinin, kalıtsal metabolik hastalık patofizyolojisindeki rolünün bütüncül bir yaklaşım ve farklı yolların birarada değerlendirilmesi ile aydınlatılması hedeflenmiştir

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar

Kalıtsal metabolik hastalıklar (KMH'lar); metabolik yollarda yer alan enzim, enzim kofaktörü, taşıyıcı eksikliği ya da bozukluğu sebebiyle, substratın/toksik ara metabolitlerin birikmesine ve/veya son ürünün eksikliğine neden olan tek gen bozukluklarıdır. Fenotipik ve genetik olarak heterojen bir hastalık grubu olan KMH'ların ilk tanımı, 1908 yılında Sir Archibald Garrod tarafından yapılmıştır [4, 30-32]. Bugün tanımlanmış olan toplam 750'den fazla KMH bulunmaktadır [33]. KMH'lar tek tek ele alındığında nadir olsalar da, toplu olarak değerlendirildiklerinde çocukluk döneminde

görülen genetik hastalıkların önemli bir bölümünü oluşturmakta ve çocuk çağında morbidite ve mortalitenin önemli nedenleri arasında bulunmaktadır [1, 2].

2.1.1. Epidemiyoloji

KMH'lar yenidoğan ve çocukluk çağında daha sık görülmekle birlikte her yaş grubunda ortaya çıkabilmektedir [34]. KMH'ı bulunan yenidoğanlar, genellikle doğumda sağlıklıdır, ancak KMH'ın tipik semptomları, doğumdan sonra saatler/günler içerisinde gelişmektedir [1]. KMH'lar toplu olarak değerlendirildiklerinde insidansları, canlı doğum başına 1:800-2500'tür [32]. KMH'lar tüm etnik gruplarda görülmekle birlikte, KMH'ların insidansı ve prevalansı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Akraba evliliği oranının yüksek olduğu toplumlarda KMH görülme sıklığı artmaktadır. KMH'ların insidansları; Almanya'da 1:2920, Birleşik Krallık'ta 1:784, Hong Kong'da 1:4122, İtalya'da 1:3707, Kanada'da 1:2500, Katar'da 1:966, Suudi Arabistan'da 1:667'dir [4, 30, 35].

Başta nadir hastalıklar olmak üzere belirli hastalıklardan etkilenen asemptomatik bebeklerin erken teşhisi ve tanısının gerçekleştirilmesi, ileride gelişebilecek komplikasyonların ve sekellerin önlenmesi ve hastaların yaşam kalitesinin yükseltilmesi amacı ile birçok ülkede yenidoğan taraması, standart uygulama olarak gerçekleştirilmektedir [36-38]. Yenidoğan tarama verilerine göre propiyonik asidemi (PA) insidansı; Amerika Birleşik Devletleri'nde 1: 242741, Güneybatı Almanya'da 1: 284450, Kuveyt'de 1:59426'dır. Metilmalonik asidemi (MMA) insidansı ise; Amerika Birleşik Devletleri'nde 1:69354, Güneybatı Almanya'da 1:568901, Kuveyt'de 1:19809'dur [36]. İzovalerik insidansı; Almanya'da 1:96000, Japonya'da 1:672000, Tayvan'da 1:696000'dir [39]. MPS IVA'nın insidansı 1/76000-1428000'dir [40]. Ülkemizde yenidoğan tarama programı kapsamında fenilketonüri (FKÜ), konjenital hipotroidi, biyotinidaz eksikliği ve kistik fibrozis hastalıkları bulunmaktadır [41]. Fenilketonürinin görülme sıklığı dünya genelinde büyük farklılıklar göstermekle birlikte, Türkiye 1:4000 oranı ile bu hastalık için en yüksek görülme sıklığına sahiptir. Bu durum popülasyon içindeki yüksek akrabalık oranı ile açıklanmaktadır [42-46].

2.1.2. Kalıtım

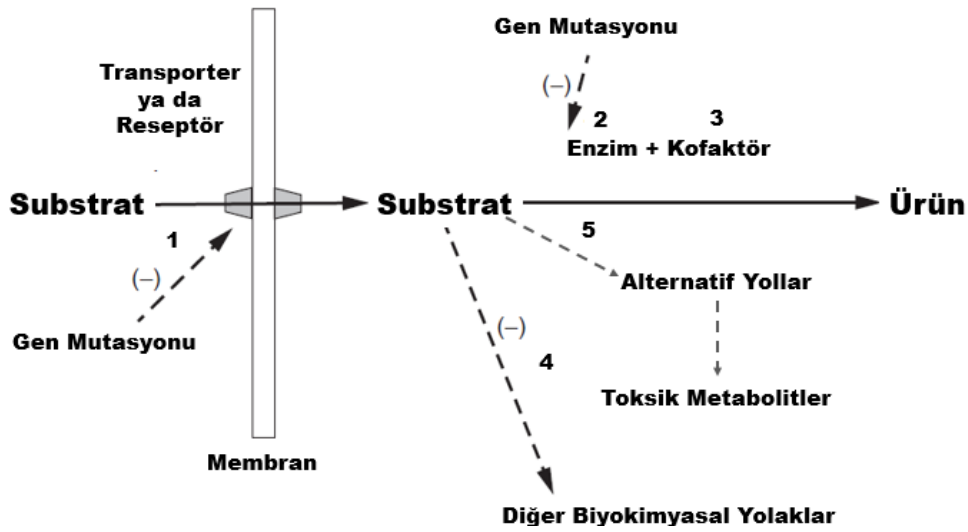
KMH'ların çoğu, Mendelyen kalıtım gösteren monogenik hastalıklardır. Otozomal resesif kalıtım, KMH'larda en sık görülen kalıtım şeklidir. Ancak otozomal dominant ve X'e bağlı kalıtımın görüldüğü metabolik hastalıklar da tanımlanmıştır [3, 47].

Otozomal resesif geçiş gösteren mutasyonlar, nadiren *de novo* olarak oluşabilmektedir. Akraba evlilikleri, otozomal resesif kalıtılan hastalıkların görülme sıklığını arttırmaktadır. KMH'larda otozomal resesif hastalıklara örnek olarak fenilketonüri, organik asidüriler, Zellweger sendromu, Gaucher hastalığı verilebilir. X'e bağlı resesif kalıtımda, mutasyona uğramış genin X kromozomu üzerindeki bir kopyası, hastalığa neden olmak için yeterlidir. *De novo* mutasyonların hastalık oluşumuna katkısının daha düşük oranla gerçekleştiği otozomal resesif bozuklukların aksine, X'e bağlı resesif hastalıkları olan erkeklerin yaklaşık üçte birinde, *de novo* mutasyonlar tanımlanmaktadır. Ornitin karbamilaz eksikliği, Fabry hastalığı, piruvat dehidrojenaz eksikliği X'e bağlı resesif metabolik hastalıklara örnek olarak verilebilir. Otozomal dominant kalıtım gösteren hastalıklarda *de novo* mutasyonların görülme sıklığı diğer kalıtım tiplerine göre çok daha yüksektir. Ancak otozomal dominant kalıtımın, KMH'larda çok daha az görülen bir kalıtım şekli olduğu bilinmektedir. Marfan sendromu, ailesel hiperkolesterolemi otozomal dominant metabolik hastalıklardır [3, 47-49]. X'e bağlı dominant kalıtım KMH'larda nadir görülmekte ve genellikle *de novo* mutasyonlarla karakterizedir. Her iki cinsiyet bu kalıttan etkilenmekle birlikte, heterozigot dişilerde klinik semptomlar erkeklere göre daha hafiftir. Erkek fetüste X kromozomundaki mutasyonun varlığı letal olabilir. X'e bağlı dominant hastalıklara örnek olarak konjenital glikozilasyon bozukluğu Tip I verilebilir [3, 50].

Mendel kalıtım kurallarına uymayan mitokondriyal DNA'daki (mtDNA) mutasyonlar, KMH'larda gözlenen diğer bir kalıtım biçimidir. mtDNA maternal kalıtıldığı için, mitokondri ilişkili KMH'lar cinsiyetten bağımsız olarak gözlenmektedir. mtDNA'nın *de novo* mutasyonlara eğilimli olmasından dolayı bu KMH'lar sporadik olarak görülmektedir. Klinik semptomların ve penetrasyonun şiddeti, mutasyona uğramış mtDNA içeren doku tipine bağlı olarak değişmektedir. KMH'larda mitokondriyal kalıtıma örnek olarak Leigh's sendromu, Kearns-Sayre Sendromu verilebilir [3, 47, 49].

2.1.3. Patofizyoloji

KMH'lardaki nokta mutasyonları, delesyonlar, insersiyonlar ve kromozomal yeniden düzenlenme genetik bozuklukları; mutant enzimlerin ve taşıyıcıların fonksiyon kaybı ya da kazancı ile sonuçlanmaktadır. KMH'larda genetik bir bozukluktan kaynaklanan ilgili biyokimyasal yolun bloke edilmesi, substratın birikmesine neden olmaktadır. Biriken substrat doğrudan toksik etki gösterebilmekte ya da metabolik akışın ikincil yollara sapmasıyla ürün eksikliğinin yanı sıra dolaylı olarak toksik etki gözlenebilmektedir [4].



Şekil 2.1. KMH'larda genel patofizyoloji. 1. Transporter ya da reseptör defekti. 2. Enzim defekti. 3. Kofaktör eksikliği. 4. Substrat tarafından diğer biyokimyasal yolağın inhibisyonu. 5. Biriken substratın alternatif yollar ile toksik metabolitlere dönüşümü [4, 6].

2.1.4. Sınıflandırma

Biriken substrat, etkilenen enzim grubu ve hatalı metabolik yol veya hücrede bozuk işleme neden olan organelle dayanarak, KMH'lar için farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Patofizyolojik bakış açısıyla metabolik bozukluklar, intoksikasyon tipi (intoksikasyona neden olan bozukluklar), enerji eksikliği tipi (enerji metabolizmasını ilgilendiren bozukluklar) ve depolama tipi (kompleks molekülleri ilgilendiren bozukluklar) olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır [4, 5, 34].

Çizelge 2.1. KMH'ların klinik sınıflandırması [1, 4, 5, 34].

Tip	Tanım	Örnekler
İntoksikasyon tipi (intoksikasyona neden olan bozukluklar)	Toksik metabolitlerin birikimi	Amino asit metabolizması bozuklukları (ör; fenilketonuri, metil malonik asidemi, propiyonik asidemi, izovalerik asidemi, tirozinemi, akçaağaç şurubu idrar hastalığı, homosistinüri) Üre siklus defektleri Karbonhidrat metabolizması bozuklukları (ör; galaktozemi, herediter fruktoz intoleransı) Metal taşıma bozuklukları (ör; Wilson, Menkes, hemokromatozis)
Enerji eksikliği tipi (enerji metabolizmasını ilgilendiren bozukluklar)	ATP (adenosine triphosphate), kreatinin gibi enerji moleküllerinin sentez bozukluğu	Piruvat metabolizması bozuklukları (ör; piruvat dehidrogenaz kompleks eksikliği, piruvat karboksilaz eksikliği) Krebs döngüsü bozuklukları H transport bozuklukları (ör; glutarik asitüri tip II) Solunum zinciri fonksiyon bozuklukları Yağ asidi metabolizması bozuklukları (ör; yağ asidi oksidasyonu)

Kompleks moleküllerin sentezi ya da katabolizmasındaki bozukluk sonucu gelişen metabolik hastalıklar	Kompleks moleküllerin depolanması	Lizozomal hastalıklar (ör; mukopolisakkaridozlar, Gaucher hastalığı) Peroksizomal hastalıklar (ör; Zellweger hastalığı) Golgi-endoplazmik retikulum (ER) hastalıkları
--	-----------------------------------	---

2.1.4.1. İntoksikasyona Neden Olan Bozukluklar

İntoksikasyona neden olan bozukluklar, metabolik blok önünde biriken toksik metabolitler sonucu ortaya çıkan semptom ve bulgularla karakterizedirler. Klinik olarak benzerlik göstermektedirler. Embriyonal gelişime etki etmezlerken, doğumla birlikte kısa süren bir iyilik dönemi (semptomsuz dönem) sonrası, akut (kusma, koma, karaciğer yetmezliği, tromboembolik komplikasyonlar, vb.) veya kronik (gelişme geriliği, büyüme geriliği gelişimsel gecikme, ektopia lentis, kardiyomiyopati vb.) olabilen intoksikasyonun klinik belirtilerini gösterirler. Akut metabolik atakları tetikleyebilecek durumlar arasında katabolizma, ateş, eş zamanlı hastalık ve beslenme bulunmaktadır. Klinik ifadeleri genellikle, hem hastalıkların en başında hem de hastalık sırasında aralıklarla geç izlenmektedir. İdrar ve kan örnekleri kullanılarak yapılan amino asit kromatografisi ve idrarda organik asit incelemesi ile kolay tanı koyulabilmektedir. İntoksikasyona neden olan metabolik hastalıkların erken tanısı, özel diyetler, ekstrakorporeal prosedürler veya temizleyici ilaçlarla (karnitin, sodyum benzoat, penisillamin, vb.) toksinin acil olarak uzaklaştırılmasını sağlayan tedavi seçenekleri olduğundan, çok önemlidir. Hastaların çoğunda eğer tedaviye yeterince erken başlanırsa, sekeller en aza indirilerek, hatta tamamen ortadan kaldırılarak normal gelişim sağlanabilmektedir [5, 51].

2.1.4.2. Enerji Metabolizmasını İlgilendiren Bozukluklar

Enerji metabolizmasını ilgilendiren bozukluklar; karaciğer, miyokard, beyin veya diğer dokularda enerjinin üretilmemesi ya da üretilen enerjinin kullanılamaması nedeniyle ortaya çıkan hastalıklardır. Mitokondriyal ve sitoplazmik enerji bozuklukları olmak üzere iki alt grupta incelenebilirler. Mitokondriyal bozukluklar, en şiddetli olanlarıdır ve genellikle tedavileri zordur. Konjenital laktik asidemiler (piruvat taşıyıcısı bozuklukları,

piruvat karboksilaz, piruvat dehidrogenaz ve Krebs döngüsü enzimlerinin defekti), mitokondriyal solunum zinciri bozuklukları (solunum zinciri komponentleri, mitokondriyal taşıyıcılar veya Q10 sentezinin bozukluğu) ve yağ asidi oksidasyonu, keton metabolizması bozuklukları bu hastalık grubu içindedir. Sitoplazmik enerji bozuklukları, genellikle daha az şiddetlidir. Bu gruptaki hastalıklar arasında; glikoliz, glikojen metabolizması ve glukoneogenez bozuklukları, hiperinsulinizm (tümü tedavi edilebilir), kreatin metabolizması bozuklukları (bazıları tedavi edilebilir) ve pentoz fosfat yolağının doğuştan gelen hataları (tedavi edilemez) sayılabilir.

Enerji metabolizmasını ilgilendiren hastalıkların başlıca semptom ve bulguları; büyüme geriliği, hipoglisemi, hiperlaktik asidemi, ağır jeneralize hipotoni, miyopati, kardiyomiyopati, kalp yetmezliği, aritmiler, iletim bozuklukları, dolaşım kollapsı, ani bebek ölümü, dismorfî ve malformasyonlardır. Tanıları daha zordur ve tanı yöntemleri fonksiyon testlerine, biyopsi gerektiren enzimatik analizlere veya hücre kültürü ve moleküler analizlere dayanmaktadır.

Bu grubu intoksikasyona neden olan bozukluklardan ayıran en önemli fark, intoksikasyona neden olan bozukluklarda genelde toksik metabolitlerin birikimi için belirli bir süre geçmesi gerekmesi ve doğum sonrası sağlıklı görünen bebeğin ilerleyen dönemde metabolik hastalık semptomlarını göstermesidir. Enerji metabolizmasını ilgilendiren bozukluklarda ise latent dönem bulunmamakta, bebekler doğumdan hemen sonra semptomatik hale gelebilmektedirler [5, 6, 52].

2.1.4.3. Karmaşık Molekülleri İçeren Bozukluklar

Karmaşık moleküllerin sentezinde veya katabolizmasında görev alan hücresel organellerdeki bozukluklar sonucu ortaya çıkan hastalıklardır. Semptomları kalıcı, ilerleyici, araya giren olaylardan etkilenmeyen ve diyetle ilgisi olmayan özelliktedir. Tüm lizozomal depo hastalıkları, peroksizomal hastalıklar, alfa-1-antitripsin ve konjenital glikozilasyon bozuklukları gibi hücre içi trafiği ve işleme bozuklukları, kolesterol biyosentez bozuklukları bu gruba aittir. Enzim replasman tedavisi birkaç lizozomal bozuklukta uygulanmasına rağmen, bu hastalıkların neredeyse hiçbiri akut olarak tedavi edilememektedir [5, 6].

Çizelge 2.2. Serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türler [58].

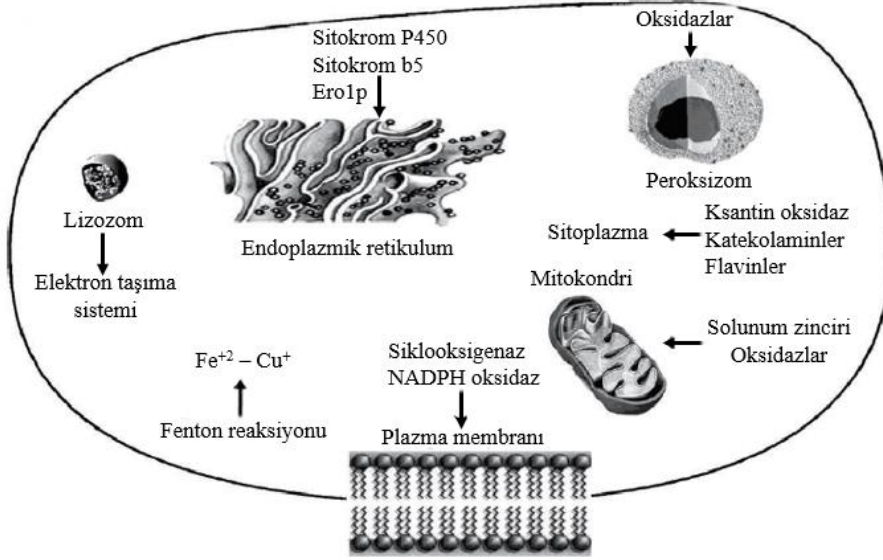
Serbest radikaller	Radikal olmayan reaktif türler
Reaktif oksijen türleri (ROS)	Reaktif oksijen türleri (ROS)
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, OH^{\cdot}	Hipobromöz asit, $HOBr$
Hidroperoksil, HO_2^{\cdot}	Hipokloröz asit, $HOCl$
Karbonat, $CO_3^{\cdot-}$	Singlet oksijen, $O_2^1 \Delta g$
Peroksil, RO_2^{\cdot}	Organik peroksitler, $ROOH$
Alkoksil, RO^{\cdot}	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Karbon dioksit, $CO_2^{\cdot-}$	Peroksinitrat, O_2NOO^-
Singlet oksijen, $O_2^1 \Sigma g^+$	Peroksinitrik asit, O_2NOOH
	Nitrosoperoksikarbonat, $ONOOCO_2^-$
Reaktif klor türleri (RCS)	Peroksomonokarbonat, $HOOCO_2^-$
Atomik klor, Cl^{\cdot}	
	Reaktif klor türleri (RCS)
Reaktif brom türleri (RBS)	Hipoklorik asit, $HOCl$
Atomik brom, Br^{\cdot}	Nitril klorür, NO_2Cl
	Nitrosil klorür, $NOCl$
Reaktif azot türleri (RNS)	Kloraminler
Nitrik oksit, NO^{\cdot}	Klor gazı, Cl_2
Azot dioksit, NO_2^{\cdot}	Brom klorür, $BrCl$
Nitrat radikali, NO_3^{\cdot}	Klor dioksit, ClO_2
	Reaktif brom türleri (RBS)
	Hipobromöz asit, $HOBr$
	Brom gazı, Br_2

	Brom klorür, BrCl
	Reaktif azot türleri (RNS)
	Nitröz Asit, HNO ₂
	Nitrozil katyonu, NO ⁺
	Nitroksil anyonu, NO ⁻
	Dinitrojen tetroksit, N ₂ O ₄
	Dinitrojen trioksit, N ₂ O ₃
	Peroksinitrit, ONOO ⁻
	Peroksinitrat, O ₂ NOO ⁻
	Peroksinitröz asit, ONOOH
	Peroksinitrik asit, O ₂ NOOH
	Nitronyum (nitril) katyonu, NO ₂ ⁺
	Alkil peroksinitritler, ROONO
	Alkil peroksinitratlar, RO ₂ ONO
	Nitril klorür, NO ₂ Cl
	Peroksiasetil nitrat, CH ₃ C(O)OONO ₂

Canlı sistemlerde üretilen radikallerin en önemli sınıfı, benzersiz bir elektronik konfigürasyona sahip ve bir radikal olan diatomik oksijenden üretilen ve yapılarında oksijen içeren reaktif türler olarak tanımlanan reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. Tüm oksijen radikalleri ROS'tur, ancak tüm ROS'lar oksijen radikalleri değildir. Çünkü ROS hem serbest radikalleri hem de diğer radikal olmayan reaktif türleri ifade eden bir terim olarak kullanılmaktadır [59-61].

ROS üretimi temel olarak, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla eksojen ve endojen kaynaklı olarak gerçekleşmektedir. Endojen aktiviteler, canlı organizmalardaki ROS'ların ana kaynağını oluştururlar. ROS'un, canlı hücrelerde enerji homeostazının sağlandığı reaksiyon olan oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü olması sebebiyle

mitokondri, memeli hücrelerinde ROS'un birincil endojen kaynağıdır. Özellikle ETS kompleksleri I ve III, ROS üretimine dahil olan temel mitokondriyal bölgelerdir. Membran-bağılı enzimlerin NOX (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) ailesi, ROS'un bir diğer ana endojen kaynağıdır. Diğer hücresel komponentler olan plazma ve nükleer membranlar, ER, lizozom, peroksizom ve sitoplazmada da ROS üretimi görülmektedir.



Şekil 2.3. ROS üretiminin hücresel kaynakları [62].

ROS'un eksojen kaynakları ise; sigara, alkol, kimyasallar, ilaçlar, ağır metaller, ksenobiyotikler, kemoterapi, radyasyon, UV, besin yetersizliği, egzersiz gibi bazı uyarıcı faktörler tarafından üretilmektedir [56, 62-67].

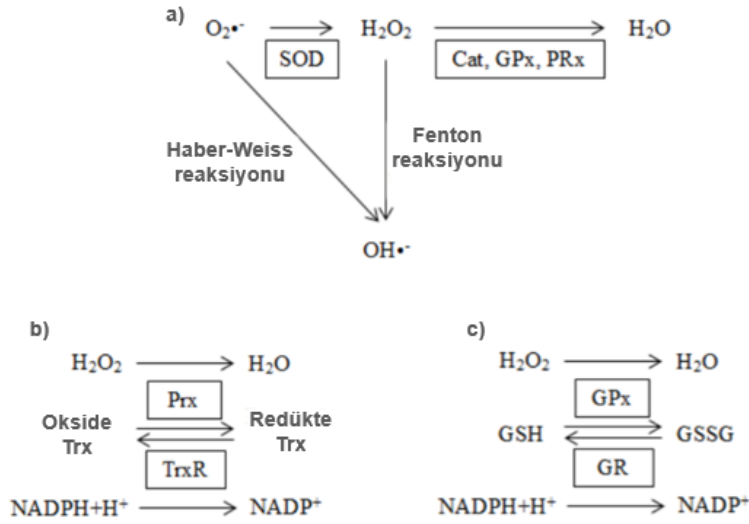
2.2.1.1. ROS Dengesi ve Antioksidan Savunma Sistemi

Oksidanların üretim hızı ve miktarı ile zaman içinde ortadan kaldırılmaları arasındaki denge, redoks homeostazının temelini oluşturur. Redoks homeostazı, aerobik organizmalar için vazgeçilmez bir gerekliliktir. Bu sebeple hücreler, ROS seviyelerini korumak için güçlü ve sinerjistik olarak çalışan antioksidan savunma sistemlerini kullanırlar. Bu antioksidan savunma sistemleri, bir dizi antioksidan enzim ve proteinden oluşmaktadır. Antioksidanlar, hem mRNA ekspresyonu hem de protein enzimatik aktivite seviyesinde düzenlenerek, hücre içi ROS'un kantitatif, zamansal ve uzamsal olarak etkili bir şekilde yönetilmesini sağlamaktadırlar [68-70].

Antioksidan savunma mekanizması, hücrese ROS seviyesini korumak için bütünleşik bir şekilde hareket etmektedir.

- Serbest radikallerin ilk üretiminin bloke edilmesi,
- Oksidanların temizlenmesi,
- Oksidanların daha az toksik olan bileşiklere dönüştürülmesi,
- Toksik metabolitlerin veya inflamatuvar mediatörlerin ikincil üretiminin bloke edilmesi,
- İkincil oksidanların zincir reaksiyonlarının sonlandırılması,
- Oksidanların neden olduğu moleküler hasarın onarımının sağlanması [69, 71].

Antioksidanlar; kökenlerine, yapılarına, faaliyet gösterdikleri yerlere, aktivitelerine, çözünürlüklerine ve kinetik özelliklerine bağlı olarak farklı şekilde sınıflandırılırlar. Doğal olarak bulunan antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklıdır. Vücut metabolizması tarafından üretilen endojen antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılmaktadırlar. Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR), tiyoredoksin redüktaz (TXN, TrxR), peroksiredoksin (PRX) bulunmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidanlar metabolik antioksidanlar ve besin antioksidanları olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Vücut metabolizması tarafından üretilen metabolik antioksidanlar arasında glutatyon (GSH), NADPH, tiyoredoksin, L-arjinin, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal şelatlayıcı proteinler, transferrin bulunmaktadır. Besin antioksidanları, vücut metabolizması tarafından üretilemeyip eksojen olarak alınırlar. C ve E vitaminleri, karotenoidler, polifenoller, flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri, metaller (selenyum, manganez, çinko) besin antioksidanlarıdır [60, 69, 71-77].



Şekil 2.4. a) Enzimatik antioksidanlar. b) Glutasyon sisteminin mekanizması. c) Tiyoredoksin sisteminin mekanizması [76].

Hücrel ROS homeostazının karmaşık kontrolüne, antioksidanların yanında doğrudan veya dolaylı olarak birçok enzim ve transkripsiyon faktörü aracılık etmektedir. Mitojen-aktif edici protein kinaz (MAPK), protein kinaz B (AKT), apürinik/apirimidinik endonükleaz 1/redoks faktör 1 (APE/REF1), ataksi telenjektazi kinaz (ATM), rapamisininin memeli hedefi (mTOR), fosfat ve tensin homologu (PTEN), sirtuinler (SIRTs) gibi kinaz ve fosfatazlar; forkhead box (FOXO) proteinleri, nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), tümör baskılayıcı p53, hipoksi indüklenebilir faktörler (HIFs), nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (Nrf2) gibi transkripsiyon faktörleri, pro-oksidan ve antioksidan genlerin ekspresyonlarını düzenleyerek antioksidan savunma sisteminde önemli rol oynamaktadırlar [60, 62, 64, 78, 79].

2.2.1.2. ROS'un Fizyolojik Rolü

ROS, biyolojik sistemde bol miktarda bulunan iki ucu keskin bir kılıçtır. Canlı sistemlerde planlı ya da tesadüfi olarak üretilen ROS'un seviyesi, nihai hücrel cevabın belirlenmesinde kritik bir parametredir. ROS hücrelerde düşük veya orta seviyelerde tutulduğunda; organizma için yararlı olan pek çok hücrel yolda görev alarak, hücrenin yapısal ve işlevsel bütünlüğünü sağlamaktadır [66, 69].

Çizelge 2.3. ROS'un temel fizyolojik rolleri [63, 69, 80-82].

Fizyolojik Süreç	ROS' un Roller
Gen ekspresyonu	NF- κ B, HIF- α , Nrf2 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin kontrolü. Kromatin dinamiğinin modülasyonu.
Apoptoz	Apoptoz indüksiyonu ya da inhibisyonu.
Hücre içi sinyal	Hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ya da inhibisyonu.
Hücre-hücre etkileşimleri	Hücrel etkileşim ve çapraz konuşmaya aracılık etme. Hücre adhezyon ve migrasyonunun düzenlenmesi.
Patojenlere karşı intrinsik hücrel savunma sistemi	Fagositlerin (nötrofiller, makrofajlar, monositler), vücudun hastalıklara karşı savunma mekanizmasının bir parçası olarak patojenleri yok etmek için ROS üretimi.
Hücre büyümesi, proliferasyon ve farklılaşma	İkincil habercilerin düzenlenmesi. İyon taşıma sisteminin mobilizasyonu.
Sinaptik plastisite	Sinaptik plastisitenin indüklenmesi ya da inhibisyonu.
Bellek oluşumu	Biliş ve hafıza oluşumunda sinyal molekülleri.
Transkripsiyon işlemi	Transkripsiyon faktörü fonksiyonunun modifikasyonu.
Otofaji	Otofaji indüksiyonu ya da inhibisyonu.
Yaşlanma	Yaşlanma sürecinin indüksiyonu ya da inhibisyonu.
Hücre döngüsü	Mitojenik cevabın regülasyonu.

Farklı stres tiplerine adaptasyon	Hipoksi veya açlık gibi hücresel stres koşullarına adaptasyon için ilgili hücresel yolların ve moleküllerin indüksiyonu ya da inhibisyonu.
Kas sistemi	Kasların kasılmasını modüle etmek için sinyaller olarak davranma.
Oksijen homeostazı	Oksijen konsantrasyonundaki değişimler için sensör görevi görme.

2.2.2. Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Disfonksiyon

Canlı organizmalarda redoks homeostazı olarak bilinen oksidan ve antioksidan reaksiyonlar arasındaki denge durumunun bozulması, biyolojik sistemde potansiyel bir hücresel hasara yol açması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Redoks homeostazının bozulması, aşağıda belirtilen nedenlerden bir veya birden fazlasının görülmesi sebebiyle gerçekleşmektedir.

- Endojen ve eksojen kaynaklı ROS üretiminde artma.
- Enzimatik olmayan antioksidan rezervlerinin tükenmesi.
- Antioksidan enzimlerin etkisizleştirilmesi.
- Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların üretiminde azalma [55, 83].

Biyolojik örneklerdeki oksidatif stresi karakterize eden klasik parametreler, artan oksidan seviyeleri, azalan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, hücresel redoks sistemindeki dengesizlik ve DNA, lipitler ve proteinler gibi hücresel bileşenlerdeki oksidatif hasardır.

DNA: Yüksek seviyelerdeki ROS; deoksiriboz oksidasyonu, zincir kopması, nükleotitlerin organik bazlarında çeşitli modifikasyonlar ile mutasyonlara ve DNA-protein çapraz bağlarına yol açarak, DNA'nın hem şeker hem de baz kısımlarında oksidatif hasarlara neden olabilir. DNA hasarı, kodlanmış proteinlerde işlev bozukluklarına ya da bu genlerden kodlanan proteinlerin tamamen inaktivasyonuna yol açan değişikliklere sebebiyet verebilir.

ROS aracılı nükleotitlerdeki şeker hasarı, çoğunlukla deoksiribozdan hidrojen ayrılması ile oluşmaktadır. DNA bazlarında gerçekleşen oksidatif hasar ise, genellikle çift bağlara OH[•] ilavesi ile mevcut bazlardan yeni ürünlerin meydana getirilmesiyle gerçekleşmektedir. Hidroksiguanin, en sık gözlenen üründür.

DNA protein çapraz bağları, OH[•]' in DNA ya da DNA ilişkili proteinlere saldırdığında oluşmaktadır. Eğer DNA onarımı gerçekleştirilmeden replikasyon ya da transkripsiyon gerçekleşirse, DNA protein çapraz bağları ölümcül olabilir. ROS, DNA onarım sistemine rağmen, onarım işlemlerini değiştirebilmesi ya da ROS miktarının onarım sisteminin kapasitesini aşması sebebiyle DNA'ya kalıcı hasar verebilmektedir.

Lipitler: Homeostatik eşğin üzerindeki ROS seviyeleri, hem hücre hem de organel membranlarında, normal hücresel fonksiyonları etkileyen membran bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olan lipit peroksidasyonunu indükleyebilir. Doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonu ürünü olan malondialdehitin (MDA) metabolizması, protein çapraz bağları oluşturarak hücre zarı hasarına ve birçok hücresel proteinin inaktivasyonuna yol açmaktadır.

Oksidatif stres; kendileri ile reaksiyona girebilen, DNA ve proteinlere zarar verebilen lipit türevli radikallerin üretimi ile daha da şiddetlenir. Fosfolipit molekülleri üzerindeki doymamış (çift) bağ ve gliserol ile yağ asidi arasındaki ester bağı, ROS kaynaklı oksidasyonun gerçekleştiği yaygın bölgeler olarak işlev görmektedirler. Bu nedenle, fosfolipit membranların çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) ROS tarafından oksidasyona çok duyarlıdır. Antioksidan ve oksidan oranındaki bir dengesizlik, birçok çoklu doymamış yağ asidinin peroksidasyonuna neden olarak döngüsel bir zincir reaksiyonuna yol açabilmektedir.

Lipit peroksidasyonu, hücre zarlarının akışkanlığını değiştirmekte, konsantrasyonun dengeli gradiyentini sürdürme kapasitesini azaltmakta, membran geçirgenliğini ve inflamasyonu arttırmaktadır. Bunların sonucunda hücrelerde; hücre içi sıvı, protein ve enzimlerin kaybı, ER'de kalsiyum taşınımının azalması, mitokondriyal fonksiyonlarda ve hücrelerdeki değişiklikler ile lipit peroksidasyonu aracılı oksidatif hasar görülebilmektedir.

Protein: Yüksek ROS seviyeleri, proteinlerin aktivitesine zarar veren doğrudan veya dolaylı modifikasyonlara neden olabilmektedir. Proteinler nitrosilasyon, karbonilasyon, disülfid bağ oluşumu ve glutatyonilasyon yoluyla doğrudan ya da yağ asiti peroksidasyonunun parçalanma ürünleri ile konjüge edilerek dolaylı olarak değiştirilebilirler. Bu modifikasyonlar, proteinlerin doğru katlanmamasına ve konformasyon değişikliğine, enzimatik aktivite değişikliğine, biyolojik moleküllerle etkileşimlerindeki değişikliklere ve geri dönüşümlerinin (turnover) değişmesine yol açabilir.

Yüksek ROS seviyeleri; amino asit kalıntısı yan zincirlerinin oksidasyonu, protein omurgasının oksidasyonu ve protein-protein çapraz bağlarının oluşumu yoluyla, proteinlerin parçalanmasına neden olabilmektedir. Proteinlerin degradasyonunu sağlayan iki ana yol olan lizozomal sistemi ve proteazomları değiştirebilirler. Ayrıca, sitrik asit döngüsü ile ilişkili enzimleri inaktive ederek, mitokondriyal fonksiyonu inhibe edebilirler [56, 63, 67, 84].

Mitokondri, ROS'un hem temel üreticisi hem de hedefi olduğu için oksidatif stres, ayrılmaz bir şekilde mitokondriyal disfonksiyonla bağlantılıdır [85]. Mitokondriyal disfonksiyon, mitokondride görülen;

- Mitokondrilerin; şekillerini, dağılımlarını ve boyutlarını korumak için “mitokondri dinamikleri” olarak adlandırılan, fisyon ve füzyon döngülerinde değişiklik,
- ETS'nin inhibisyonu,
- Normal şartlar altında ETS boyunca tek yönlü elektron akışı ve proton gradiyenti yoluyla ya da ETS fonksiyonu bozulduğunda F1F0 ATP sentazın aktivitesini tersine çevirerek gerçekleştirdiği ATP hidrolizi yoluyla üretilen, elektrostatik bir potansiyel olan mitokondri membran potansiyelinin azalması,
- ETS aktivitesinin ve mitokondriyal fonksiyonlarda, mitokondri ve hücre canlılığında, ATP ve ROS üretiminde hayati öneme sahip mitokondri membran potansiyelinin bozulmasıyla proton sızıntısı,
- Bozulan mitokondri membran potansiyeli ile birlikte artan ROS üretimi,
- Mitokondriyal fonksiyonları sürdürmek, mitokondri membran potansiyelini korumak ve artan ROS üretimini azaltmak için ATP tüketiminde artış,

- İleri evrelerinde Ca^{+2} homeostazının bozulması ve hücre ölüm yollarına yönlendirilme,

olarak sıralanabilecek çok sayıda mitokondriyal fonksiyonundaki bozukluklar olarak tanımlanmaktadır [86-93].

Oksidatif stres ile mitokondriyal disfonksiyon arasında bir kısır döngü bulunmaktadır. Oksidatif stres; mitokondri DNA'sı, lipitleri ve proteinlerinde oksidatif hasara neden olur. Mitokondride oluşan bu oksidatif hasar mitokondriyal disfonksiyona sebep olurken, mitokondriyal disfonksiyonun bir sonucu olarak da ROS üretiminde artış görülür [89, 93, 94].

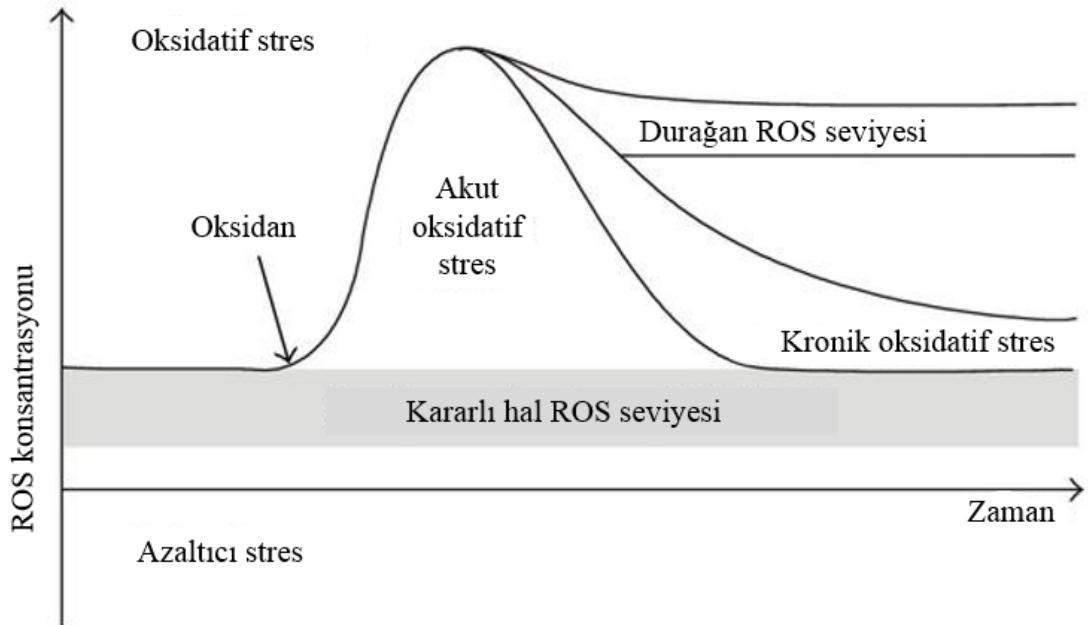
Mitokondriyal disfonksiyon, primer (doğal) veya sekonder (kazanılmış disfonksiyon) kaynaklı olarak gelişmektedir. Primer mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) proteinlerinin kodlandığı ya da OXPHOS işlevinin gerçekleşmesinde rol alan genlerin bulunduğu mtDNA ya da nükleer DNA (nDNA)'daki germline mutasyonlar sebebiyle oluşur. Sekonder mitokondriyal disfonksiyon ise, hem çevresel hem de genetik faktörler aracılığıyla gelişmektedir. Oksidatif strese neden olabilecek olumsuz çevresel koşullara ya da yaşlanma, inflamatuvar yanıt, mitotoksik ilaçlar gibi mitokondriyi olumsuz yönde etkileyen diğer süreçlere bağlı olarak sekonder mitokondriyal disfonksiyon oluşabilmektedir. Ayrıca OXPHOS ile ilişkili olmayan genlerdeki mutasyonlar sebebiyle oluşan, KMH'ların da içinde bulunduğu birçok patolojik süreç ile birlikte de görülebilir [95, 96].

2.2.3. KMH'ların Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Disfonksiyon İle İlişkisi

Normal koşullar altında, hücrel ROS seviyesi "kararlı hal seviyesi" olarak isimlendirilen belirli bir aralıkta dalgalanma göstermektedir. Endojen ve/veya eksojen kaynaklı oksidan indüksiyonu sonucu, ROS üretiminde keskin bir artış ile hücrel ROS seviyesi kararlı hal seviyesi aralığını aşabilir. Ancak hücrel antioksidan potansiyeli yeterince yüksekse, artmış ROS seviyesi tekrar kararlı hal seviyesi aralığına geri çekilebilir. Bu olay "akut oksidatif stres" olarak tanımlanmaktadır. Eğer mevcut antioksidan potansiyeli fazla miktardaki ROS'u ortadan kaldıramazsa, hücre antioksidan savunmasını arttırabilir, ancak yanıt vermesi biraz zaman alır. Bu aynı zamanda enerji ve amino asitler gibi önemli biyomoleküllerin tüketimine neden olması sebebiyle redoks

homeostazının önemli ölçüde bozulmasına neden olur. Antioksidan potansiyelinin yükselmesi, ROS seviyesini kararlı hal seviyesinin daha geniş bir aralığına geri döndürebilir ya da ROS seviyelerinde uzun süreli bir artış nedeniyle hücre “kronik oksidatif stres” durumuna girebilir. Hücresel ROS seviyesinin kararlı hal seviyesi aralığına geri dönmediği çeşitli patolojik durumlarda sistem, hücresel ROS seviyesini “durağan” olarak adlandırılan yeni, daha yüksek ROS seviyesinde stabilize edebilir. Bazı durumlarda “azaltıcı stres (reductive stress)” olarak adlandırılan ROS seviyesinin kararlı hal seviyesinden daha düşük olduğu durumlar da ortaya çıkabilir.

NAD(H) enerji metabolizmasını düzenlerken, NAD(P)H (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) ve GSH, oksidatif strese yanıt olarak vazgeçilmez indirgeme eşdeğerleridir. Ancak, aşırı hücresel NAD(P)H ve/veya GSH birikimi azaltıcı strese neden olarak, hücre büyüme tepkilerini azaltır, proteinlerde disülfür bağlarının oluşumunda değişikliklere yol açar, mitokondriyal fonksiyonu ve hücresel metabolizmayı azaltır. Kronik azaltıcı stres maruziyetinin, geri bildirim düzenlemesi ile hücreleri koruyabilmek için oksidatif stresi uyardığı gösterilmiştir. Bu durumda hücrede, ATP miktarında artış ile karakterize olan mitokondriyal oksidatif stres üretimi görülebilmektedir. Ancak azaltıcı stres ile ilgili yapılan çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır ve ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir [11-16, 55].



Şekil 2.5. Biyolojik sistemlerde ROS dinamiği [11].

Genel olarak akut oksidatif stres, organizmalar için ciddi sonuçlara yol açmazken; kronik oksidatif stres, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, diabetes mellitus, obezite, kanser, immünolojik ve enfeksiyon hastalıkları, KMH'lar gibi çeşitli patolojilere yol açabilir veya onlara eşlik edebilir [7, 11].

Hasta örnekleri ve hayvan modelleriyle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bazı KMH'larda gözlenen çoklu organ bozukluklarına önemli katkı sağlayan oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna işaret etmektedir. Toksik metabolitlerin birimi ile karakterize olan KMH'ların birkaçının, ortak patomekanizmaları paylaştıklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Önerilen ve kanıtları bulunan bu ortak patomekanizma;

- Toksik metabolitlerin birikimi ile oksidatif stresin artışı ve mitokondriyal disfonksiyon,
- Hastalık patofizyolojisinin ikincil sonucu olarak izlenen mitokondriyal disfonksiyon sonucu mitokondriyal enzimlerin ve süreçlerin inhibisyonu, bozulmuş enerji metabolizması ve ROS seviyelerinin artışı,
- Artan ROS seviyesi ile birlikte antioksidan kapasitesinde değişiklikler ve DNA, protein ve lipitlerde oksidatif hasarın artması

ile açıklanmaktadır [7-10] .

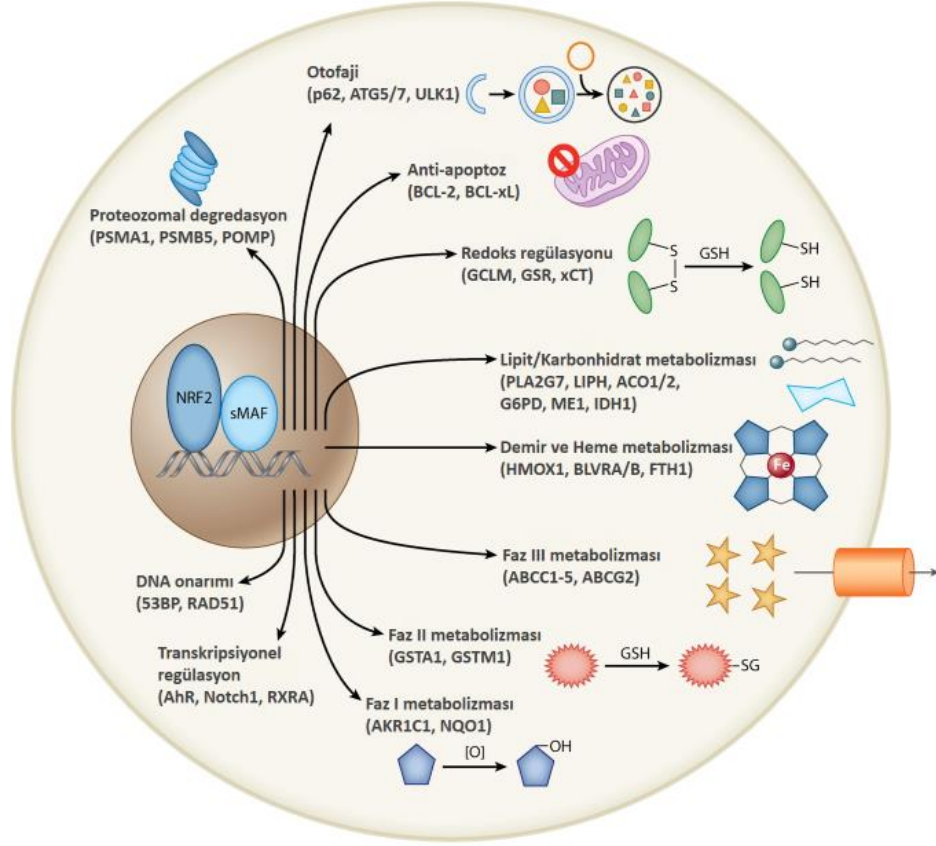
Geçmiş yıllarda ROS sinyallerinin karmaşık ve dinamik rolleri, normal ve patolojik süreçlerde yapılan çalışmalarla derinlemesine anlaşılmıştır. Ancak KMH'ların ROS'u ürettiği kesin mekanizmalar bilinmemektedir ve KMH'larda redoks sinyal yolları ile ilgili yapılan çalışmalar hala başlangıç aşamasındadır [7, 8].

2.3. Oksidatif Stres Cevabı: Nrf2

2.3.1. Nrf2'nin Hücresel Fonksiyonu

Transkripsiyon faktörü Nrf2'nin, temel olarak üzerinde durulan antioksidan savunmasında yer alan proteinlerin ekspresyonunu indüklemeye kabiliyetinin yanı sıra Nrf2, faz I – III ilaç / ksenobiyotik metabolizması, protein homeostazı, ubiquitin sistemi ve otofaji, DNA onarımı, karbonhidrat ve lipit metabolizması, NADPH üretimi, demir homeostazı, transkripsiyonel regülasyon ve mitokondriyal fonksiyon dahil, çok sayıda

hücresel süreçte yer alan 250'den fazla genin ekspresyonunu düzenlemektedir [18, 19, 97-101].



Şekil 2.6. Nrf2'nin hedef genleri tarafından uyarılan hücresel yollar [18].

Redoks regülasyonu: Nrf2, hücresel redoks homeostazının ana düzenleyicisidir. Nrf2 başlıca, tiyol bazlı antioksidan enzimlerin ve GSH'ın sentezi ve redoks çevrimi yoluyla redoks regülasyonunu sağlamaktadır. Örneğin, GSH'ın de novo sentezinden sorumlu olan glutamat sistein ligazın (GCL) katalitik ve modülatör alt birimleri (GCLM ve GCLC), Nrf2'nin hedef genleridir. Ayrıca peroksitleri indirgemek için GSH'ı kullanan GPx'ler, okside GSH'ı indirgeyen GR ve ve peroksitleri doğrudan indirgeyen PRX'ler de Nrf2'nin hedef genleridir. Okside protein tiyollerinin, tiyoredoksin 1 (TXN1) ve TrxR tarafından indirgenmesi ve GSH üretimi için kritik öneme sahip xCT taşıyıcısı (SLC7A11) vasıtasıyla sisteinin taşınması Nrf2 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir. Bunlara ek olarak Nrf2; SOD, CAT, NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1) ve heme oksijenaz 1 (HMOX1) gibi oksidatif stres ile ilişkili çeşitli genlerin ekspresyonunu

düzenleyerek oksidatif strese hızlı bir şekilde yanıt verilmesini sağlamaktadır [18, 102, 103].

İlaç / ksenobiyotik metabolizması: Nrf2, üç ilaç / ksenobiyotik metabolizma fazını da düzenlemektedir. Faz I metabolizmasında yer alan Nrf2 hedeflerine örnek olarak toksik maddelerin / ilaçların aktif metabolitlere indirgenmesinde rol oynayan; aldo-keto redüktaz ailesi üyeleri (AKR1C1, AKR1B1 ve ARK1B10), aldehit dehidrojenaz ailesi üyeleri (ALDH1A1, ALDH3A1 ve ALDH7A1) ve NQO1 verilebilir. Faz II metabolizmasında ara maddelerin GSH veya glukuronik aside konjugasyonunda rol oynayan enzimler olan glutatyon-S-transferazlar (GST'ler) (GSTA1–4 ve GSTM1–4) ve UDP-glukuronosil transferaz (UGT'ler) (UGT1A1 ve UGT2B7) de, Nrf2'nin hedefleridir. Nrf2 ayrıca, hücreden ksenobiyotik / ilaç salgılayan faz III membran taşıyıcılarının (ATP bağlayıcı kaset ailesi üyeleri / çoklu ilaç direnç proteinleri; ABCC 1-5 ve ABCG2) transkripsiyonunu da düzenlemektedir [7, 10, 104].

Protein homeostazi: Nrf2, otofaji ve ubikuitin sistemi aracılığıyla protein homeostazının korunmasında rol oynamaktadır. Otofaji ilişki 5 proteini (ATG 5), otofaji ilişki 7 proteini (ATG 7), Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz (ULK1/2), protein translasyonu ve otofajinin ana düzenleyicisi olan mTOR ifadeleri, Nrf2 tarafından düzenlenmektedir. Otofajik adaptör protein olan p62/SQSTM1 de, bir Nrf2 hedefidir. Ayrıca Nrf2, proteozomal alt birimlerin ve proteozomal olgunlaşma proteininin ekspresyonunu kontrol etmektedir [18, 101, 105].

Lipit, karbonhidrat ve demir metabolizması: Nrf2, anabolik metabolizmada glukoz ve yağ asiti süreçleri için gerekli metabolik enzimlerin çoğunu düzenlemektedir. NADPH üretiminden sorumlu olan, pentoz fosfat yolu enzimlerinden glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (PGD) ve transaldolaz (TALDO1); Krebs döngüsü enzimlerinden malik enzim (ME1) ve izositrat dehidrojenaz 1 (IDH1) ekspresyonları Nrf2 tarafından düzenlenmektedir. Lipit katabolizmasında rol oynayan lipaz H (LIPH), fosfolipaz A2 (PLA2G7) ve asetil-CoA oksidaz 2 (ACOX2) Nrf2 hedefleridir. HMOX1, biliverdin A ve B'nin (BVRD1 / 2) ve ferritinin hafif ve ağır zincirlerinin (FTH1 / FLH1) transkripsiyonu yoluyla Nrf2, heme metabolizmasını ve demir homeostazını düzenler [18, 19].

DNA onarımı, apoptozun önlenmesi, transkripsiyonel regülasyon: Nrf2, p53 bağlayıcı protein 1 (53BP1), DNA onarım proteini RAD51 homolog 1 (RAD51), antiapoptotik proteinler olan BCL2 (B cell lymphoma) ve BCLXL'ı (B cell lymphoma extra large) transkripsiyonel olarak düzenleyerek, DNA hasarı onarımında ve apoptozu önlemede rol oynamaktadır. Nrf2, transkripsiyonel hedefleri ile birçok hücrel cevabı doğrudan düzenler. Bunun yanında transkripsiyonel hedefi olmayan birçok geni de, diğer majör sinyal kaskadlarında rol oynayan transkripsiyon faktörleriyle sağladığı çapraz iletişim aracılığıyla etkileyerek, hücrel fonksiyona dolaylı olarak aracılık edebilir [18, 99].

Mitokondriyal fonksiyon: Mitokondri ve Nrf2 arasındaki ilişki, hücre içindeki ROS dengesi açısından çok dikkat çekicidir. Nrf2, oksidasyon koşullarında çoklu antioksidan proteinlerin regülasyonunu yöneterek, mitokondri türevli ROS'a karşı koyan birincil sistemlerden biridir.

- Mitokondri içinde GPx'ler, $O_2^{\bullet-}$ türevli H_2O_2 'yi, GSH ve NADPH kullanarak suya detoksifiye etmektedirler. Nrf2, GSH biyosentez enzimlerinin ve okside GSH'ın redüksiyonunu sağlayan GR'nin ekspresyonlarını arttırarak, mitokondriyal GSH havuzunun korunmasında kritik bir rol oynamaktadır.
- Hücrede önemli bir indirgeyici molekül olan NADPH, GR aracılı indirgenmiş GSH üretimi ve GPx aracılı H_2O_2 uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Nrf2, pentoz fosfat yolundaki çoklu enzimleri (G6PD, PGD gibi) düzenleyerek, NADPH seviyesini arttırır.
- Ayrıca Nrf2, doğrudan mitokondriyal antioksidan enzimlerin (SOD2, PRX3, PRX5, GPx1 ve TrxR2) ekspresyonunun kontrolünde rol almaktadır [97, 106, 107].

Son çalışmalar, Nrf2'nin mitokondriyal redoks homeostazına katkısına ek olarak, doğrudan ve çeşitli moleküller arası ağlar yoluyla mitokondriyal regülasyona katkıda bulunduğunu göstermektedir. Nrf2, alfa palindromik bağlayıcı protein/ nükleer solunum faktörü 1 (alfa-PAL/NRF-1), mitokondriyal transkripsiyon faktörü A (TFAM) ve peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatörü 1-alfa ($PGC1\alpha$) gibi mitokondriyal transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak mitokondriyal biyogenezde rol almaktadır. Mitokondriyal proteinleri şifreleyen genlerin ekspresyonuna ek olarak mitokondriyal biyogenez, nükleotitlerin sentezini de gerektirmektedir. Nrf2'nin

genetik aktivasyonu, özellikle hızlı çoğalan hücrelerde, pentoz fosfat yolunu ve folat ve glutamin metabolizmasının artırıcı düzenlemesini sağlayarak pürin biyosentezini arttırmaktadır.

Mitokondriyal kalite kontrol sistemi, mitokondriyal bütünlüğü korumak için gereklidir. Bu sistem mtDNA'nın onarımı ve hasarlı mitokondrinin bozulması (mitofaji) ile ilgili yolları içerir. Çok sayıda çalışma Nrf2'nin; mtDNA replikasyonu, mtDNA hasarının engellemesinde rol oynayan antioksidanların ekspresyonu ve mitofajide rol alan p62, HO-1 ve NQO1 gibi hedef genleri aracılığıyla mitokondri kalite kontrolünü ve homeostazını koruduğunu göstermiştir.

Nrf2; mitokondriyal solunumda, ATP üretiminde ve mitokondriyal membran potansiyelinin korunmasında da görev almaktadır. Hücrelerde azalmış Nrf2 aktivitesi, düşük seviyelerde mitokondriyal membran potansiyeli, oksijen tüketim hızı ve ATP üretimi ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, Nrf2'nin yokluğunda, NADPH seviyelerinde de azalma gözlenmektedir.

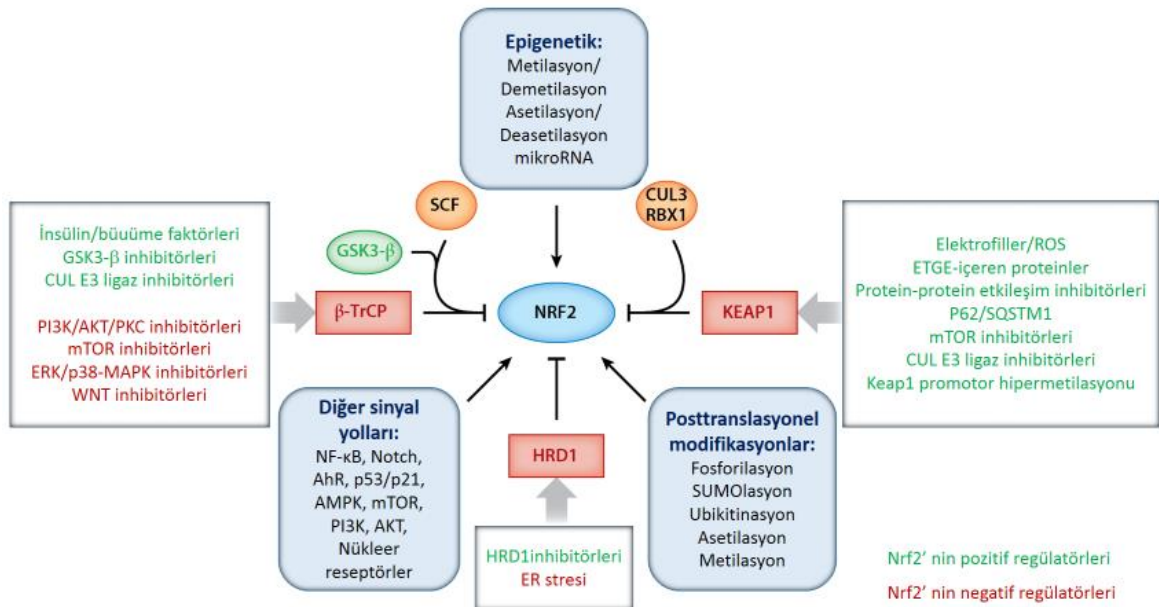
Nrf2 ile ilişkili mitokondriyal solunumun düzenlenmesi, mitokondriyal metabolizmadaki yağ asidi oksidasyonu ve Krebs döngüsü ile bağlantılıdır. Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu, Krebs döngüsünde kullanılacak asetil-CoA'yı üretir ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda majör elektron donörleri olan FADH₂ ve NADH'nin üretilmesiyle ilişkilidir. Nrf2'nin inhibisyonu, pürivat temininin kısıtlanması ve ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının azalmasına neden olarak, mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunu ve Krebs döngüsünü baskılamaktadır.

Nrf2 ve mitokondri arasında karşılıklı bir düzenleyici döngü bulunmaktadır. Mitokondriyal fonksiyonun Nrf2 tarafından düzenlenmesi gibi Nrf2 aktivitesi de, mitokondriyal serine/treonin-protein fosfataz (PGAM5) ve frataksin gibi mitokondriyal proteinlerle düzenlenmektedir. PGAM5, Nrf2 ifadesini baskılayabilir ve mitokondriyal harekete katkıda bulunabilir [19, 97, 98, 106, 108].

2.3.2. Nrf2'nin Regülasyonu

Nrf2'nin regülasyonu esas olarak, Nrf2 protein seviyelerinin ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyon yoluyla kontrol edilmesiyle gerçekleşmektedir. Nrf2 degradasyonundan sorumlu, CUL3-RBX1-KEAP1 kompleksi (Cullin 3-Ring box 1-Kelch-like ECH-associated protein 1 complex), SCF/ β -TrCP kompleksi (S-phase kinase-associated protein 1-Cullin1-Rbx1/ β -transducin repeat-containing protein complex) ve HRD1 (HMG-CoA reductase degradation 1) olmak üzere üç E3 ubiquitin ligaz kompleksi vardır. Her biri, özgül hücresel alanlardaki farklı uyarılar üzerinde Nrf2'nin degradasyonuna aracılık etmektedir. CUL3-RBX1-KEAP1 kompleksi, sitozoldeki elektrofilik/oksidatif strese cevap verir. Nükleer veya sitozolik olabilen SCF/ β -TrCP kompleksi, metabolik değişikliklere karşı daha hassastır ve glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3- β) tarafından düzenlenir. HRD1 ise ER'de yerleşim gösterir ve sadece ER stresi sırasında Nrf2 degradasyonunu gerçekleştirir.

Nrf2 ayrıca; transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, post-translasyonel seviyelerde ve diğer sinyal yolları, epigenetik faktörler ve bağlayıcı partnerlerin mevcudiyeti aracılığıyla da regüle edilmektedir [18-20].



Şekil 2.7. Nrf2 regülasyonu [18].

2.3.2.1. Klasik (Kanonik) Nrf2 Aktivasyonu: Nrf2/Keap1 Yolağı

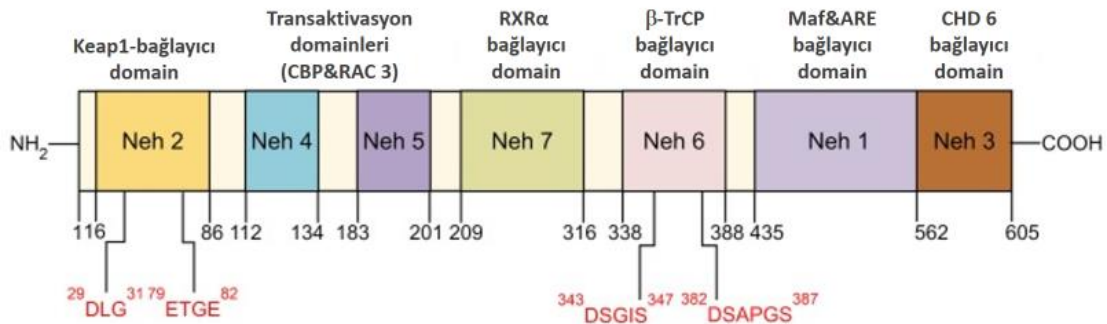
2.3.2.1.1. Nrf2/Keap1 Yolağı Bileşenleri

Nrf2: İnsan Nrf2 proteini, 67.7 kDa moleküler ağırlığa sahip, 605 amino asit kalıntısından oluşan, hücrel homeostazı korumak için gerekli olan, Cap 'n' collar (CNC) transkripsiyon ailesi üyesi bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2'nin karakteristiği olan bazik bölge-lösin fermuar (bZIP) DNA bağlayıcı motifi içerir. Son derece korunmuş, 7 domaini bulunmaktadır.

- **Neh1** (Nrf2-ECH homology), DNA'ya bağlanma ve Nrf2 dimerizasyon partnerleri olan sMaf (small musculoaponeurotic fibrosarcoma) proteinleri ile heterodimer oluşturmak için gerekli olan, iyi korunmuş CNC-bZIP bölgesini ve Nrf2'nin nükleer translokasyonu için gerekli olan bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içermektedir. Ayrıca Neh1, Nrf2 protein stabilitesini düzenlemek için E2 ubiquitin-konjugasyon enzimi olan UbcM2 ile etkileşime girebilmektedir.
- **Neh2**, Nrf2'nin N-terminal bölgesinde bulunur ve Nrf2 stabilitesinin düzenlenmesi için esastır. Keap1 bağlanmasından sorumlu, yüksek oranda korunmuş iki bağlama bölgesi (DLG ve ETGE motifleri) ve ubiquitin konjugasyonu için önemli olan yedi lizin rezidüsü ile Nrf2'nin degradasyonuna aracılık etmektedir.
- **Neh3**, transkripsiyonel koaktivatör CHD6 (a chromo-ATPase/helicase DNA-binding protein) ile etkileşime girerek Nrf2 hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive etmektedir.
- **Neh4 ve Neh5**, aynı Neh3 gibi transkripsiyon aktivasyon domainleridir. Bunlar koaktivatör CBP (AMP response element-binding protein (CREB)-binding protein) ve RAC 3 (receptor-associated coactivator 3) ile etkileşime girerek, Nrf2 transkripsiyonunu kolaylaştırmakta ve Nrf2 hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive etmektedir. **Neh5** domaini ayrıca Nrf2'nin hücrel lokalizasyonunu düzenlemektedir.
- **Neh6**, Keap1'den bağımsız olarak Nrf2 stabilitesinin negatif düzenlenmesinde rol oynayan, serin rezidüsü bakımından zengin domainidir. b-TrCP (b-transducing repeat-containing protein) tarafından tanınan, DSGIS ve DSAPGS olmak üzere iki korunmuş peptid motifi içermektedir. DSGIS motifinin glikojen sentaz kinaz-3b (Gsk-3b) aracılı

fosforilasyonundan sonra β -TrCP, DSAPGS motifi aracılığıyla Neh6 domainine daha verimli bağlanır ve Skp1-Cul1-F-box protein (SCF) ubiquitin ligaz kompleksi aktivitesini artırarak Nrf2'nin proteozomal degradasyonunu sağlar.

- **Neh7**, Nrf2'nin transkripsiyonel aktivitesinin, RXR α (retinoidX receptor α) tarafından iki protein arasındaki fiziksel asosiyasyon yoluyla baskılanmasında rol oynamaktadır [20, 99, 109-112].

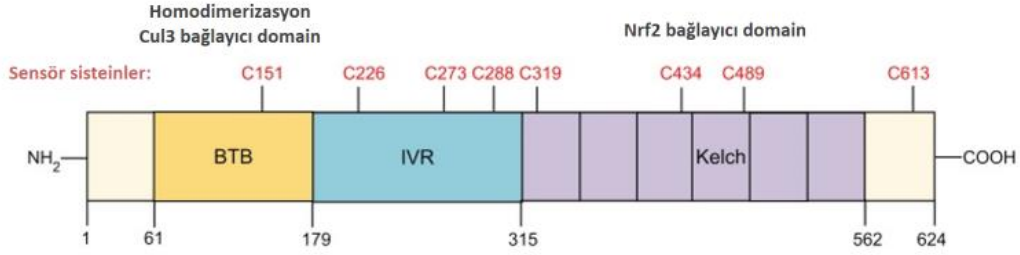


Şekil 2.8. Nrf2'nin yapısı [111].

Keap1: Keap1, Nrf2'nin ana hücre içi düzenleyicisi olup, 27 sistein rezidüsü taşıyan 625 amino asit rezidusundan oluşan, 69.7 kD'lik bir aktin bağlayıcı proteindir. Keap1'in; N-terminal bölgesi (NTR), BTB (the broad complex, tramtrack and bric-a-brac), IVR (the intervening region), DGR (the double glycine repeats)/ Kelch domaini ve C-terminal bölgesi (CTR) olmak üzere 5 ayrı domaini bulunmaktadır.

BTB, IVR ve DGR domainlerinin her biri; Nrf2 aktivitesinin inhibisyonunda önemli rol oynar. Evrimsel olarak korunanan **BTB domaini**, Nrf2'ye bağlanma için gerekli olan Keap1'in homodimerizasyonundan ve CUL3 E3 ubiquitin ligaz kompleksi ile arasındaki etkileşimden sorumludur. Bu domainde bulunan Cys151 (sistein rezidüsü), elektrofilik strese cevap olarak Nrf2 aktivasyonu için önemlidir. Sistein bakımından zengin **IVR domaini**, oksidasyona ve Keap1'in sitoplazmadaki lokalizasyonu için önemli olan nükleer transport sinyali (NES) motifine duyarlıdır. IVR'de özellikle Cys257, Cys273, Cys288 ve Cys297 olmak üzere, hücre ortamında indükleyici ligandlar veya oksidatif stres için sensörler olarak görev alan, dört reaktif sistein rezidüsü tanımlanmıştır. Cys273 ve Cys288, Nrf2'nin Keap1-bağımlı ubiquitinasyonu ve Nrf2 aktivitesinin Keap1-aracılı

baskılanması için elzemdir. **DGR/Kelch domaini**, altı adet tekrar eden Kelch motifinden (KR1 - KR6) oluşur. Keap1'in Nrf2'ye, Neh2 domainindeki DLG ve ETGE motiflerine farklı afinite ile bağlanmasından sorumludur. Nrf2'nin DGR domainine bağlanması, p62 ve BRCA2'nin ortağı ve lokalizatörü gibi spesifik motiflere sahip proteinler tarafından rekabetçi bir şekilde inhibe edilmektedir. Bu sebeple Keap1, otofaji eksikliği ve DNA hasarı gibi hücrel stresin bir sensörü olarak işlev görmektedir [109, 111-116].



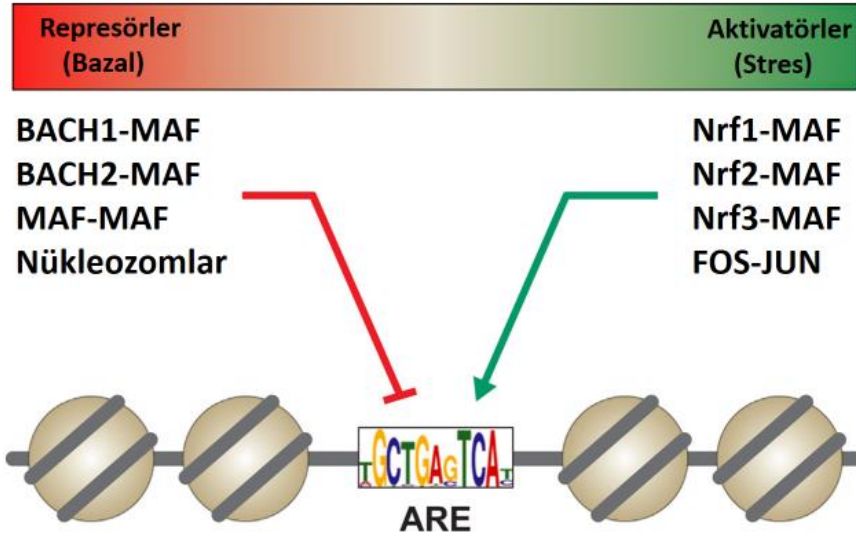
Şekil 2.9. Keap1'in yapısı [111].

sMaf'lar (small muscular aponeurotic fibromatosis proteins): Evrimsel olarak korunmuş olan sMaf'lar (MafF, MafG ve MafK), bZIP tipi transkripsiyon faktörleridir. sMaf'lar, kendi başlarına homodimerler oluştururken, CNC proteinleri (p45/NF-E2, Nrf1, Nrf2 ve Nrf3) ve Bach (Broad complex– Tramtrack–Bric-a-brac and Cap n'Collar homology, basic leucine zipper transcription factors) proteinleri (Bach1 ve Bach2) ile heterodimerler oluştururlar. sMaf'lar transkripsiyonel aktivasyon domaininden yoksundur, dolayısıyla homodimerleri transkripsiyonel baskılayıcılar olarak işlev görür. CNC ve Bach proteinleri, monomer olarak DNA'ya bağlanamadığından, işlevlerini yerine getirmek için zorunlu olarak sMaf'lar ile heterodimerize olurlar. Bu heterodimer yapı ile sMaf'lar, transkripsiyonel aktivatörler ya da inhibitörler olarak işlev görür [20, 117, 118].

ARE (Antioxidant response element): ARE, antioksidan ve detoksifiye yanıt, hücrel proliferasyon, metabolizma, immün yanıt, sinyalleşme, hücrenin hayatta kalması ve hücrel siklusta yer alan çok sayıda genin promotor bölgesinde bulunan bir cis-regülatör veya enhancer dizisidir. ARE'nin çekirdek dizisi 5'-TGACNNNGC-3' içerir ve başlıca oksidatif stres indükleyicilere cevap verir.

ARE aktivitesinin düzenlenmesinde çeşitli proteinler rol oynamaktadır. Hematopoetik sistemdeki gelişimsel değişimleri düzenleyen p45/NF-E2 hariç, tüm CNC ve Bach

proteinleri strese cevap veren genlerin regülatörleridir. sMaf'lar ile heterodimerize olan CNC ve Bach proteinleri gen ekspresyonunu düzenlemek için ARE dizilerine bağlanmaktadır. Tüm cis-regülatör diziler gibi ARE de, transkripsiyon faktörünün bir bağlama motifine erişimini engelleyen nükleozomlar tarafından baskılanmaktadır. Ayrıca farklı homodimerlerin ve heterodimerlerin ARE tarafından düzenlenen genlerin transkripsiyonunu aktive ettiği veya baskılayabildiği bilinmektedir [99, 114, 119, 120].



Şekil 2.10. Potansiyel ARE bağlayıcı transkripsiyon faktörü kompleksleri [120].

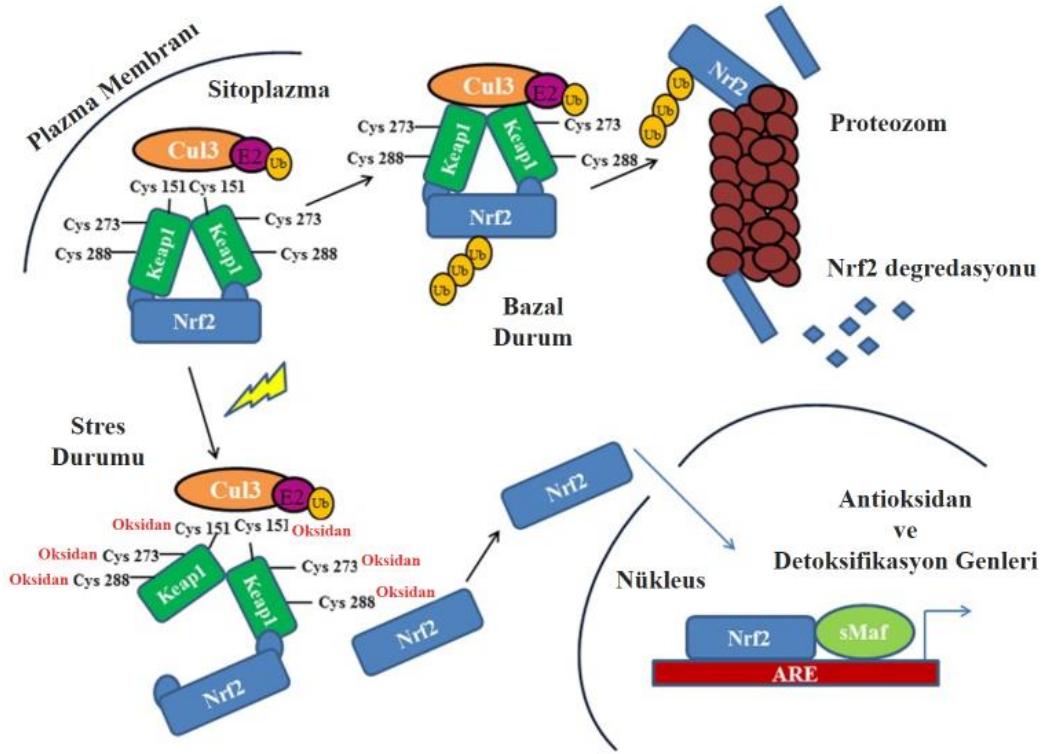
2.3.2.1.2. Nrf2/Keap1 Yolağı

Keap1, Nrf2 aktivitesinin en önemli düzenleyicisidir. Bazal koşullar altında, homodimer yapıdaki Keap1, DGR/Kelch domaini ile Nrf2'nin Neh2 domainindeki DLG ve ETGE motiflerine bağlanır. Keap1 aynı zamanda, E3 ubiquitin ligaz kompleksi Cul3 / Rbx1 ile etkileşim halinde olduğundan kendisine bağlı olan Nrf2'nin poliubikitinasyonuna aracılık ederek proteozomal yolla Nrf2'nin degradasyonunu sağlar. Nrf2 yaklaşık 10-30 dakikalık kısa bir yarı ömre sahiptir. Bu yüzden, Nrf2'nin Keap1 aracılı hızlı dönüşümü (turnover), Nrf2 bazal seviyelerini oldukça düşük tutar ve Nrf2'nin hedef genlerinin gereksiz ifadesini önler [20, 106, 113, 114].

Stres koşulunda ise oksidatif stres veya elektrofiller dolaylı olarak, Nrf2 ve Keap1 arasındaki etkileşimi bozarak detoksifikasyon enzimlerinin transkripsiyonunu indükler. Nrf2 ve Keap1 arasındaki etkileşimin bozulmasını açıklamak için; CUL3 ayrılma modeli,

menteşe ve mandal modeli, konformasyonel döngü modeli olmak üzere üç geçerli mekanizma vardır. Menteşe ve mandal modeli hala Keap1 ve Nrf2 etkileşimini açıklayan birincil model olarak kalsa da, diğer alternatif modeller de farklı deney yaklaşımları kullanılarak elde edilmiştir. CUL3 ayrılma modelinde, Keap1'in BTB domainindeki Cys151'in modifikasyonu, CUL3'ün Keap1'den ayrılmasına neden olarak Nrf2'nin ubiquitinasyonunu ve proteozomal degradasyonunu önler. Menteşe ve mandal modelinde, Keap1'in BTB domaini yerine IVR bölgesindeki sistein rezidülarının elektrofilik modifikasyonu gerçekleşir. Bu modifikasyon sonucu Keap1'de meydana gelen konformasyon değişikliği ile Nrf2'nin Keap1'e düşük afiniteyle bağlı olan DLG motifi (mandal) serbest kalırken, Keap1'e yüksek afiniteyle bağlı olan ETGE motifi (menteşe) bağlı kalmaya devam eder. DLG motifinin serbest bırakılması sonucu, ubiquitinasyon için gerekli olan Nrf2'nin uygun pozisyonu bozulur ve proteozomal degradasyon önlenir. Konformasyonel döngü modelinde ise, Nrf2/Keap1 kompleksindeki tüm bileşenler birbirlerine bağlıdır, sadece Keap1'de gerçekleşen kovalent modifikasyon sonucu Nrf2'de oluşan konformasyonel değişiklikler sebebiyle ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyon önlenir [121, 122].

Bu modellerin tümü, sitozolde Nrf2'nin ubiquitinasyonunun ve proteozomal degradasyonunun önlenmesiyle Nrf2'nin nükleusa translokasyonu ile sonuçlanmaktadır. Nrf2 nükleusta, sMaf'lar ile heterodimerize olur. Nrf2-sMaf kompleksi, Nrf2 hedef genlerinin promotor bölgesindeki ARE dizisine özgü bir şekilde bağlanır ve ilaç detoksifikasyonu, antioksidan cevap, NADPH rejenerasyonu ve metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynayan genlerden protein kodlanmasını sağlar [20, 121].



Şekil 2.11. Nrf2'nin Keap1 tarafından regülasyonu [123].

2.3.2.2. Alternatif (Nonkanonik) Nrf2 Aktivasyonu

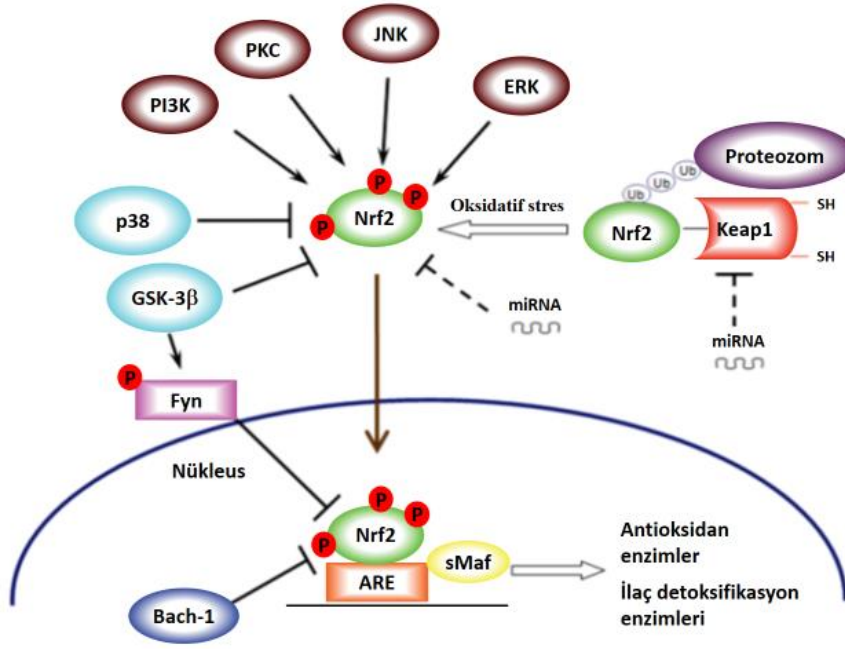
Transkripsiyonel Regülasyon: Nrf2'nin promotor bölgesi, aril hidrokarbon reseptörünün (AhR) aktivasyonu yoluyla, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) tarafından uyarılmasını sağlayan XRE (xenobiotic response element) benzeri diziler içermektedir. Bu sebeple AhR'nin PAH tarafından indüklenmesi, Nrf2 yolağını aktif hale getirebilmektedir. Nrf2 ve GST gibi bazı Nrf2 hedef genlerinin promotor bölgelerinde XRE ve ARE elemanları çok yakın bulunur. Nrf2'nin promotor bölgesi içinde bu DNA bağlanma bölgelerinin (ARE / XRE) varlığı, Nrf2'nin kendi transkripsiyonunu düzenleme yeteneğini yani otheregülasyona sahip olduğunu göstermektedir. Nrf2 promotor bölgesi ayrıca, NF- κ B bağlanma bölgesi içerdiğinden Nrf2, lipopolisakarit tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilebilmektedir. BRCA1'in (breast cancer 1, early onset), Nrf2 promotor bölgesine XRE benzeri diziler aracılığıyla bağlanarak genin transkripsiyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Onkogenik Kras (KRAS proto-oncogene, GTPase) ve B-Raf (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase), Myc (MYC proto-oncogene, BHLH transcription factor), PI3K-Akt yolu (phosphoinositide-3-

kinase/ (AKT serine/threonine kinase pathway) ve Notch (Notch receptor) sinyal yolağı da Nrf2 transkripsiyonunu arttırmaktadır.

Posttranskripsiyonel Regülasyon: Son yıllarda, Nrf2/Keap1 yolağını düzenleyen birçok mikroRNA'nın (miRNA) bulunduğu tespit edilmiştir. Genetik lokuslardan kopyalanan miRNA'lar, 20-22 nükleotitten oluşan, protein kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar, translasyonu inhibe ederek ya da hedef mRNA'ların degradasyonunu indükleyerek gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Nöronal SH-SY5Y hücrelerinde, dört miRNA'nın (miR-144, miR-153, miR-27a ve miR-142-5), tek tek veya bir grup olarak aşırı ifadesinin, Nrf2 mRNA ve protein seviyelerini azalttığı ve glutatyon üretiminin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca insan MCF7 meme kanseri hücrelerinde miR-28'in, insan MCF10A meme epitel hücrelerinde ve T47D meme kanseri hücrelerinde miR-93'ün ektopik ekspresyonunun, Nrf2 mRNA ve protein seviyelerini düşürdüğü yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak fizyolojik koşullarda validasyon henüz bulunmamaktadır ve miRNA'ların Nrf2'yi ve diğer proteinleri düzenlediği temel mekanizma için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir.

Nrf2 ayrıca alternatif ekleme (alternative splicing) ile de düzenlenebilmektedir. Akciğer ve baş boyun kanserlerinde ekzon 2 veya ekson 2 ve 3 eksik, anormal Nrf2 transkript varyantları gözlenmiştir. Bu varyantlar, Keap1 ile etkileşim alanından yoksundur. Bu sebeple Nrf2 stabilizasyonuna ve Nrf2 gen ifadesinin indüklenmesine neden olmaktadır [20, 99, 113, 124].

Posttranslasyonel Regülasyon: Nrf2'nin posttranslasyonel regülasyonu, Keap1-Cul3-Rbx1 E3 ligaz kompleksi aracılı Nrf2 ubiquitinasyonunun yanı sıra, fosforilasyon, asetilasyon ve sumolasyon ile de sağlanmaktadır. Nrf2, farklı kinazlar tarafından fosforilasyona olanak sağlayabilen birçok serin, treonin ve tirozin rezidüsü içerir. Yapılan çalışmalar; PI3K/Akt, PKC (protein kinase C), JNK (c-Jun NH2-terminal protein kinase) ve ERK'in (extracellular signal regulated kinase) Nrf2'yi aktive, p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase) ve GSK-3 β 'nin (glycogen synthase kinase-3 β) Nrf2'yi inhibe ettiğini göstermektedir.



Şekil 2.12. Nrf2'nin kinazlar tarafından regülasyonu [125].

Nrf2'nin Neh1 alanı içindeki Lys rezidüları, Nrf2'nin asetilasyon ile posttranslasyonel regülasyonuna olanak sağlamaktadır. (CREB-binding protein) CBP / p300 tarafından asetilasyon sonrası, Nrf2'nin DNA bağlama ve gen transaktivasyonunu artırır.

Nrf2'nin sitoplazmadaki degradasyonu, hücredeki Nrf2 seviyelerinin regülasyonunda temel yolak olarak ayrıntılı çalışılmış olsa da, sumolasyon ile Nrf2'nin degradasyonu nükleusta da gerçekleşebilmektedir. Nrf2, SUMO-1 ve SUMO-2 (small ubiquitin-like modifier 1 and 2) tarafından sumolasyonu sonrası, bir poliSUMO-spesifik E3 ubiquitin ligaz olan RNF4 (RING finger protein 4) aracılığı ile ubiquitinasyona uğrayarak, PML-NB (promyelocytic leukemia-nuclear body) lokalize proteozom tarafından degrade edilir [18, 20, 102, 112, 113, 124-128].

Epigenetik Regülasyon: Nrf2'nin promotor hipermetilasyonu, Nrf2 seviyelerinde azalmaya; Nrf2'nin promotor hipometilasyonu ise, Nrf2 seviyelerinde artışa neden olmaktadır. KEAP1 promoterinin hipermetilasyonu, Nrf2 ekspresyonunun artmasına neden olarak Nrf2 aktivitesini etkileyebilir.

Ayrıca histonların asetilasyonun/deasetilasyonun ve metilasyonun/demetilasyonun da Nrf2 aktivasyonunu etkilediği çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak hastalıklarda Nrf2

yolağının modülasyonunda potansiyel epigenetik hedefleri belirlemek için ek çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir [18, 129, 130].

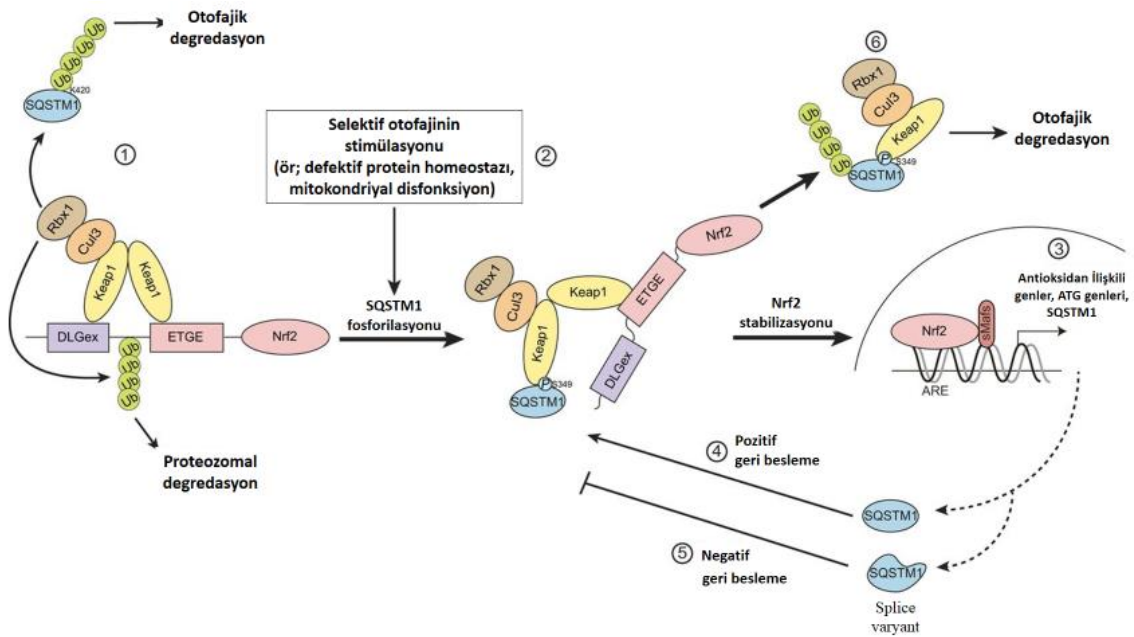
Protein Partnerleri İle Regülasyon: Nrf2 gen ifadesinin düzenlenmesi Nrf2 ve Keap1 ile etkileşime girebilen proteinler aracılığıyla sağlanabilmektedir. Keap1 Nrf2 ile benzer şekilde; DPP3 (dipeptidyl-peptidase 3), IKK β (I κ B kinase β), PALB2 (partner and localizer of BRCA2), PGAM5 (phosphoglycerate mutase 5), WTX (Wilms tumor gene on X chromosome) ve ProT α (prothymosin α) gibi bir ETGE motifine sahip, farklı yolaklarda rol alan proteinlerle etkileşime girebilmektedir. Bunun sonucunda, Keap1 ile etkileşimi engellenen Nrf2'nin proteozomal degradasyonu gerçekleşemez ve Nrf2 transkripsiyonel olarak aktive edilir.

Keap1'e bağlanarak Nrf2 degradasyonunun önlenmesini sağlayan proteinlerin yanı sıra; p21, BRCA1 gibi doğrudan Nrf2'ye bağlanarak Nrf2'nin transkripsiyonel aktivasyonunu indükleyen proteinler de bulunmaktadır. Örneğin p21, Nrf2'deki DLG ve/veya ETGE motifleri ile etkileşime giren bir Kelch motifi içerir. Bu sayede Nrf2'nin aktivasyonuna ve p53'ün Nrf2 aktivitesini etkilemesine neden olmaktadır. DNA onarım proteini olan BRCA1 ise Nrf2'deki ETGE motifine bağlanarak, Nrf2'nin Keap1 tarafından proteozomal degradasyonunun önlenmesini sağlamaktadır [99, 124, 131].

ARE aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan sMaf proteinlerinin ve bunların bağlanma partnerlerinin varlığı, miktarı ya da aktivitesindeki değişiklikler de, dolaylı yoldan Nrf2 hedef genlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır [20, 132].

p62/SQSTM1 (sequestosome 1) proteini aracılığıyla Nrf2 aktivasyonu, nonkanonik yolun en çok çalışılan mekanizmasıdır. Çok domainli ve çok fonksiyonlu bir protein olan p62, otofaji yolağı ve Nrf2 aktivasyonu ile hücreleri stresten korur. Bazal koşullarda Nrf2'nin degradasyonu Keap1–Cul3–Rbx1 ubiquitin ligaz kompleksi aracılığıyla proteazomal yolla gerçekleştirilirken, ubiquitin ligaz ayrıca p62'nin de ubiquitinasyon yoluyla otofajik yıkımını uyararak Nrf2'nin inaktivasyonunu sağlamaktadır. Stres koşullarında ise, Keap1 ile Nrf2 arasındaki etkileşime benzer şekilde Keap1 ile etkileşime girebilen p62, Nrf2'nin ETGE motifine benzer STGE motifi sayesinde, Keap1 ile bağlanma için Nrf2 ile rekabet eder. p62'nin, mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), TAK1

(transforming growth factor beta-activated kinase 1) veya diğer kinazlar tarafından fosforilasyonu, p62'nin Keap1'e bağlanma afinitesinde artışa neden olur. Fosforile p62, Nrf2'nin yerini alarak Keap1 ile kompleks oluşturur. Böylece serbest kalan Nrf2 nükleusa transloke olur ve hedef genlerin ekspresyonunu indükler. Nrf2'nin hedef genleri arasında promotöründe ARE dizisi bulunan p62'de bulunmaktadır. p62'nin ekspresyonunun indüklenmesi sonucu iki p62 izoformu upregüle edilir. Tam uzunluktaki form, pozitif geri besleme döngüsü ile Nrf2 aktivasyonunu düzenler. Keap1 ile etkileşim bölgesinden yoksun olan splice varyant, Nrf2'nin sürekli aktif kalmasını engelleyici, tam uzunluktaki formun regülasyonunu sağlayıcı bir mekanizma olarak Nrf2'nin inaktivasyonunu sağlarken, fonksiyonel olarak aktif otofajik reseptör özelliğini korumaktadır. Oluşan p62-Keap1 kompleksi ise, p62 sayesinde otofagozomal membran ile etkileşime geçer ve Keap1'in otofaji yoluyla degradasyonu gerçekleşir. Bu düzenleyici mekanizma, Keap1'in Nrf2 aktivitesini inhibe etmek için yeniden sentezlenmesini gerektirdiğinden, kalıcı bir Nrf2 cevabı sağlamaktadır [20, 21, 99, 124, 133-135].



Şekil 2.13. p62-aracılı Nrf2/Keap1 yolu [21].

2.4. Oksidatif Stres ve Otofaji İlişkisi: p62/Nrf2/Keap1 Yoluğu

2.4.1. Otofaji

Otofaji terimi “kendi kendini yemek” anlamına gelen, Yunanca oto (kendi) ve faji (yemek) anlamına gelen sözcüklerinden türetilmiştir. Genel anlamda ise otofaji,

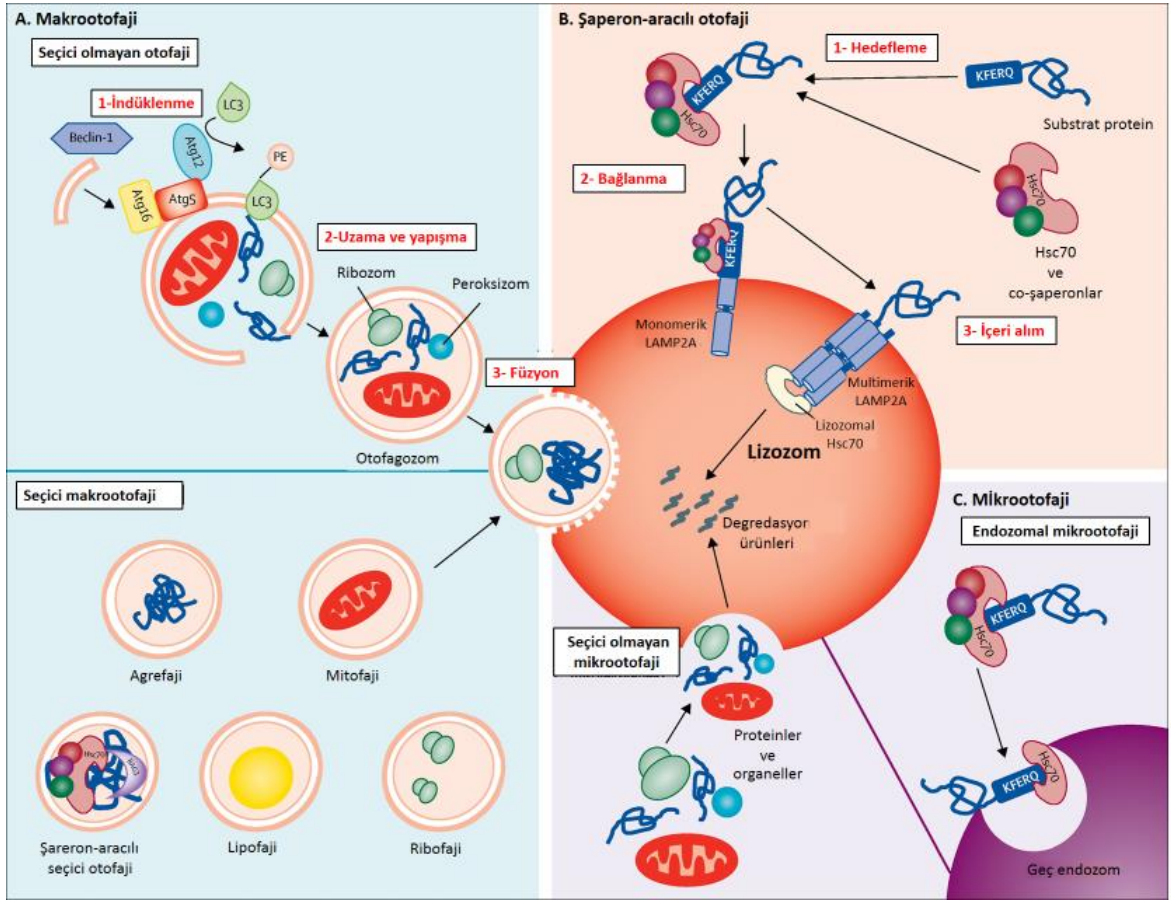
makromolekül kompleksleri, proteinleri ve tüm organelleri içeren hücrel bileşenlerin lizozomal degradasyonunda rol oynayan, evrimsel olarak korunmuş, katabolik moleküler bir süreçtir [22, 23, 60, 136].

Otofaji hem fizyolojik koşullarda hem de hücrel stres durumunda çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Bazal koşullarda otofaji, uzun ömürlü veya yanlış katlanmış proteinlerin, protein agregatlarının, zararlı bileşenlerin ve hasar görmüş organellerin temizlenmesini veya dönüşümlerini (turnover) kolaylaştırarak hücrel homeostazı ve hücrel bileşenlerin kalite kontrolünü korur. Besin yetersizliği, hipoksi, oksidatif stres, enfeksiyon, protein agregatlarının birikmesi, mitokondriyal hasar gibi çeşitli stres koşullarında ise otofaji, hücrelerin adaptasyonuna ve hayatta kalmasına yardımcı olmak için düzenlenmektedir. Stres koşulları altında otofaji, hasarı kısıtlayarak ve hayatta kalmak için gerekli bileşenleri sağlayarak hücreye yardımcı olur. Enfeksiyona neden olan patojenin, protein agregatlarının ve hasarlı mitokondrinin lizozomal degradasyon ile uzaklaştırılmasını sağlar. DNA/RNA, karbonhidratlar, proteinler ve trigliseritler gibi çeşitli makromoleküllerin lizozomal degradasyonunu sağlayarak; yapı taşı olan nükleozitlerin, amino asitlerin, şekerlerin ve serbest yağ asitlerinin biyomolekül de novo sentezinde ya da Krebs döngüsü ve diğer metabolik süreçler yoluyla hücrel fonksiyonların güçlendirilmesi için ATP'nin üretilmesinde kullanılmasını sağlar [23, 136-140].

Ayrıca yapılan çalışmalar otofajinin, homeostatik rolleri sayesinde hücrenin yaşama kararında büyük etkisi olduğu kadar, diğer hücre ölüm yollarıyla aralarındaki karmaşık ve çok yönlü bir ilişki sebebiyle, otofajinin birincil ölüm şekli olarak hareket etmekten ziyade diğer hücre ölümü biçimlerini kolaylaştırabilmesiyle hücrenin ölüm kararında da büyük etkisi olduğunu göstermektedir. İlaveten son yıllarda yapılan çalışmalar, “otofajik hücre ölümü” veya “tip II programlanmış hücre ölümü” adı verilen bir işlemle, diğer hücre ölüm yollarından bağımsız olarak, doğrudan otofaji yoluyla hücreleri yok etme potansiyeline sahip olabildiğini de göstermektedir [23, 141-146].

2.4.1.1. Otofaji Çeşitleri

Otofaji, yıkım sürecine gönderilecek olan kargo olarak ifade edilen hücre içi yapıların lizozoma giriş mekanizmasına bağlı olarak; makrootofaji, şaperon-aracılı otofaji ve mikrootofaji olmak üzere üç genel tip mekanizmaya ayrılmaktadır [147, 148].



Şekil 2.14. Memeli hücrelerindeki otofajik yollar [149].

Makrotofaji: Makrotofaji, “otofaji” terimi ile eşanlamlı olarak kullanılan, en yaygın görülen ve bu nedenle de en iyi karakterize edilmiş otofaji çeşitidir [137, 150-152]. Makrotofaji sırasında ilk olarak degradasyonu gerçekleştirilecek sitoplazmik komponentlerin etrafında, izolasyon membranı ya da fagofor olarak adlandırılan bir zar yapısı oluşmaya başlar. Bu zar yapısının büyüyüp genişleyip iki ucunun birleşmesiyle, otofagozom olarak tanımlanan çift zarlı yapılar oluşmaktadır. Bu işlem sonrasında otofagozom, lizozomla kaynaşır ve izole edilen sitoplazmik komponentlerin lizozomal asit hidrolazlarca yıkıldığı otofagolizozom yapıları oluşturulur. Yıkım sonrası elde edilen makromoleküller, tekrar kullanım için membran permeazları tarafından sitozole geri taşınmaktadır [150, 153-156].

Makrotofaji (bundan sonra otofaji olarak ifade edilecektir), genel olarak seçici otofaji ve seçici olmayan otofaji olmak üzere sınıflandırılabilir. Seçici otofajide, otofaji reseptörleri olarak bilinen bazı spesifik proteinler, işlevsel olmayan organeller, yanlış

katlanmış/katlanmamış ve/veya ubiquitinasyona uğramış proteinler ve hücre içi patojenler gibi hedef kargoları tanır ve bunları otofagozomal membrana taşır. Seçici otofaji kargo içeriğine göre; mitofaji (mitokondri), retikulofaji (ER), ribofaji (ribozom), peksizofaji (peroksizom), lipofaji (lipit damlacıkları), lizofaji (lizozom), nükleofaji (nükleus parçaları), agregfaji (protein agregatları) ve ksenofaji (patojenler) gibi alt gruplara ayrılmaktadır. Açlık durumunda tetiklenen seçici olmayan otofaji ise, hedef bir kargo ve otofaji reseptörü olmaksızın, sitoplazmik materyallerin rastgele lizozomlarda degradasyonu ile yapı taşlarının hücre tarafından tekrar kullanılabilirliğini sağlamaktadır [136, 157-159].

Şaperon-Aracılı Otofaji: Lizozomlarda spesifik bir şaperon tarafından tanınan çözünen sitozolik proteinlerin, seçici olarak degradasyonunun sağlandığı lizozomal proteoliz yollarından biridir. Şaperon aracılı otofajinin hedef substratları, memeli proteomunun yaklaşık % 40'ını oluşturan KFERQ benzeri motif içeren sitoplazmik proteinler ve post-translasyonel modifikasyonlar sonrasında KFERQ benzeri motiflere sahip olan proteinlerdir. Yapısında KFERQ benzeri motif içeren sitoplazmik proteinler, Hsp40 (heat shock protein 40), Hsp90 (heat shock protein 90), CHIP (HSC70-interacting protein), HOP (HSP70–HSP90 organizing protein) gibi diğer şaperon proteinleri ile bir kompleks içinde bulunan sitozolik şaperon proteini HSPA8/HSC70 (heat shock cognate 71 KDa protein 8) tarafından tanınır ve lizozomlara iletilirler. Lizozom yüzeyinde bulunan bir lizozomal membran reseptör proteini olan monomerik LAMP2A (lysosome-associated membrane protein type 2A), HSPA8/HSC70-substrat protein kompleksi ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucu LAMP2A, substrat proteini lizozomal lümenine ileten bir translokasyon kanalı oluşturmak için oligomerize olur. Translokasyon öncesi substrat proteininin açılması HSPA8/HSC70 ve koşaperon proteinleri tarafından sağlanır. Substrat translokasyonun tamamlanmasıyla LAMP2A translokasyon kanalı, başka bir substrat proteinin translokasyonunu sağlamak üzere yeniden LAMP2A monomerlerine ayrılır. LAMP2A translokasyon kanalının bu dinamik oligomerize ve monomerize dönüşümlerine, lizozomal şaperonlar aracılık eder. Lizozomların içine ulaşan substrat proteinlerin degradasyonu gerçekleşir [136, 148, 156, 159-163].

Şaperon aracılı otofaji, temel olarak hasarlı proteinlerin degradasyonu ile hücre kalite kontrolünün sürdürülmesinde ve proteinlerin degradasyonu kaynaklı amino asitleri geri dönüştürerek hücre enerji homeostazının sürdürülmesinde görev almaktadır. Bunlara

ek olarak, karbonhidrat ve lipit metabolizması, transkripsiyonel regülasyon, immün cevap ve hücre döngüsü gibi birden fazla hücresel işlev için modülatör bir role sahiptir [160, 161, 163].

Mikrotofaji: Mayalarda daha ayrıntılı çalışılmasına karşın, memeli hücrelerinde mikrotofaji mekanizması, maya mikrotofajisi için esansiyel olan genlerin memelilerde korunmuş bir işlevinin bulunmaması ve çalışmaların çoğunlukla elektron mikroskopisi ile morfolojik analize dayanması sebebiyle kısmen belirsizdir. Genel olarak mikrotofaji, sitoplazmik materyallerin lizozom zarından doğrudan alınarak degradasyona uğratılmasıdır. Fare ve sıçanlarla yapılan elektron mikroskobu çalışmaları sonucunda lizozomal çıkıntı yoluyla mikrotofaji, lizozomal çökme yoluyla mikrotofaji ve endozomal mikrotofaji olmak üzere 3 tip mikrotofaji olduğu belirtilmektedir. Memelilerde lizozomal çıkıntı yoluyla mikrotofaji süreci tam olarak bilinmemektedir. Lizozomal çökme yoluyla mikrotofaji ve endozomal mikrotofajide degradasyona uğratılacak sitoplazmik kargonun teslim sürecinin altında yatan moleküler mekanizma büyük ölçüde belirsizliğini korumakla birlikte, ESCRT (endosomal-sorting complexes required for transport) sistemlerinin endozomal mikrotofaji için kritik olduğu, ancak mikrotofaji için kritik olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda endozomal mikrotofajinin HSC70 tarafından tanınan KFERQ motifi içeren proteinleri seçici olarak bozabildiği, şaperon aracılı otofajiden farklı olarak, endozomal mikrotofajide lizozom veya endozom iletimi için ESCRT sistemlerine ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir. Mikrotofaji çalışması için mevcut sınırlı sayıda yöntem nedeniyle, memelilerde mikrotofajinin moleküler mekanizması, regülasyonu ve insan sağlığı ve hastalıklarındaki olası rolü hakkında bilgimiz sınırlıdır [149, 156, 164-169].

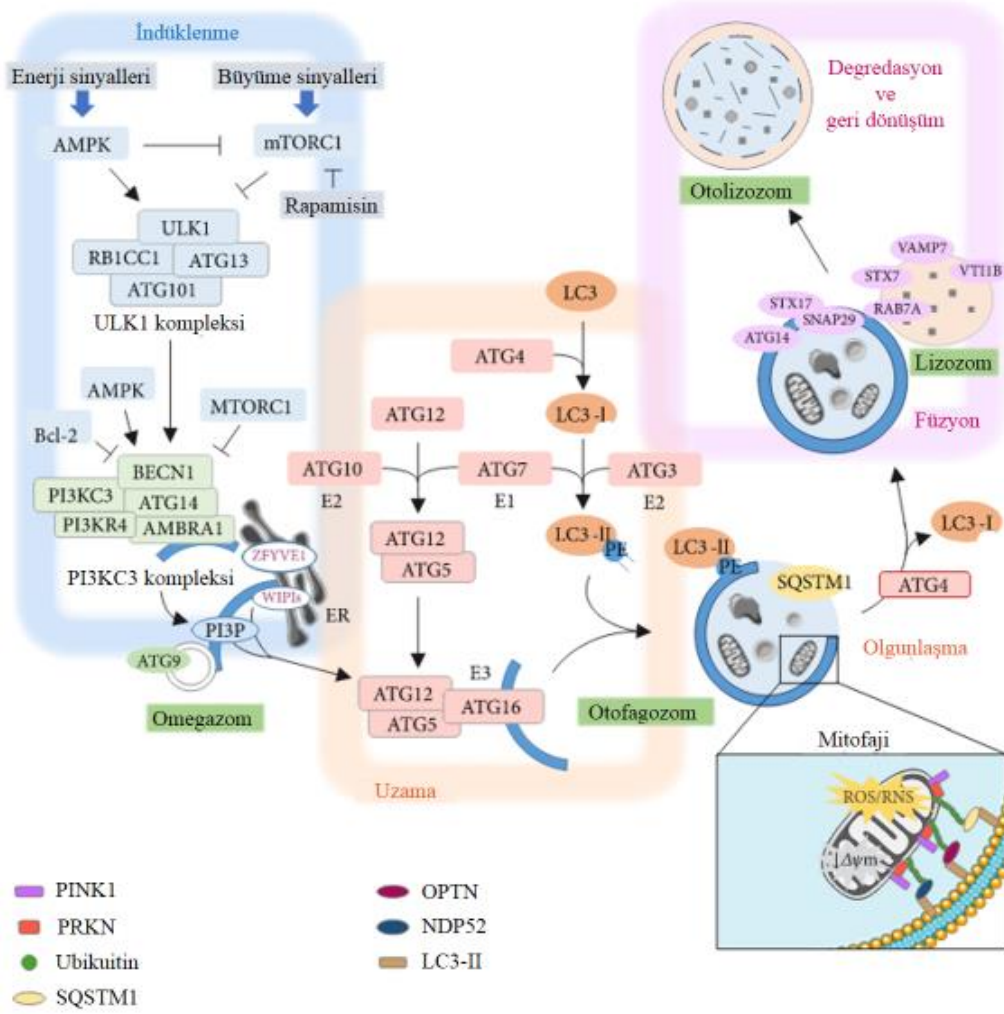
2.4.1.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofaji, temel olarak; indüklenme, fagoforun çekirdeklenmesi, fagoforun uzaması ve otofagozom yapısının oluşturularak otofagozom içinde olgunlaşma, lizozom ile füzyon ve bozunma/makromoleküllerin geri dönüşüm akışı olmak üzere farklı aşamalara ayrılabilir. Bu adımlar, bir grup otofaji ilişkili gen (ATG- autophagy-related genes) tarafından kodlanan proteinler tarafından gerçekleştirilir. Maya mutantlarının taranmasıyla 30'dan fazla ATG bulunmuş ve yüksek ökaryotlarda birçok ATG geni

ortoloğu belirlenmiştir. Memeli ATG proteinleri ve otofaji ilişkili diğer proteinler, işlevlerine göre kategorilere ayrılır:

- ULK1 kinaz (uncoordinated-51-like kinase 1) kompleksi (ULK1/2, ATG13, ATG101 ve FIP200/ RB1CC1 (RB1-inducible coiled- coil protein 1)),
- PI3KC3 (class III phosphatidylinositol- 3-phosphate kinase) kompleksi (PIK3C3/Vps34 (vacuolar protein sorting 34), BECN1 (Beclin 1), Vps15/PIK3R4 (phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4), ATG14L, AMBRA1 (autophagy and beclin 1 regulator 1) ve UVRAG (UV radiation resistance associated)),
- Membran uzama kompleksi (ATG9, WIPIs (WD repeat domain phosphoinositide-interacting proteins), DFPC1 (zinc- finger FYVE domain- containing protein 1)),
- ATG12 (ATG12-ATG5-ATG16L1) ve LC3 (LC3/GABARAP (the microtubule-associated protein 1 light chain 3/the GABA type A receptor- associated protein)) ubiquitin-benzeri konjügasyon sistemleri,
- Seçici otofajide otofaji kargo reseptör proteinleri,
- Lizozom ile füzyon ilişkili proteinler (RAB GTPaz'lar (RAS-related GTP-binding protein GTPases), SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), HOPS (the class C Vps/homotypic fusion and vacuolar protein sorting) kompleksi ve ESCRT (the endosomal sorting complexes required for transport) ailesi üyesi proteinler),
- Lizozomal degradasyon ve makromoleküllerin geri dönüşüm akışı ile ilgili bileşenler.

Otofajinin temel mekanizması evrimsel olarak korunmuş olmakla birlikte, memeli otofajisine ilişkin gözlemlerin farklı hücre tiplerinden elde edildiği ve düzenlenmesinde, hücre tiplerinde farklılıkların olabileceğini göz önünde bulundurmak gerekmektedir [140, 146, 156, 160, 170-172].

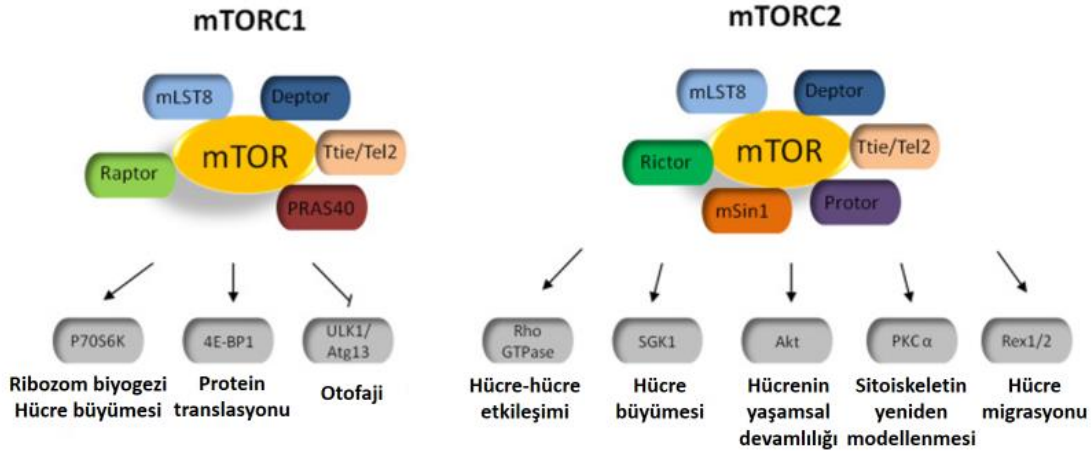


Şekil 2.15. Otofaji sürecine genel bakış [173].

Otofajik sürecin indüklenmesini sağlayan sinyaller tipik olarak; açlık, hipoksi, büyüme faktörleri, hücresel düşük enerji durumu, oksidatif stres, protein agregasyonu, ER stresi, intraselüler patojenler gibi çeşitli stres koşullarından kaynaklanmaktadır. Otofaji indüksiyonu ve fagoforun çekirdeklenmesi sinyal yolları ile düzenlenir. Otofajinin ana düzenleyicisi olarak tanımlanan mTOR (mammalian target of rapamycin) ve AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) bu sinyal yollarının başında gelmektedir.[146, 156, 171, 174, 175].

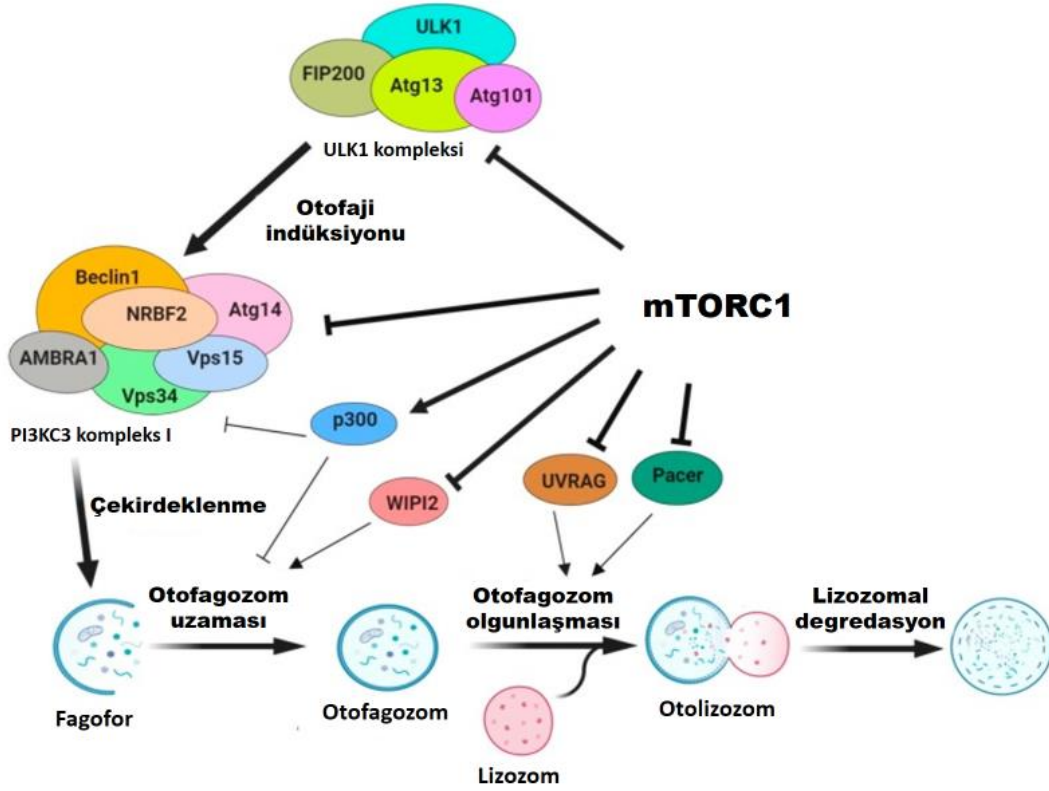
PI3K ile ilişkili kinaz ailesine ait bir serin/treonin kinaz olan mTOR çok sayıda yardımcı protein ile bağlanarak, mTORC1 (mTOR kompleksi 1) ve mTORC2 (mTOR kompleksi 2) olmak üzere, farklı bileşim ve fonksiyona sahip iki sinyal kompleksi oluşturur. Bu iki kompleksin en ayırt edici özelliği, adaptör proteinlerinin bağlanmasıdır. mLST8/GL

(mammalian lethal with SEC13 protein 8)/G protein beta subunit-like), DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) ve Tti1/Tel2 (Tel2 interacting protein 1/telomere maintenance 2) kompleksi, hem mTORC1 hem de mTORC2'de bulunur. Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) ve PRAS40 (proline-rich Akt1 substrate of 40 kDa) mTORC1'e özgüken; RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian ortholog of SAPK interacting protein 1), ve PROCTOR1/2 (protein observed with Rictor 1 and 2) mTORC2'ye özgüdür. mTORC1 ve mTORC2, spesifik substrat tercihlerine sahip olmaları sebebiyle, hücresel fonksiyonu modüle etmek için farklı sinyal yollarını kullanmaktadırlar. Ancak bu iki kinaz kompleksinin farklı substratları olmasına rağmen, kompleksler tarafından ortaya çıkarılan sinyal iletimi, aynı zamanda birbirlerini düzenlemelerine de izin vermektedir [175, 176].



Şekil 2.16. mTOR komplekslerinin yapısı ve sinyal yolları [177].

Bazal koşullarda, küçük GTP-bağlayıcı protein olan GTP yüklü Rheb (ras homolog enriched in brain), mTORC1'in katalitik alanı ile etkileşerek mTORC1'i aktif hale getirir. Aktif hale gelen mTORC1, hücre büyümesi, lipid, protein ve nükleotit sentezi gibi çeşitli anabolik süreçleri indüklerken, otofaji de dahil olmak üzere katabolik süreçlerin çoğunu ortadan kaldırır. Otofaji inhibisyonu temel olarak, otofaji yolağının ilk kompleksi olan ULK1/2 kompleksi üzerinde gerçekleştirilen fosforilasyon ile sağlanmakla birlikte, aktif mTORC1 tarafından otofajinin diğer aşamaları da düzenlenmektedir [174, 175, 178, 179].



Şekil 2.17. mTORC1 aracılığıyla otofaji regülasyonu [175].

Açlık durumunda, Rheb'e yönelik bir GTPaz aktive edici protein (GAP) görevi gören TSC1/2 (tuberous sclerosis complex1/2), Rheb'e bağlı GTP'nin hidrolizini teşvik ederek Rheb'i, GDP-bağlı inaktif forma dönüştürerek mTORC1'in inaktivasyonunu sağlar. mTORC1'in inaktivasyonu, otofagozom biyogenezinin aktivasyonuna neden olarak otofajinin indüklenmesine neden olmaktadır. mTORC1 inaktivasyonu ayrıca, lizozomal ve otofaji gen ekspresyonunun ana düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörü TFEB'nin (transcription factor EB) defosforilasyonunu sağlar. Defosforile TFEB çekirdeğe yerleşerek; UVRAG, WIPI, LC3B ve p62 gibi ATG genlerinin transkripsiyonunu indükler ve hücredeki lizozomal fonksiyonunun artışı sağlar [174, 176, 178].

Evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş bir serin/treonin protein kinaz olan AMPK memeli hücrelerinde, katalitik α alt birimi ve düzenleyici β ve γ alt birimleri tarafından oluşturulan bir heterotrimerik kompleks olarak bulunmaktadır. Katalitik α alt biriminin N-terminal bölgesindeki serin/treonin kinaz domaininde bulunan Thr172 residusu, AMPK aktivasyonunun hızlı bir şekilde LKB1 (liver kinase B1), CAMKK2 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2) ve TAK1/MAP3K7

(transforming growth factor beta-activated kinase 1/mitogen-activated protein kinase 7) gibi farklı kinazlar tarafından sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. AMPK aktivitesinin fosforilasyonla doğrudan düzenlenmesinin yanı sıra γ alt birimi, AMPK'nın AMP/ATP veya ADP/ATP seviyelerindeki değişikliklere yanıt vermesini sağlayan bir sensör görevi görür. Ayrıca, tek başına AMP; üç farklı mekanizma yoluyla doğrudan AMPK aktivitesini modüle edebilir;

- Thr172 ilişkili kinazlara etki ederek Thr172'nin fosforilasyonunu uyarabilir,
- Allosterik modülasyon sayesinde, AMPK'nın Thr172 ilişkili kinazlar için daha çekici bir substrat olmasını sağlayabilir,
- Thr172 defosforilasyonunu fosfataz aktivitesinden koruyarak engelleyebilir veya Thr172 fosforile edildikten sonra allosterik bir şekilde AMPK aktivitesini artırabilir.

Düşük enerji koşullarında aktivasyonu sağlanan AMPK, anabolik süreçleri inhibe edip otofaji gibi katabolik süreçleri indükleyerek hücrel homeostazın korunmasını sağlamaktadır. AMPK ile mTORC1 aktiviteleri antogonistiktir ve birlikte hareket ederek, birçok sinyal yolağı ile birlikte otofaji regülasyonunda rol oynarlar. AMPK'nın aktivasyonu doğrudan ve dolaylı olarak otofagozom oluşumunu aktive etmektedir. AMPK, mTORC1, TSC1/2, ULK1/2 kompleksi, otofagozom uzamasında rol oynayan ATG9 ve PI3KC3 kompleksi elemanlarından olan Vps34 fosforilasyonu ile otofaji aktivasyonunda rol oynamaktadır [174, 180, 181].

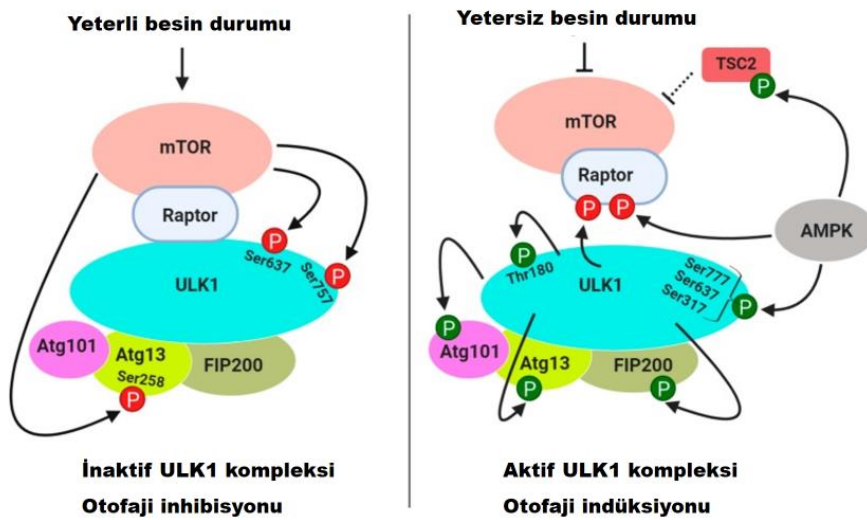
Otofaji yolağının ilk kompleksi olan ULK1 kompleksinin (ULK1/2, ATG13, ATG101 ve FIP200/ RB1CC1) aktivasyonu temel olarak, otofajinin indüklenmesi için kritik öneme sahiptir. Bazal koşullar altında, aktive edilmiş mTORC1, RAPTOR yoluyla ULK1 kompleksi ile etkileşime girer ve ULK1/2'nin ve Atg13 alt biriminin çeşitli bölgelerini fosforile eder. mTORC1 ayrıca PI3KC3 kompleksi elemanlarından olan AMBRA1'i fosforile ederek, AMBRA1'in dinein motor kompleksine sabitlenmesini sağlar. Böylece otofaji yolağı inaktif durumda tutulur.

Stres koşulları altında ise inaktif durumdaki mTORC1, ULK1'den ayrılır ve ULK1 kompleksinin mTORC1 tarafından gerçekleştirilen ULK1/2 ve Atg13'ün fosforilasyonu, fosfatazlar tarafından giderilir. ULK1/2'nin defosforilasyonu, PP2A (protein phosphatase 2A) ve PPM1D (protein phosphatase 1D magnesium-dependent delta isoform) tarafından

gerçekleştirilirken, Atg13'ün defosforilasyonu, Ptc2 ve Ptc3 (PP2C (protein phosphatase 2C) phosphatases) ile gerçekleştirilmektedir. ULK1/2 ve Atg13'ün deosforilasyonu, ULK1/2'nin kinaz fonksiyonunun aktivasyonuna yol açar. Aktif ULK1/2; Atg13'ü, FIP200/RB1CC1'i ve kendisini fosforile ederek, otofajik sürecin sonraki aşamalarının ilerlemesine izin verir. Aktif ULK1 kompleksi daha sonra otofajinin başlatıldığı ER'deki izolasyon membranına taşınır. İlaveten, mTORC1 inaktivasyonu ile defosforile olup, aktif duruma gelen AMBRA1; hem ULK1/2 hem de E3 ligaz TRAF6 (tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6) ile doğrudan etkileşim aracılığıyla ULK1/2'nin Lys63-bağlı ubikütinasyonunu teşvik ederek; kendi kendine bir araya gelme, stabilizasyon, ULK1/2'nin kinaz aktivitesinin artırılması ve otofajinin başlatılmasında rol oynamaktadır [170, 174, 175, 182].

Otofaji regülasyonunun bir diğer ana düzenleyicisi olan AMPK, ULK1 aracılı otofajiyi üç yol aracılığı ile uyarır:

- TSC2'yi fosforile edip, aktivitesini arttırarak, mTORC1'in inhibisyonunu sağlar.
- Raptor fosforilasyonu ile mTORC1 aktivitesini doğrudan inhibe edebilir.
- Doğrudan ULK1/2 fosforilasyonu ile ULK1 kompleksinin aktivasyonunu sağlar [174].



Şekil 2.18. ULK1 kompleksinin mTORC1 ve AMPK tarafından regülasyonu[175] .

Otofajinin indüklenmesi, ULK1 kompleksinin protein kinaz aktivitesini gerektirirken, fagoforun çekirdeklenmesi için, PI3KC3 kompleksinin lipid kinaz aktivitesine ihtiyaç

duyulmaktadır. Otofagozom biyogenezinde PI3KC3 kompleks I ve PI3KC3 kompleks II olmak üzere iki farklı PI3KC3 kompleksi rol oynar. Otofagozom oluşumunun başlangıcında rol oynayan PI3KC3 kompleks I; BECN1, ATG14L, Vps15 ve Vps34 bileşenlerinden oluşur. PI3KC3 kompleks II ise ATG14L yerine UVRAG içermekle birlikte diğer bileşenleri PI3KC3 kompleks I ile aynıdır ve otofagozom olgunlaşması ve endozomal trafikte rol oynar.

Bazal koşullar altında dinein motor kompleksine sabitlenen AMBRA1, BECN1 aracılığıyla PI3KC3 kompleks I'e bağlanarak, PI3KC3 kompleks I'in hücre iskeletine tutunmasını sağlar. Ayrıca BCL2 (B-cell lymphoma 2), BECN1'in alt domainine bağlanarak otofajiyi doğrudan inhibe eder.

Yapısal olarak PI3KC3 kompleks I, BECN1/ATG14L ve Vps15/Vps34 olmak üzere çiftler halinde stabilize edilir. Stres koşullarında ULK1 kompleksinin aktivasyonu; AMBRA1, BECN1 ve ATG14L'nin fosforilasyonuna neden olur. BCL2'den ayrılan BECN1, adaptör ATG14L aracılığıyla kompleksteki yerini alır ve Vps15 komplekste proteinleri organize ederek Vps34'ün aktivitesini gösterebileceği şekilde düzenler. AMBRA1'in fosforilasyonu, PI3KC3 kompleks I'in hücre iskeletinden ayrılarak ER'nin alt domainine translokasyonunu sağlar. Bu alt ER domaininde PI3KC3 kompleks I elemanlarından Vps34'ün, PI3P üretmek için fosfatidilinositolü fosforile etmesiyle PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) üretimi sağlanarak, otofagozom çekirdeklenmesi sağlanır [137, 170, 171, 174, 175, 183-191].

mTOR, AMPK, ULK1/2 ve BECN1; birçok durumda otofajinin düzenlenmesi ve indüklenmesinde önemli roller oynamaktadır. Ancak unutulmamalıdır ki, otofajinin gerçekleşebilmesi için otofaji yolunun tüm bileşenlerinin her zaman gerekli olmadığını gösteren artan sayıda çalışma bulunmaktadır [192].

Bazal koşullarda, ER'de çok az PI3P bulunur. Ancak otofajinin indüklendiği stres koşullarında, bu yüklü sinyal lipidinin üretimi sonucu ER alt domaini, lokal olarak PI3P ile zenginleştirilmektedir. Yunan harfi omega'ya (Ω) benzemesi sebebiyle omegazom olarak adlandırılan bu yapı, otofagozom biyogenezile ilişkili membran düzenlemelerini en ileri noktaya taşıyacak olan efektörlerin, yapıya katılmasını sağlayan bir sinyal gibi davranmaktadır.

PI3P'ye katılan ilk efektörlerden biri, PI3P'yi iki FYVE (Fab1, YotB, Vac1p, and EEA1) domaini aracılığıyla bağlayan DFCP1 (double FYVE domain-containing protein 1)'dir. DFCP1; ER, mitokondri ve golgi üzerinde dağınık bir düzene sahiptir. Ancak, PI3P yapısının iki FYVE domaini aracılığıyla tanınmasıyla hızla PI3P noktalarına hareket ederler. Yaygın olarak omegasomlar ve fagofor çekirdeklenmesi için bir belirteç olarak kullanılmalarına rağmen, DFCP1 tükenmesinin otofajik akışta bir etkisi olmaması sebebiyle, otofagozom biyogenezinin ilk aşamalarındaki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir.

Gelişen omegasom, izolasyon membranı veya fagofor adı verilen çift membranlı yapının uzamasına yol açar. Fagoforun çekirdeklenmesi, PI3P'ye bağlanan bir diğer efektör olan PROPPIN (-propellers that bind phosphoinositides) ailesinin üyelerinden WIPI (WD-repeat domain phosphoinositide-interacting proteins)'ların yapıya katılmasını gerektirmektedir. WIPI'lar, PI3P sinyalinin tanınması ve otofagozom yapısının oluşumu için diğer ATG ilişkili proteinlerin toplanmasını sağlamaktadır. WIPI1 ve WIPI2b, omegasomlara alındığı ve fagofor oluşturduğu gösterilen ilk iki WIPI'dir. WIPI1, fagofor oluşumunu izlemek için en sık kullanılan iki PI3P efektöründen biridir. Fonksiyonu tam olarak anlaşılmasa da, WIPI2b'nin öncesinde omegasomlara alındığı gösterilmiştir. WIPI2b otofajinin pozitif bir regülatörüdür ve otofagozom oluşumu için gereklidir. ATG16L1 ile doğrudan etkileşime girer ve bu etkileşim otofajik akış için gereklidir. WIPI3 ve WIPI4, PI3P'ye bağlanarak, otofagozom biyogenezine katkıda bulunan diğer WIPI'lardır. Eksikliklerinin, büyük ve kapatılmamış otofagozomların birikmesine neden olduğu gösterilmiştir [174, 185, 193-197].

Fagofor yapısının çekirdeklenmesi ve uzaması aşamasında eş zamanlı olarak ATG9 proteini görev almaktadır. Golgide bulunan ATG9, ATG proteinleri arasındaki tek transmembran proteinidir ve sitoplazma içindeki ER, mitokondri, golgi, plasma membranı, endosom gibi çeşitli zar kaynaklarından taşınmış olduğu protein ve lipidlerle otofagozom yapısının oluşturulmasında rol almaktadır. ATG9 trafiği, büyük ölçüde ULK1 kinaza bağlıdır ve ULK1 tarafından ATG9 fosforilasyonu, ATG9 dinamiklerini düzenler. Memeli hücrelerinde ULK1 yokluğu, golgi kompleksinden ATG9 trafiğinin inhibisyonuna yol açar. Ayrıca WIPI2 ve WIPI4 proteinleri, ATG9 trafiğinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. WIPI2'nin yokluğu, ATG9'un golgi kompleksine alınmasını engeller ve ATG9'un omegasomlar üzerinde birikmesine neden olur. WIPI4

ise, ATG9 dinamiklerinin potansiyel bir regülatörü olarak görev almaktadır [185, 193, 194, 198, 199].

Her ne kadar otofajinin daha önce var olan bir başlatma zarında çekirdeklendiği ve daha sonra fagofora diğer hücresel bölmelerden membranların taşınarak otofagozomun gelişiminin sağlandığı yaygın bir görüş olsa da fagoforun çekirdeklenmesi ve uzaması için gerekli olan zarların kaynağı tam olarak bilinmemektedir. Otofagozom oluşumu için membran alımı süreci hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, hücredeki birçok organelin fagofor uzamasına ve otofagozomun tamamlanmasına farklı şekillerde katkıda bulunmaktadır [200].

Fagofor yapısının uzamasında LC3/GABARAP ve ATG12 olmak üzere iki ubikuitin benzeri konjügasyon sistemi gereklidir. LC3 ve ATG12, ubikuitin benzeri proteinleridir. ATG12, art arda ubikuitin-aktive edici enzim (E1)- benzeri enzim ATG7 ve ubikuitin-konjüğe enzim (E2)-benzeri enzim ATG10 tarafından aktive edilir, daha sonra fagofor üzerinde ATG12–ATG5–ATG16L1 kompleksi oluşturmak için ATG5'e konjüğe edilir. Yapılan son çalışmalar, WIPI ailesinin konjügasyon sisteminin montajında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. ATG12–ATG5–ATG16L1 kompleksi, LC3 konjügasyonu ile PI3P'yi otofagozom oluşum yerinde bağlayabilmek için WIPI2b'ye ihtiyaç duymaktadır. Konjügasyona başlamadan önce LC3 öncüsü, C-terminal glisini ortaya çıkarmak için sistein proteaz ATG4 tarafından yarılmalıdır. Sitosolik LC3-I olarak isimlendirilen bu ürün daha sonra, E1-benzeri enzim ATG7 ve E2-benzeri enzim ATG3 tarafından aktive edilerek, membran-ilişkili LC3-PE (LC3-II) elde edilecek şekilde fosfatidiletanolamine (PE) konjüğe edilir. ATG12 konjügasyonundan farklı olarak, ATG3 konjügasyonundaki son aşama, bir ubikitin ligaz enzimi (E3)-ligaz olan ATG12–ATG5–ATG16L1 kompleksine ihtiyaç duymaktadır. Çalışmalar, ATG12'nin sadece izolasyon membranı üzerinde lokalize olduğunu gösterirken, LC3'ün lipitlenmiş formu olan LC3-II'nin, otofagozomal membran üzerinde tüm otofagozom oluşumu ve lizozomlarla bağlanma/kaynaştırma işlemi boyunca bulunduğunu göstermektedir [137, 185, 197].

Yakın zamana kadar, hem LC3 hem de GABARAP proteinlerinin otofagozom oluşumu için gerekli olmakla birlikte, farklı aşamalarda rol aldığı gösterilmiştir. GABARAP proteinlerinin otofajideki rolü LC3'e göre daha az anlaşılmıştır. Ancak yapılan

araştırmalarda, GABARAP'ın açlık sırasında otofagozom oluşunu için çok önemli bir protein olabileceği, seçici otofaji türleri için ise LC3'n gerekli olduğu gösterilmiştir [201].

Seçici otofajide hücreler, spesifik kargoları otofagozomlara dahil edebilen otofaji reseptörlerini kullanırlar. Otofaji reseptörleri temel olarak; LIR (LC3-interacting region) motifleri aracılığıyla LC3 sınıfı proteinlerle etkileşen otofaji reseptörleri, UBD domainleri (ubiquitin-binding domains) aracılığıyla ubikuitinlenmiş kargoları otofagozomlara taşıyan otofaji reseptörleri ve ubikuitin-bağımsız etki domainleri aracılığıyla kargoları otofagozomlara taşıyan otofaji reseptörleri olmak üzere sınıflandırılabilir.

Çoğu reseptör otofaji kargolarının, yapısında LC3 sınıfı proteinleri bulunduran otofagozomlarla etkileşimlerini sağlayan, evrimsel olarak korunmuş bir LIR motifi bulundurmaktadır. Bu otofaji reseptörlerine örnek olarak; p62, NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1), OPTN (optineurin), CALCOCO2/NDP52 (calcium-binding and coiled-coil domain 2), CALCOCO2/NDP52'nin yakın homoloğu TAX1BP1 (Tax1-binding protein 1), BNIP3 (BCL2 interacting protein 3), BNIP3L/NIX (BCL2 interacting protein 3-like) verilebilir.

Birçok otofaji reseptörü sahip olduğu UBD domainleri aracılığıyla, ubikuitinlenmiş kargoları otofagozomlara taşıyabilir. Örneğin, OPTN ve NDP52, mitofaji adı verilen bir süreçte ubikuitinlenmiş mitokondrilerin otofagozomlara taşınmasını sağlamaktadır. Benzer şekilde; p62, NDP52, TAX1BP1 ve OPTN ksenofaji sırasında ubikuitine hücre içi patojenlerle etkileşime girer.

Otofaji reseptörleri, kargoların doğrudan kendileriyle etkileşime girerek, kargoları ubikuitinden bağımsız bir şekilde tanıyabilirler. Örneğin NDP52, hasarlı veziküllerin lmenlerindeki glikanlara bağlanan hücre içi lektin, galektin 8 ile doğrudan etkileşime girerek, hasarlı vezikülleri otofagozomlara iletebilir. NCOA4 (nuclear receptor coactivator 4), lizozomlardaki ferritini parçalamak için demir şelatlayıcı protein ferritin ile doğrudan etkileşime girer.

Otofaji reseptörleri, aşırı veya yetersiz aktivitelerini önlemek için oligomerizasyon ve posttranslasyonel modifikasyonlarla sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Örneğin, p62'nin oligomerizasyonu, LIR motifi ve LC3 arasındaki düşük afiniteli etkileşimleri stabilize etmek için önemlidir. Benzer şekilde, protein agregatları gibi hacimli kargolar üzerinde yüksek ubikuitin konsantrasyonları, ubikitin ve UBD'ler arasındaki düşük afinite etkileşimlerinin stabilize edilmesine yardımcı olarak, ubikuitinlenmiş kargolara otofaji reseptör alımını teşvik edebilir. Otofaji reseptörleri ayrıca UBD'leri fosforile ederek, reseptörlerin ubikuitinlenmiş yüklere bağlanmasını hızlandırır. Ayrıca, LIR domaininin LC3'e bağlanması da fosforilasyon ile düzenlenebilmektedir [156, 157, 159].

Otofagozom biyogenezi ve kargonun otofagozom içine alınımının tamamlanması sonrasında, uzayan otofagozom çift zarının füzyonu ile iç ve dış membranları ayrılmış, olgun otofagozom yapısı oluşur. LC3 homologları hariç, tüm ATG proteinleri bir sonraki otofaji yolağında kullanılmak üzere, otofagozomun tamamlanmasından önce veya hemen sonrasında zarı ayrılmaktadır. Olgun otofagozomlar, rastgele başlangıç bölgelerinden endozomlar veya lizozomlarla kaynaştığı perinükleer bölgeye, LC3 ile etkileşen proteinler aracılığıyla mikrotübüller boyunca aktif olarak taşınmaktadır.

Otofagozom-lizozom füzyonunun kesin mekanizması hala tam olarak anlaşılmamakla birlikte; RAB GTPaz'ların, membran bağlayıcı komplekslerin ve SNARE proteinlerinin bu süreçte görev aldığı bilinmektedir. RAB GTPaz'lar; kargo adaptörleri, motor proteinleri gibi spesifik efektör proteinleri yeni oluşturulan taşıyıcı veziküllere alarak, veziküllerin hedef zarlarına hareket etmesini sağlar ve hedefine ulaştığında veziküllerin kargoları bırakmasına yardımcı olacak şekilde bağlar. Rab7, otofagozom-lizozom füzyonunda önemli rol oynamaktadır. Membran bağlayıcı kompleksler, karşıt membranlar ile köprü oluşturarak ve/veya SNARE kompleks oluşumunu uyararak, kenetlenme ve füzyon işlemlerini kolaylaştırırlar. HOPS kompleksi, VPS33A, VPS16, VPS11, VPS18, VPS39 ve VPS41 olmak üzere altı alt birim içerir. HOPS kompleksinin yanında, PLEKHM1 (pleckstrin homology and RUN domain containing M1) ve EPG5 (ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog) proteinleri de SNARE proteinlerinin toplanmasını stabilize ederek kolaylaştırmaktadır. SNARE'ler, son derece enerjisel olarak uygun bir kompleks oluşturmak için birbirleriyle etkileşime girebilen, zıt membran bölgeleri üzerinde lokalize edilmiş, zara bağlı proteinlerdir. Membran füzyonunu sürdürebilmek için, SNARE'lerin verici membran üzerinde bir R-SNARE ve alıcı zar

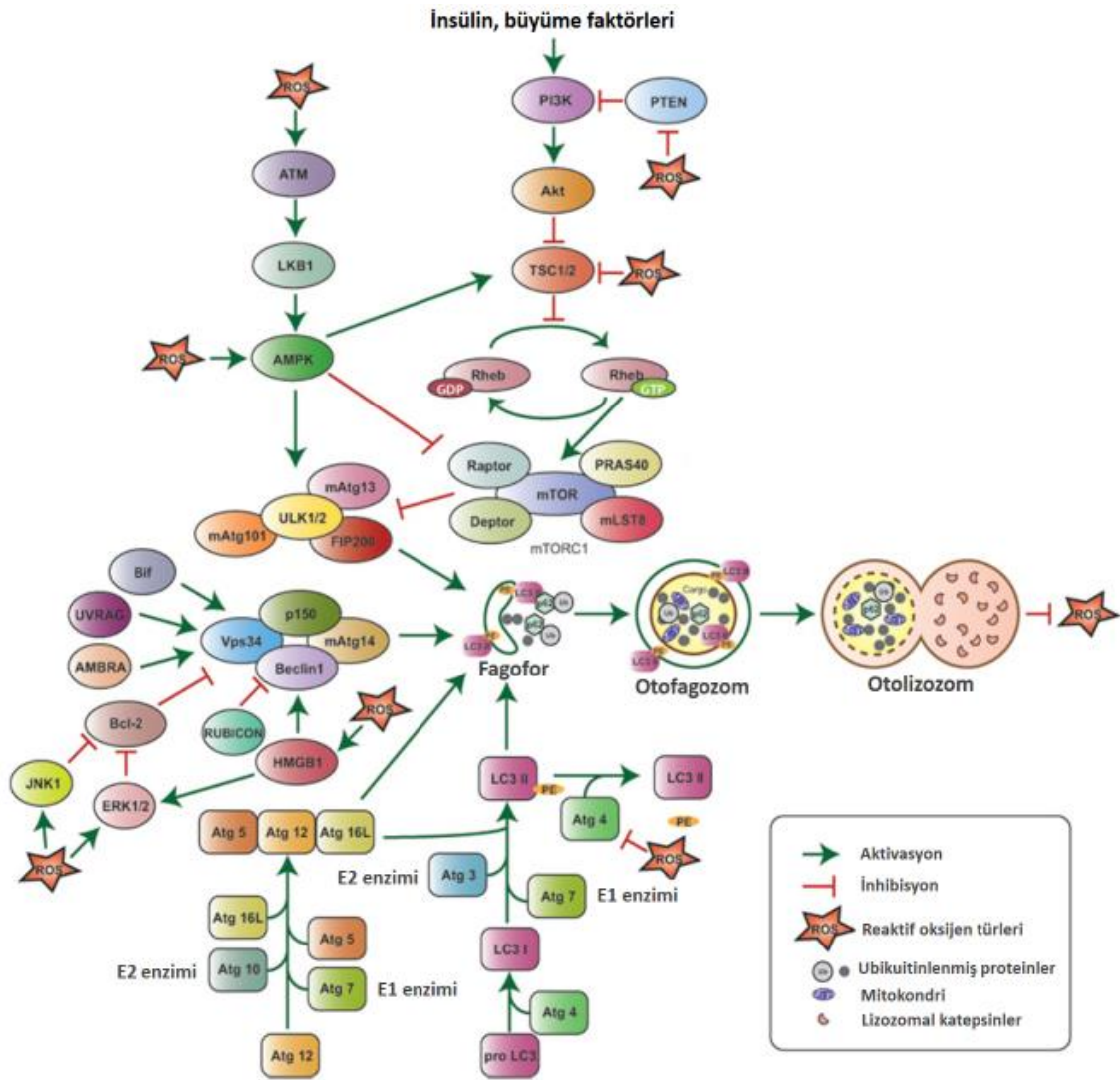
besin eksikliği gibi stres durumlarında ROS'un aşırı salınmasına cevap olarak otofaji yolağı hızlı bir şekilde aktive edilebilmektedir [60, 208].

Otofaji, doğrudan ya da dolaylı olarak ROS tarafından modüle edilmektedir. Bu modülasyonda otofaji ilişki sinyal yolları ve proteinler görev alır. ROS, PI3K/Akt (Akt serine/threonine kinase 1)/mTORC1 sinyal yolağını, üzerinde hala çalışılan çoklu mekanizmalar yoluyla hem etkinleştirmekte hem de baskılamaktadır. ROS tarafından PI3K/Akt/mTORC1 yolağının baskılanması, otofaji aktivasyonuna neden olur. Tersine H₂O₂'nin, PTEN'in (phosphatase and tensin homolog) spesifik bir kısmının oksidasyonuna neden olarak fosfataz aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe ettiği ve böylece PI3K/Akt yolunu aktive eden bir disülfür bağı oluşturarak otofaji inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler ışığında ROS üretiminin, otofaji yolağını kontrol eden üst sinyal yollarında büyük ölçüde farklı etkilere yol açabileceği görülmektedir [24, 25].

ROS, AMPK'yı çoklu mekanizmalar yoluyla aktive ederek mTORC1 baskılanması ve otofaji aktivasyonunda rol oynamaktadır. AMPK'nın, doğrudan ROS tarafından oksidasyonu aracılığıyla aktivasyonu, otofajiyi indükler. Ayrıca ROS dolaylı olarak, mTORC1 kompleksinin inhibisyonu ve LKB1 (liver kinase B1)-AMPK yolunu aktive eden ATM (ataxia telangiectasia mutated) aktivasyonu ile otofajiyi indükler. İlâveten, TSC1/TSC2'nin doğrudan ROS tarafından okside edilerek otofaji inhibisyonunda rol alabileceği ileri sürülmektedir [24, 25, 209].

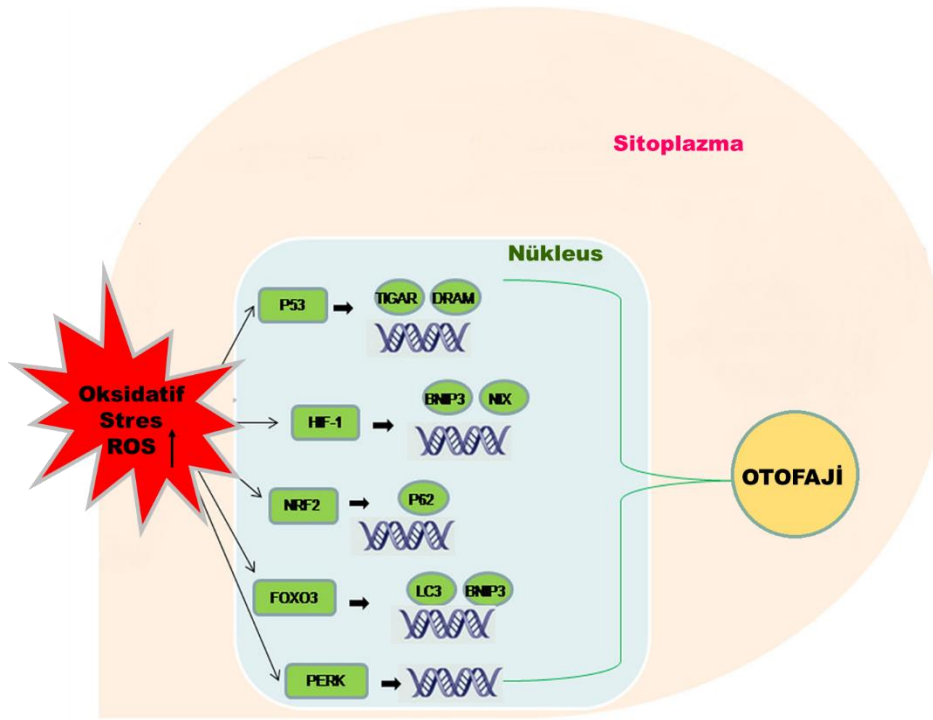
ULK1 kompleksi, ROS tarafından dolaylı olarak çoklu mekanizmalar yoluyla regüle edilmektedir. ROS'un; sitokinler, travma, hücre ölümü ve otofajiye yanıt olarak hücre dışı salınan bir nükleer protein olan HMGB1'i (high mobility group box 1) oksitlediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. HMGB1'in oksidasyonu, çekirdekten sitoplazmaya translokasyonunu tetikler ve burada BECN1 ile etkileşerek BECN1/BCL2 arasındaki etkileşimi değiştirerek otofajiyi indükler. Ayrıca HMGB1, BECN1/BCL2 etkileşimini bozarak ve ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2) etkinliğini artırarak otofajiyi teşvik eder. İlâveten, JNK1 (c-Jun N terminal protein kinase 1) tarafından BCL2 içerisindeki çoklu residuların fosforilasyonu benzer şekilde BECN1/BCL2 etkileşimini bozarak otofaji aktivasyonunu sağlamaktadır [24, 25, 210, 211].

ATG4, otofagozom maturasyonunda LC3-PE (LC3-II)'nin konjugasyonu ve otofagozom-lizozom füzyonundan sonra LC3-II'nin delipidasyonuna ve geri dönüşümüne katkıda bulunmaktadır. ROS, ATG4'ün oksidasyonuna neden olarak proteaz aktivitesinin inhibe edilmesine, LC3-II'nin delipidasyonunun önlenmesine ve böylece otofagozom oluşumunun artmasına neden olarak otofaji aktivasyonunu sağlamaktadır. ATG4'ün rol aldığı ilk basamak olan LC3-PE (LC3-II)'nin konjugasyonu yoluyla otofagozom maturasyonunun ROS üretiminin erken aşamalarından etkilenmediği, ancak biriken ROS oksidasyonunun ATG4'ün tamamen inhibisyonuna neden olabileceği ve otofagozomun başlatılması/uzama aşamalarında yer alan diğer enzimlerin ve proteinlerin de redoks sinyali ile düzenlenebileceği önerilmiştir [25, 60, 212-214].



Şekil 2.20. ROS'un aracılık ettiği otofaji regülasyonu [24].

ROS'un otofaji regülasyonu, oldukça karmaşık moleküler sinyal yolları ile nükleusta transkripsiyonel, sitoplazmada ise posttranskripsiyonel olarak kontrol edilmektedir. Artan ROS üretimi, nükleusta HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), p53 (transformation-related protein 53), FOXO3 (forkhead box O3) ve Nrf2'nin aktivasyonuna neden olur. Bu transkripsiyon faktörleri daha sonra sırasıyla BNIP3 (BCL2 interacting protein 3) ve NIX (pro-apoptotic gene); TIGAR (TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase), DRAM (DNA damage regulated autophagy modulator); LC3 ve BNIP3 ve p62'nin transkripsiyonunu indükler. Oluşan protein ürünleri, sitoplazmada posttranskripsiyonel regülasyon ile otofaji modülasyonunu sağlamaktadır. İlaveten ER stres sensörü olarak görev yapan PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), otofaji genlerinin ekspresyonunu indükleyerek otofajik akışın aktivasyonunda rol oynamaktadır [26, 27, 208].



Şekil 2.21. Otofajinin ROS tarafından transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel regülasyonu [26, 27].

TIGAR ve DRAM, p53 ile transkripsiyonel olarak aktive edilebilmektedir. TIGAR, glikolitik yolu modüle eder ve heksokinaz 2 ile etkileşime girerek mitokondriyal membran potansiyelinin düzenlenmesinde rol oynayarak, NADPH üretimini artırır ve hücre içi ROS seviyelerini azaltır. Besin yokluğu veya metabolik stres durumunda

TIGAR, otofajiyi inhibe edebilir ve otofajinin hücrel antioksidan savunma sisteminin bir parçası olarak aktivitesini modüle edebilir. DRAM'ın otofajiyi olumlu yönde düzenlediği bilinmekle birlikte, ROS ve DRAM arasında bir bağlantı henüz tam olarak yapılan çalışmalar ile gösterilememiştir.

HIF1 hipoksi durumunda, BNIP3 ve NIX genlerinin transkripsiyonunu indükleyebilmektedir. Protein ürünleri, BECN1 ile rekabet ederek BECN1/BCL2 arasındaki etkileşimi değiştirerek otofajinin indüklenmesinde rol oynar. Mitofaji ile ROS üretiminin azaltılmasına neden olabilmektedir. Oksidatif stres cevap olarak, FOXO3 de aktive edilebilmektedir. FOXO3, otofaji ilişki genlerin transkripsiyonunu uyararak otofaji oluşumunun indüklenmesinde rol oynar.

Çok fonksiyonlu bir stresle-indüklenebilir yapı proteini ve otofajik degradasyon belirteci olan p62; Nrf2 sinyalizasyonunu ve otofajiyi birbirine bağlamaktadır. p62 aracılığıyla otofajinin indüksiyonu; Nrf2 aktivasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin ortadan kaldırılması için çok önemlidir. Yapılan çalışmalar, aşırı ROS üretimi durumunda Nrf2 ekspresyonunun aktivasyonu ile p62'nin transkripsiyonunun ve ekspresyonunun düzenlenerek otofajinin indüklendiğini göstermektedir.

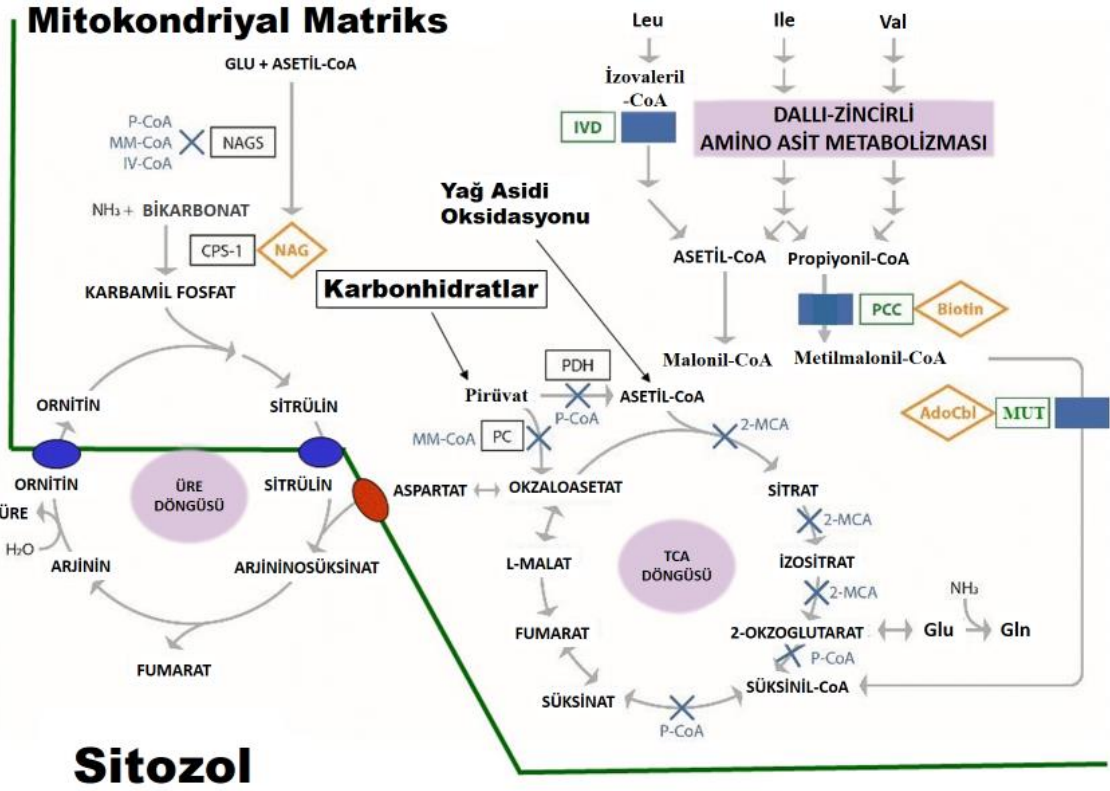
p62 mRNA'sının ekspresyon seviyesi, seçici otofaji koşulları altında kademeli olarak artmaktadır. Nrf2'nin sürekli aktivasyonu sitotoksik olduğu için, Nrf2/Keap1/p62 yolağı negatif olarak düzenlenerek pozitif bir geri besleme döngüsüne yol açar. Nrf2/Keap1/p62 yolağının aktivitesi hücre için belirli bir eşiği aştığında, Keap1 ile etkileşim bölgesinden yoksun olan splice varyantın işlevsel hale gelebileceği ve böylelikle yapısal Nrf2 aktivasyonunu bastırabileceği bildirilmiştir. Oksidatif stres ve bozulmuş otofaji yolağı gibi stres koşulları altında, hem tam uzunluktaki formun hem de splice varyantın aynı oranlarda ekspresyon artışları gösterebileceği ve p62'nin her iki formunun da otofaji yoluyla yıkılabileceği gösterilmiştir. Otofaji yolağında p62'nin iki formu arasındaki tek fark, Keap1'in otofajik degradasyonunun, p62'nin splice varyantının Keap1 ile etkileşim bölgesinden yoksun olması sebebiyle gerçekleştirilememesi olarak bildirilmiştir. p62'nin splice varyantı ile yapılan genetik düzenlemelerin memeliler arasında korunmuş gibi görünmemesi sebebiyle gelişmeye devam ediyor olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, insan p62 splice varyantının fizyolojik rolünü açıklığa kavuşturmak için daha fazla analiz gerektiği ifade edilmektedir [21, 26, 215-218].

Otofaji, nasıl ki ROS tarafından modüle ediliyorsa, ROS'un da otofaji aracılığıyla modüle edildiği söylenebilir. Şaperon aracılı otofaji ile hasarlı protein proteolitik parçalanması sağlanabilir. Hasarlı organeller -özellikle mitokondri-, seçici otofaji ile ortadan kaldırılmaktadır. Oksidatif stres durumunda aktif hale gelen Nrf2 yolağı ile p62 tarafından hasarlı protein ve organellerin degradasyonu sağlanabilir. Dolayısıyla otofajinin, artan ROS miktarının modülasyonunda önemli bir rol oynadığını söylemek mümkündür [25, 26].

2.4.3. Otofaji ve Kalıtsal Metabolik Hastalıklar

Otofaji büyük ölçüde, yaş-ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda çalışılmakla birlikte son yıllarda bu yolak, özellikle lizozomal hastalıklar başta olmak üzere bazı KMH'lar için de araştırılmaktadır. Lizozomal lipid depo bozuklukları, hücre lizozomlarında hücrel toksisiteye yol açan lipid birikmesine neden olan, KMH'ların bir grubudur. Özellikle nöronların lipid birikimine duyarlı olması sebebiyle bu hastalarda sıklıkla nörodejenerasyon ve beyin gelişiminde gerilik görülür. Lizozomal lipid depo bozukluklarında nöronların ve diğer hücrelerin elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucu; organeller, glikojen ve membran fragmanları ile şişmiş vakuol ve lizozom oluşumlarının gösterilmesi, bozulmuş otofaji yolağının doğrudan kanıtı olarak gösterilmektedir. Fabry, Gaucher ve Niemann-Pick A/B/C hastalıkları, nöronal seroid lipofusinozlar, glikojen depo hastalıkları ve mukopolisakkaridozların (MPS) (tip I, II, III, IV, VI, VII, IX) da içinde bulunduğu lizozomal depo bozukluklarında bozulmuş otofaji yolağı, neredeyse evrensel olarak tanımlanmaktadır [28, 219-222].

Organik asidüriler; amino asitlerin, karbonhidratların veya lipidlerin katabolizmasında görev alan hücrel metabolik yolların birinde yer alan enzim veya taşıma proteininin eksikliğinden dolayı kaynaklanan KMH'lardır. Bu eksiklikler vücutta anormal organik asit birikimi ve organik asidin idrarda anormal atılımına neden olur. Klasik organik asidüriler olarak da adlandırılan metil malonik asidüri (MMA), propiyonik asidüri (PA), izovalerik asidüri (İVA) ve akçağaç şurubu idrar hastalığı (MSUD) dallı zincirli amino asitler olarak bilinen valin, lösin ve izolösin metabolizması bozukluklarını içermektedir. Bu amino asitlerin metabolizmasında rol alan enzimlerdeki genetik kusurlar, Krebs ve üre döngülerinin bozulması ile toksik organik asitlerin birikmesine neden olur [223-225].



Şekil 2.22. MMA, PA ve İVA organik asidemilerinin önerilen biyokimyasal patogenezi [223].

PA, PCCA (propionyl-CoA carboxylase subunit alpha) ve PCCB (propionyl-CoA carboxylase subunit beta) genleri tarafından kodlanan propiyonil-koenzim A (P-CoA) karboksilaz eksikliği sonucu oluşmaktadır. Bu enzim eksikliği PA'da P-CoA öncülünün oluşumuna yol açar. MMA'ya, kobalaminin (Cbl) adenosilkobalamine (AdoCbl) dönüşümünü, MUT (methylmalonyl-CoA mutase) geni tarafından kodlanan metilmalonil-CoA mutaz ve metilmalonil-CoA epimeraz aktivitesini etkileyen çoklu enzimlerin eksikliği neden olabilmektedir. MMA ilişkili enzim eksikliği/eksiklikleri, MMA'da metilmalonil-CoA (MM-CoA) öncülünün oluşumuna neden olur. İVA ise, izovaleryl-CoA dehidrojenaz eksikliği ile karakterize olmakla birlikte, enzim eksikliği sonucu İVA'da İV-CoA (isovaleryl-CoA) öncülünün oluşumu görülmektedir [223, 224, 226].

Hiperamoneminin, kusurlu enzimler sebebiyle biriken substratların, Krebs ve üre döngüleri dahil olmak üzere diğer biyokimyasal yollarla etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. NAGS (N-acetylglutamate synthase), glutamat ve asetil-CoA'dan NAG (N-acetylglutamate) oluşumunu katalize etmektedir. NAG, üre döngüsünün ilk enzimi

olan CPS-1 (carbamyl phosphate synthetase 1) için önemli bir aktivatördür. Organik asidürilerde biriken metabolitler (PA-CoA, MMA-CoA ve İVA-CoA) NAGS aktivitesini inhibe etmek için asetil-CoA ile rekabet ederek, karbamil fosfat sentezini azaltmaktadır. Üre döngüsünün bu ikincil bozulması, organik asidürilerde metabolik dekompanasyon sırasında nörotoksik etkilerle yüksek amonyak seviyelerine yol açabilir [223].

PA ve MMA metabolizmasının son ürünü, Krebs döngüsünün ara ürünü olan süksinil-CoA oluşumudur. PA ve MMA durumunda Krebs döngüsü ara maddeleri diğer yollardan türetilmelidir. Örneğin glutamin, amonyak ve glutamat oluşturmak üzere tepkimeye girerek, Krebs döngüsüne girebilen amonyak ve 2-oksoglutarata oluşumunu sağlayabilir. Ancak bu reaksiyonların yan ürünü olan amonyak, kronik hiperamonemiye katkıda bulunabilmektedir. İlaveten, azaltılmış glutamat konsantrasyonu, NAGS tarafından NAG sentezini de bozabilir. Ayrıca Krebs döngüsünün devamlılığı için glutaminden α -ketoglutarata akış, PA'da artan amonyak seviyelerinin yanında glutamin seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar, artan amonyak seviyelerinin otofaji modülasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Amonyak kaynaklı otofajinin sonuçları, hedef hücreye veya dokuya bağlı olarak değişmekle birlikte, hiperamonemi görülen hastalıklarda otofaji yolağının kontrolünün bir tedavi seçeneği olarak göz önünde bulundurulabileceği belirtilmektedir [223, 227, 228].

PA ve MMA'daki toksik metabolitlerin, Krebs döngüsünün normal işleyişini bozarak, mitokondriyal fonksiyonda bozulma, dolayısıyla ATP'nin azalmasına neden olduğunu gösteren çalışmaların sayısı artmaktadır. Yüksek propiyonik asit, metilmalonik asit ve izovalerik asit seviyelerinin, ROS seviyelerini artırarak ve ROS koruyucu glutatyon seviyelerini azaltarak doğrudan oksidatif strese aracılık ettiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Otofajinin, doğrudan ya da dolaylı olarak ROS tarafından modüle edildiği bilinmekle birlikte organik asidürilerle ROS-otofaji arasındaki ilişkinin ayrıntılı olarak araştırıldığı çalışmaya literatürde ulaşılammıştır [223, 229].

Mitokondriyal hastalık terimi genel olarak, OXPHOS fonksiyonuyla ilişkili mitokondriyal elektron taşıma zincirinin tam veya kısmi işlev bozukluğundan kaynaklanan KMH'ların bir grubunu ifade etmektedir. OXPHOS sistemindeki disfonksiyon; ATP eksikliği, mitokondri membran potansiyelinde azalma ve ROS fazlalığına neden olarak mitokondriyal hastalıkların klinik belirtilerinin çoğuna neden

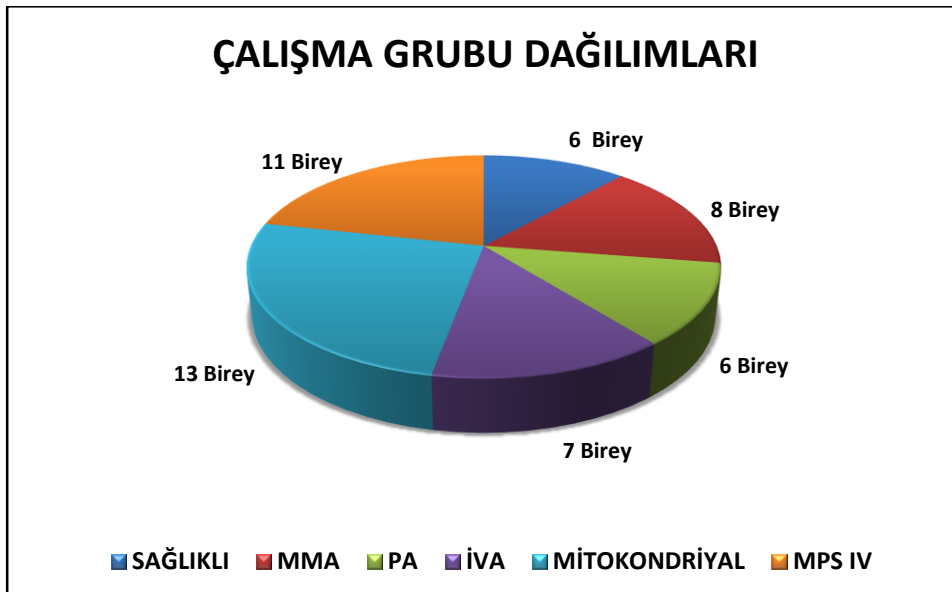
olan ana patojenik faktörleri oluşturmaktadır. Mitokondriyal hastalıklarda yapılan hücrel ve fare modellerindeki çalışmalar, artmış veya bozulmuş otofaji durumunu göstermektedir. Bazı araştırmacılar, mitokondriyal hastalıkların hücrel modellerinde otofajik belirteçlerdeki artışı, otofajik akışın bozulmasına bağlayarak, otofagozom/otofagolizozomların birikimine neden olabileceğini önermektedir. Artık mitokondriyal hastalıklarda otofajinin önemi konusunda şüphe olmasa da, otofajinin hastalıkların seyrinde koruyucu veya patolojik bir rolü olup olmadığı konusunda ortak bir fikir birliği bulunmamaktadır. Henüz bir anlaşma olmamasına rağmen, otofaji/ mitofaji süreçlerinin bozulmasının patofizyolojik değişikliklerin şiddetinde ve hatta hücre ölümünde bir artışa neden olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca mitofaji indüksiyonunun, mitokondriyal fonksiyonun önemli ölçüde iyileşmesine neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda, otofaji ve/veya mitofaji indükleyicilerinin kullanımının, mitokondriyal hastalıklar ve mitokondriyal metabolizmayı değiştiren diğer hastalıklar için mitokondriyal fonksiyonun iyileştirilmesine yönelik yeni bir strateji olması üzerinde çalışılması gerektiği vurgulanmaktadır [230, 231].

Son yıllarda keşfedilen otofaji yolağındaki birçok tek-gen bozukluğu, “otofajinin konjenital bozuklukları” olarak isimlendirilerek, KMH’ların yeni bir grubu olarak tanımlanmaktadır. Bu bozukluklar heterojen olmakla birlikte, beyin malformasyonlarına, gelişimsel gecikmeye, zihinsel engelliliğe, epilepsiye, hareket bozukluklarına ve bilişsel gerilemeye yol açan, merkezi sinir sisteminin belirgin ve ilerleyici bir şekilde ilişkisi ile, çeşitli klinik ve moleküler özellikleri paylaşırlar. Vici sendromu, herediter spastik paraplejiler, otozomal resesif ataksi sendromları, beyinde demir birikimi ile karakterize nörodejenerasyon, p62-ilişkili çocukluk çağında başlayan nörodejenerasyon ve TBCK (TBC1 domain containing kinase) ensefalonöropatisi sahip oldukları mutasyonlarla otofajinin konjenital bozuklukları içerisinde yer alır. Otofajinin indüklenmesi, otofagozom oluşumu ve maturasyonu, otofagozom/lizozom füzyon basamaklarında rol alan çeşitli genlerdeki mutasyonlarla karakterize olan konjenital otofaji bozuklukları, otofaji yolağının KMH’lardaki önemini vurgulamaktadır [29, 232, 233].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Hasta ve Sağlıklı Gruplarından Biyolojik Örneklerin Toplanması

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Metabolizma Bilim Dalı polikliniğinde; çocukluk yaş grubu, klinik muayene, biyokimyasal testler, radyolojik değerlendirmeler, genetik analizler sonucu tanısı kesinleşmiş, farklı kalıtsal metabolik hastalıklara sahip toplam 45 hasta ve hastaneye başvurduğunda metabolik bir hastalıkla ilişkili aktif hastalık şikayeti olmayan, herhangi bir kronik hastalık öyküsü bulunmayan sağlıklı 6 çocuk, Hacettepe Üniversitesi GO 18/640-34 etik kurul izni kapsamında, çalışma için oluşturulan bilgilendirilmiş yazılı onam formları alınarak çalışmaya dâhil edilmiştir. Aktif enfeksiyonu veya farklı bir kalıtsal/kalıtsal olmayan hastalığı bulunan bireyler çalışmadan dışlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı grupların dağılımları ve çalışmaya dahil edildikleri gündeki hastane kayıt sistemine girilmiş bilgileri aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylerden oluşan çalışma grubu sayıları.

Çizelge 3.1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylerin hastane bilgileri.

Sağlıklı ve Hasta Grupları	Cinsiyet (Kız:K, Erkek:E)	Yaş (Yıl, ay)	Boy (cm)	Kilo (kg)	Vücut Kitle İndeksi (VKİ) (kg/m²)
Sağlıklı					
S1	E	16,9	165	52	19.1
S2	K	12	154	60	25.29
S3	K	11,11	152	53	22.94
S4	E	15,1	176	65.7	21.21
S5	K	16	160	71	27.73
S6	K	14,10	154	63.7	26.85
MMA					
MMA-1	K	16,10	155	39	16.23
MMA-2	E	3,5	89.5	11.63	14.52
MMA-3	K	10,5	118.5	18.7	13.32
MMA-4	K	22	152	45.2	19.7
MMA-5	E	17,1	152	43.5	18.83
MMA-6	E	24	170.5	83	28.55
MMA-7	E	13,4	171	66	22.57
MMA-8	E	4,5	109	22	18.52
PA					
PA-1	E	3,9	96.5	14.3	15.36
PA-2	E	11,8	149	46	20.72
PA-3	E	14,11	160	51.2	20
PA-4	K	8,3	109	15	12.63
PA-5	E	4,9	102	19.5	18.74

PA-6	E	19	159	43.8	17.33
İVA					
İVA-1	K	5,9	110	20.2	16.7
İVA-2	K	18	166.5	50.5	18.22
İVA-3	K	13,4	150.5	37.4	16.5
İVA-4	K	16,5	165.5	52	19
İVA-5	K	9,11	139	29	15
İVA-6	E	34	-	-	-
İVA-7	E	27	194	63	16.74
MİTOKONDRIYAL (MİT)					
MİT-1	K	4,8	97	11.4	12.1
MİT-2	E	15,2	173	51.5	17.2
MİT-3	K	17	160.5	49	19
MİT-4	E	4,9	102	16.2	15.6
MİT-5	E	11,11	-	-	-
MİT-6	E	13	155.5	41.5	17
MİT-7	K	7,5	112.5	17.4	13.8
MİT-8	E	3,10	104.5	17.15	15.7
MİT-9	E	7,7	116	19.2	14.3
MİT-10	K	14,5	163	57	21.5
MİT-11	E	15,8	172	81	27.4
MİT-12	E	6,1	-	-	-
MİT-13	K	2,9	84.5	11.2	15.7
MPS IV					
MPS-1	E	14,1	-	-	-
MPS-2	K	5,10	-	-	-
MPS-3	K	3	-	-	-

MPS-4	E	5,9	-	-	-
MPS-5	E	9,9	-	-	-
MPS-6	E	3,5	-	-	-
MPS-7	E	11,6	-	-	-
MPS-8	K	3,9	-	-	-
MPS-9	E	7,7	-	-	-
MPS-10	K	11,9	-	-	-
MPS-11	K	18,4	-	-	-

Klinik değerlendirmesi yapılan hasta ve sağlıklı grupta yer alan her bir bireyden; ortalama 7 ml periferik kan EDTA'lı tüplerde ve ortalama 4 ml periferik kan antikoagülan içermeyen (kırmızı kapaklı) tüplerde toplanmıştır. Toplanan kanlar, en geç 4 saat içerisinde ileri analizler için işleme alınmıştır. Hemolizli kan örnekleri ve çalışmalarda kullanılacak biyolojik materyallerden (PBMC, RNA, serum) en az birinin temin edilemediği hasta ve sağlıklı bireyler, çalışmaya dahil edilmemiştir.

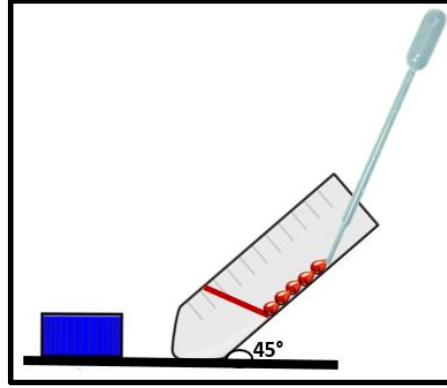
3.2. Serum, Plazma ve Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PBMC) Eldesi

Serum İzolasyon Protokolü: Antikoaglan içermeyen kan tüplerine (kırmızı kapaklı tüp) alınmış olan periferik kan; 4°C, 1200 x g, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün en üstünde bulunan serum, 1,5 ml'lik DNaz-RNaz içermeyen ependorfların içine 500 µl olacak şekilde alikotlandı. Alikotlanan rnekler -80°C'de ileri çalışmalara kadar saklandı.

Plazma İzolasyon Protokolü: EDTA'lı kan tüplerine alınan periferik kan, +4°C, 1800 rpm, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün en üstünde bulunan plazma, DNaz-RNaz içermeyen 1,5 ml'lik ependorfların içine 500 µl olacak şekilde alikotlandı. Alikotlanan rnekler, -80°C'de saklandı.

PBMC İzolasyon Protokolü: Plazması uzaklaştırılmış steril falkon içerisindeki periferik kan, kan miktarının iki katı olacak şekilde PBS (phosphate-buffered saline) (Biowest; Cat No: L0615-500) ile tamamlanarak iyice karıştırıldı (Kan: PBS, 1:1). Ayrı bir steril

falkona, ilk gelen kan miktarı kadar fikol (Biowest; Cat No: L0560-100) ilave edildi. Fikol üzerine; PBS ilave edilmiş olan kan örneği, yavaş bir şekilde yayıldı.



Şekil 3.2. PBS ilave edilmiş periferik kan örneğinin fikole yayılması.

Fikole kanı yayma işlemi tamamlandıktan sonra, +20°C, 600 x g, 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda hücrelerin tabaka olarak ayrılması için, santrifüj frensiz olarak durduruldu. Santrifüj sonrası plazma/PBS ve fikol arasında bulutsu olarak gözükten PBMC'ler, pastör pipeti yardımı ile steril bir falkon tüpüne toplandı. PBMC toplama işlemi bittikten sonra üzerine yaklaşık 5 ml PBS ilave edilerek +4°C, 1500 rpm, 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant, alttaki pelete zarar vermeyecek şekilde hızlı bir şekilde döküldü. Hücrelerin yoğunluğuna göre PBS ile sulandırma yapıldı. Seyreltilen hücrelerden 25 µl alınarak, 1:3 oranında tripan blue (Sigma; Cat No: T8154) ile (hücre:tripan blue, 1:3) 1,5 ml'lik ependorfta karıştırıldı. PBMC-tripan blue karışımından 25 µl alınarak, boyanan hücreler için ışık mikroskopunda Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Hücre peleti oluşturmak için, seyreltilen hücreler, 10 ml'ye PBS ile tamamlanıp +4°C, 1500 rpm, 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 5 milyon hücre, 1,5ml'lik DNaz-RNaz içermeyen ependorflara RNAProtect Cell Reagent (Qiagen; Cat No: 76526) ilave edilerek alikotlandı. Alikotlanan örnekler -80°C'de ileri RNA çalışmalarına kadar saklandı. Geriye kalan hücreler (en az 10 milyon), 100 µl DMSO (ChemCruz; Cat No: sc-359032), 300 µl FBS (Gibco; Cat No: 10270-106) ve 600 µl DMEM (Gibco; Cat No: 21885-025) içeren 1000 µl dondurma besiyeri içerisinde cryotüplere alikotlandı. Hücrelerin zarar görmeden dereceli olarak dondurulması için cryotüpler, Mr. Frosty dondurma kabına alınarak -80°C'de 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda hücreler (PBMC) ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -150°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.3. Oksidatif Stres, Mitokondriyal Disfonksiyon ve Otofaji Yolaklarının İncelenmesi

Oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve otofaji yolaklarının incelenmesi için 6 farklı deney planı yapılmıştır. TAS (Total Antioksidan Seviye)/TOS (Total Oksidan Seviye) analizleri için alikotlanarak -80°C'de saklanan serum örnekleri kullanılmıştır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), alikotlanarak -80°C'de RNA protect içerisinde saklanan 5 milyon hücreden (PBMC) elde edilen RNA örnekleri ile çalışılmıştır. Hücre içi ROS, ATP, mitokondri membran potansiyeli ölçüm deneyleri ve western blot analizi için gerekli olan proteinlerin eldesi, alikotlanarak -150°C'de saklanan minimum 10 milyon PBMC ile çalışılmıştır. Özellikle çocukluk yaş grubu hastalardan elde edilebilen biyolojik örnek miktarının az olması nedeniyle elde edilen PBMC örnekleri ile dört farklı deneyin eş zamanlı çalışılması ihtiyacı doğmuş, bu sebeple de minimum hücre sayısını belirleyebilmek için kontrol deneyleri yapılmıştır.

3.3.1. TAS (Total Antioksidan Seviye) / TOS (Total Oksidan Seviye) Analizleri

Elde edilen serum örneklerinin TAS ölçümleri üretici firmanın protokolüne (Relassay, Cat No: RL0017) uygun olarak gerçekleştirilmiştir [234, 235]. Bu yöntem, numunedeki antioksidanların koyu mavi-yeşil renkli ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) radikal solüsyonunu, renksiz ABTS formuna çevirmesiyle 660 nm'de absorbans değişikliğinin tespit edilmesine dayanmaktadır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılmıştır. Sonuçlar mmol Trolox equiv./lt olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 3.2. TAS kit içeriği.

Kit İçeriği	Bileşenler	
Reaktif 1	Tampon solüsyonu	
Asetat Tamponu	0.4 mol/L pH 5.8	
Reaktif 2	Prokromojen solüsyonu	
ABTS	30 mmol/L	
Standard	Trolox	1 mmol/L
QC Level 1	Trolox	0.5 mmol/L
QC Level 2	Trolox	2.0 mmol/L

Örnekler, çalışılan deneyin çok hassas olması sebebiyle, kullanıcı ve zamanlama hatasını ortadan kaldırmak için Mindray BS300 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı. Reaktif 1'den 300 µl, numuneden 18 µl alındı. Ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 660 nm'de gerçekleştirildi. İlk okumanın arkasından reaktif 2'den 45 µl alınarak mevcut karışıma ilave edildi. İnkübatörde 5 dakika bekletilip ikinci okuma 660 nm'de yapılarak sonuçlar kaydedildi.

Elde edilen serum örneklerinin TOS ölçümleri üretici firmanın protokolüne (Relassay, Cat No: RL0024) uygun olarak gerçekleştirilmiştir [234, 235]. Yöntem, numunedeki oksidanların renksiz ferröz,o-dianisidin solüsyonunu, kahve-turuncu ferrik formuna oksidasyonu ile 530 nm'de absorban değişiminin tespit edilmesine dayanmaktadır. Kalibratör olarak H₂O₂ kullanılmıştır. Sonuçlar µmol H₂O₂ equiv./lt olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 3.3. TOS kit içeriği.

Kit İçeriği	Bileşenler	
Reaktif 1	Tampon solüsyonu	
H ₂ SO ₄	25 mM pH 1.75	
Reaktif 2	Substrat solüsyonu	
H ₂ SO ₄	25 mM pH 1.75	
Ferröz iyon, O-dianisidin	5 mM	10 nM
Standard	H ₂ O ₂	10 µmol/L
QC Level 1	H ₂ O ₂	5 µmol/L
QC Level 2	H ₂ O ₂	20 µmol/L

Örnekler, çalışılan deneyin çok hassas olması sebebiyle, kullanıcı ve zamanlama hatasını ortadan kaldırmak için Mindray BS300 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı. Reaktif 1'den 300 µl, numuneden 45 µl alındı. Ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk okuma 530 nm'de gerçekleştirildi. İlk okumanın arkasından reaktif 2'den 15 µl alınarak mevcut karışıma ilave edildi. İnkübatörde 5 dakika bekletilip ikinci okuma 530 nm'de yapılarak sonuçlar kaydedildi.

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ): TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSİ değeri hesaplanırken, TAS testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi µmol birimine çevrilir. Sonuçlar AU (arbitrary unit) olarak ifade edilerek, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$OSİ = TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./lt} / \text{TAS, mmol Trolox equiv./lt} \times 10$$

3.3.2. Oksidatif Stres, Antioksidan Enzimler ve Otofaji İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerinin RT-PZR Yöntemi İle Saptanması

RNA izolasyonu ve ölçümü, cDNA eldesi ve RT-PZR reaksiyonu olmak üzere deney üç aşamada gerçekleştirilmiştir.

RNA İzolasyonu ve Ölçümü: -80°C’de RNA izolasyonu için alikotlanarak saklanan 5 milyon PBMC’den RNA eldesi RNA izolasyon kiti (Thermo Sci., PureLink RNA Mini Kit, Cat No: 12183018A) ile bazı optimizasyonlar yapılarak üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde, buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Her 5 milyon PBMC örneği için, %1 merkaptoetanol (Merck; Cat No: 60-24-2) içeren liziz tamponu hazırlandı. -80°C’den çıkartılan örnekler eritilerek, DNaz-RNaz içermeyen 2 ml’lik ependorflara aktarıldı. Üzerlerine 1:1 oranında PBS ilave edildi. +4°C, 5500 x g, 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dibe çöken pelet kontrol edildikten sonra, süpernatant atıldı. Pelet üzerine önceden hazırlanan liziz tamponu eklendi. Hücre peleti dağılana ve hücre görüntüsü tamamen yok olana kadar, yaklaşık 5 dakika yüksek hızda vortekslendi. Oda sıcaklığında, 12000 x g’de 3 dakika santrifüj edildi. Her bir örneğin üzerine 600 µl % 70’lik etanol (Merck; Cat No: 1.00983.2500; ddH₂O₂) ilave edildi. Ependorf içerisinde homojenizasyon tamamlanıncaya kadar yaklaşık 3 dakika yüksek hızda vortekslendi. Her bir örnekten kolonlara 700 µl aktarıldı. Oda sıcaklığında, 12000 x g’de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı atıldı. Bu işlem her bir örnek bitene kadar tekrarlandı. 700 µl yıkama tamponu I eklendi. Oda sıcaklığında, 12000 x g’de 15 saniye santrifüj edildi. Yeni toplama tüpüne kolon yerleştirilerek 500 µl yıkama tamponu II eklendi. Oda sıcaklığında, 12000 x g’de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı atılarak yıkama tamponu II kullanılarak ikinci yıkama yapıldı. Kolon oda sıcaklığında, 12000 x g’de 3 dakika santrifüj edilerek yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Üzerlerine 30 µl RNaz içermeyen su koyuldu. Oda sıcaklığında 1 dakika

bekletildikten sonra; oda sıcaklığında, 16000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen RNA'lar yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Her bir RNA örneği, tekrar buz üzerine alındı. NanoDrop spektrofotometre ile her bir örnekten 1,5 µl alınarak okutuldu ve sonuçlar kayıt edildi. cDNA eldesine kadar tüm izole RNA'lar -80°C'de saklandı.

cDNA Eldesi: cDNA örnekleri cDNA Reverstranskripsiyon kiti (Thermo Sci., High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Cat No: 4368813) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde, buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen her bir RNA için, her bir reaksiyonda toplam 2 µg RNA olacak şekilde PZR tüplerine RNA'lar ilave edildi.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan RT karışımı.

Kit İçeriği	Kullanılan hacimler
10X RT Tamponu	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primerleri	2 µl
Reverstranskriptaz Enzimi	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4,2 µl
TOPLAM HACİM	10 µl

Her bir cDNA reaksiyonu için son hacim 20 µl olacak şekilde PZR tüpleri hazırlandı ve kit protokolünde belirtilen koşullara uygun olarak PZR cihazında RT reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5. RT reaksiyonu için PZR cihazı koşulları.

Koşullar	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	4.Basamak
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

Elde edilen cDNA'lar, tekrar buz üzerine alındı. NanoDrop spektrofotometre ile her bir örnekten 1,5 µl alınarak okutuldu ve sonuçlar kayıt edildi. RT-PZR'ye kadar tüm cDNA'lar -20°C'de saklandı.

RT-PZR: İlgili gen bölgelerinin amplifikasyonları bazı değişikliklerle birlikte Saiki ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle yapılmıştır [236]. Primerlerin dizaynı "Primer3Plus" programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve "Nucleotide BLAST" programı kullanılarak tasarlanan primerlerin özgüllüğü test edilmiştir. Gradient PZR ve agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak, RT-PZR için özgül amplifikasyon için en uygun primer sıcaklığı belirlenmiştir. RT-PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere gradient PZR koşulları, RT-PZR için belirlenen en uygun primer sıcaklıkları ve dizayn edilen primerler aşağıdaki tablolarda gösterilmektedir.

Çizelge 3.6. Analiz edilen genler, gradient PZR koşulları ve RT-PZR için belirlenen primer Tm sıcaklığı.

Hedef Gen	Gradient Termal Döngü Şartları		RT-PZR İçin Belirlenen En Uygun Primer Tm Sıcaklığı
<i>NRF2</i>	95°C; 4 dakika	35 döngü	62°C
<i>KEAP1</i>			60°C
<i>SOD1</i>	95°C; 30 saniye		62°C
<i>HMOX1</i>			60°C
<i>NQO1</i>	56, 58, 60, 62, 64°C'ler; 45 saniye		60°C
<i>p62</i>			60°C
<i>mTOR</i>			62°C
<i>BECLIN1</i>	68°C; 45 saniye		60°C
<i>LC3B</i>			62°C
<i>EF1a</i>	68°C; 5 dakika		60°C; 62°C
	12°C; ∞		

Çizelge 3.7. Çalışılan genler ve RT-PZR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri.

Hedef Genler	Primer Dizileri (5'-3')
<i>NRF2</i>	F: CAGCGACGGAAAGAGTATGA R: TGGGCAACCTGGGAGTAG
<i>KEAP1</i>	F: TGGAAACAGAGACGTGGACT R: GGTGTCTGTATCTGGGTCGT
<i>SOD1</i>	F: GCAGGGCATCATCAATTTTCG R: GTGAGGACCTGCACTGGTA
<i>HMOX1</i>	F: CCAGTGCCACCAAGTTCAAG R: TTGGTGTCATGGGTCAGCAG
<i>NQO1</i>	F: AAAGTGAAGGACCCTGCGAA R: AGAATGGCAGGGACTCCAAA
<i>p62</i>	F: ATCGGAGGATCCGAGTGTG R: GCTCTTCTCCTCTGTGCTG
<i>mTOR</i>	F: TGGCTCTGAATGACCAGGTG R: ATCCCACTGTGCTCCAATC
<i>BECLIN1</i>	F: AGGACCTCACAGCTCCATTAC R: AATGGCTCCTCTCCTGAGTT
<i>LC3B</i>	F: AGCAGCATCCAACCAAATC R: CTGTGTCCGTTACCAACAG
EF1a	F: GGAGATGCCAGCCTCAAAC R: GATATTGCGTTGTGGAAGT

RT-PZR reaksiyonları 60°C ve 62°C derecelerde, RT-PZR kiti (Thermo Sci., Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Cat No: K0222) ile bazı optimizasyonlar yapılarak üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir

reaksiyon için dissociation curve analizi yapılmıştır. RT-PZR reaksiyonlarının protokolü ve termal döngü şartları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Çizelge 3.8. RT-PZR reaksiyonlarına ait protokol.

Kit İçeriği	Kullanılan hacimler
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	5 µl
İleri primer (F) (2,5 pmol/ µl)	0,25 µl
Ters primer (R) (2,5 pmol/ µl)	0,25 µl
cDNA (50ng)	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	6 µl
TOPLAM HACİM	12,5 µl

Çizelge 3.9. RT-PZR reaksiyonu için termal döngü cihaz koşulları.

Basamaklar	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	48
Yapışma (annealing)	60; 62	30 saniye	
Uzama (extension)	72	30 saniye	
Dissociation curve	95	1 dakika	1
	55	30 saniye	
	95	30 saniye	

Her bir gen için elde edilen RT-PZR sonuçları kullanılarak; ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplandı.

3.3.3. Hücre İçi ROS Miktarı, Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Hücre İçi ATP Miktarının Ölçümü

Yapılan her üç deney için de farklı kısıtlamaların bulunması, deney optimizasyonlarının gerçekleştirilmesi için başta kontrol deneylerinin yapılması gereklidir. Mevcut kısıtlamalar, aşağıda özetlenmiştir.

- Hasta ve sağlıklı gruplardan temin edilen periferik kanların, pediatrik yaş grubu bireylerden alınması sebebiyle örnek miktarının az olması,
- Toplam dört farklı deneyin, dondurulan tek vial PBMC'den eş zamanlı olarak gerçekleştirilmesinin gerekli olması,
- Gerek ticari olarak temin edilen kit protokolü, gerekse literatürde deneyler ile ilgili detaylı olarak yöntemi açıklayıcı bilginin bulunmaması,
- Deneylerin gerçekleştirileceği başlangıç PBMC sayısının; ölçümde kullanılacak kimyasalların inkübasyon süresinin, sıcaklığının, miktarının, sulandırılmalarında kullanılacak maddenin türü ve miktarının tam olarak bilinmemesi,
- Elde edilecek ölçüm değerlerinin doğruluğunu değerlendirmede kullanılacak olan kimyasalın (H_2O_2 -hidrojen peroksit) konsantrasyonlarının, inkübasyon süresinin, miktarının, sulandırılmasında kullanılacak maddenin türü ve miktarının tam olarak bilinmemesi,
- Hücre içi ATP miktarının ölçümü deneyinde kullanılacak standart aralıklarının tam olarak bilinmemesi,
- En doğru ölçüm sonuçlarının alınacağı dalga boyu ve deney zamanının tam olarak bilinmemesi,

deney optimizasyonunu elzem kılan kısıtlayıcı sebeplerin başında gelmektedirler. Belirtilen sebeplerden dolayı, deney optimizasyonu için her bir deney öncelikle ayrı ayrı optimize edilmiş ve kontrol deneyleri yapılmıştır. Deney optimizasyonlarının tamamlanması ile sırasıyla;

- Hücrelerin çözünmesi,
- Western blot deneyleri için protein izolasyonu,
- Hücre içi ROS, ATP ve mitokondri membran potansiyeli ölçümlerinin eş zamanlı yürütülmesi,
- Hücrelerin görüntülenmesi

basamakları, her bir PBMC için gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1. Hücre İçi ROS Miktarı, Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Hücre İçi ATP Miktarının Ölçümlerinde Yapılan Kontrol Deneyleri

Her üç deney için de kısıtlama parametreleri göz önünde bulundurularak, deneylerin optimizasyonu için aşağıda belirtilen değişkenler ile kontrol deneyleri planlanmıştır. Optimizasyon deneyleri yapılırken, mevcut sağlıklı PBMC'ler kullanılmıştır. Tüm deneyler karanlık odada gerçekleştirilmiştir.

Hücre Sayısının Belirlenmesi: Öncelikle hücre içi ATP miktarının ölçüm deneyinin optimizasyonu yapılmıştır. Deneylerde kullanılacak optimum PBMC sayısının belirlenmesi amacıyla literatür verileri göz önünde bulundurularak, 500.000, 250.000 ve 100.000 PBMC kullanılarak optimizasyon deneyleri kurulmuştur. Elde edilen veriler ve çalışılan makinadan (SpectraMax i3x) alınan CV değerleri (varyasyon katsayısı) ışığında, minimum hücre ile optimum deney sonucunun, 500.000 PBMC ile elde edildiği saptanmıştır. Hücre içi ROS miktarının ve mitokondri membran potansiyelinin ölçümü kontrol deneylerinde de 1 milyon ve 500.000 PBMC ile optimizasyon deneyleri kurulmuş, 500.000 hücrenin bu iki deney için de yeterli hücre sayısı olduğu belirlenmiştir.

Hücre İçi ATP Miktarının Ölçümünde Standartların Belirlenmesi: Yapılan kontrol deneyleri sonucu; 1 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM standart aralıklarının uygun olduğu belirlenmiştir.

Üç Deneyde Belirteç Olarak Kullanılacak Kimyasalların Optimizasyonu: Hücre içi ATP miktarının ölçümü için yapılan kontrol deneylerinde literatür verileri ve deneyde kullanılan kit protokolü göz önünde bulundurularak; 15 dakika, oda sıcaklığında inkübasyon süresinin ve 100 µl reaksiyonun uygun olduğu belirlenmiştir. Hücre içi ROS miktarının ve mitokondri membran potansiyelinin ölçümü kontrol deneylerinde ise 30 ve 35 dakikalık inkübasyon süreleri denenmiş, optimum koşulların 35 dakika, 37 °C ve 200 µl reaksiyon olduğu belirlenmiştir.

Mitokondri membran potansiyelinin ölçümünde kullanılan MitoTracker Red probu ise, fenol red içermeyen RPMI'da (Gibco; Cat No: 11835-063) çözülerek 100 nM olarak kullanılmıştır. Hücre içi ROS miktarının ölçümünde kullanılan CM-H2DCFDA-ROS indikatörü (2', 7'-dikloro dihidrofloresin diasetat), PBS'te çözülerek 10 µM olarak

kullanılmıştır. Uyarının kullanıldığı hücre içi ROS miktarının ölçümü deneylerinde, hücrelere bir iyileşme zamanı tanınması gerekirken, uyarının kullanılmadığı deneylerde deney sonucunda ölçümlerde azalma ile karşılaşmamak için iyileşme zamanı tanınmamış, doğrudan ölçüm alınmıştır.

Üç deney için de kullanılan belirteçlerin ve diğer kimyasalların sulandırılması, literatür verileri ve deneylerde kullanılan kit protokolleri göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Alikotlanarak saklamaya uygun olan kimyasallar, mümkün olan en az miktarlarda bölünerek saklanmıştır. Fenol red içermeyen RPMI ya da PBS ile sulandırılarak kullanılan kimyasallar, her deney öncesi taze hazırlanarak kullanılmıştır, saklamaya uygun değildir.

Kontrol Amacıyla Kullanılan Sağlıklı PBMC'lerin H₂O₂ İle Uyarılması: Kontrol deneylerinde elde edilecek ölçüm verilerinin doğruluğunu değerlendirmek için farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ile PBMC'lerin uyarımı denenerak belirlenmiştir. H₂O₂'nin farklı konsantrasyonlardaki denemeleri, 500.000 sağlıklı PBMC ile ilk kontrol deneyinin yapıldığı hücre içi ATP miktarının ölçümünde belirlenmiştir. Hücreleri ölüm yollarına sürükmeden, stresin yaratıldığı ilk anlamlı konsantrasyon olarak belirlenen 100 µM, diğer iki deney olan hücre içi ROS miktarının ve mitokondri membran potansiyelinin ölçümü kontrol deneylerinde de stres indükleyici olarak kullanılmıştır. 100 µM H₂O₂ uygulaması, 200 µl RPMI'da sulandırılma ve oda sıcaklığında 20-40 dakikalık inkübasyonlar ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler tekrarlı çalışılmış, verilerde ortalama değerler kullanılmıştır. 500.000 sağlıklı PBMC'nin ve 100 µM H₂O₂'nin kontrol deneylerinde en anlamlı sonuçları verdiği görülmüştür.

Deneylerde Uygulanan Yıkama Basamaklarının Optimizasyonu: Deneylerde yapılan yıkamalar, deney sonuçlarının değişiminde önemli bir yer tutar. Kontrol deneylerinde, tekrarlı yıkama basamaklarının etkileri değerlendirilerek yıkama sayıları ve sürelerine karar verilmiştir.

Deneylerdeki Ölçümlerde Kullanılan Dalga Boylarının Tespit Edilmesi: Hücre içi ATP miktarının ölçümünde tüm dalga boyları seçilmiş, elde edilen standart grafikler ışığında deney sonuçları yorumlanmıştır. Hücre içi ROS miktarının ve mitokondri membran potansiyelinin ölçümü deneylerinde, öncelikle ticari olarak temin edilerek

kullanılan kit protokollerine uygun ölçümler alınmış, sonrasında her bir kontrol deneyi için dalga boyu analizi yapılarak optimum dalga boyu seçilmiş, deneyler tespit edilen dalga boylarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.2. Hücrelerin Çözünmesi

-150°C'de dondurucuda muhafaza edilen PBMC'lerin hızlı bir şekilde 37°C'de çözünmesi sağlandı. Çözünen hücrelerden maksimum verim alabilmek amacıyla % 60 FBS içeren PBS ile yıkamaları gerçekleştirildi. Tripkan blue kullanılarak Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Sayım sonucu, ortalama % 50 ve üzeri canlılık eldesi sağlandığı tespit edildi. Hücre içi ATP, ROS ve mitokondri membran potansiyeli ölçüm deneylerinin tekrarlı çalışmasına imkan sağlayacak olan yaklaşık 3-4 milyon hücre, fenol red içermeyen RPMI içerisine alınarak, ileri deneyler yapılana kadar karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. Geri kalan PBMC'ler protein izolasyonunda kullanıldı.

3.3.3.3. Hücre İçi ATP Miktarının Ölçümü

Deneyler opak-düz taban well plate kullanılarak ve maksimum 6 örnek ile çalışılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için PBMC'ler, opak well plate 500.000 hücre olacak şekilde aktarıldı ve santrifüj ile plate'e yapışması sağlandı. ATP standartları hazırlanarak 10 µl olacak şekilde plate'e yüklendi. Hem örnek, hem de ATP standartlarının üzerine, kit protokolüne uygun olarak hazırlanan 90 µl standart tampon ilave edildi. Yükleme tamamlanan opak well plate kuyularındaki örnekler, 100 µl reaksiyon olacak şekilde ddH₂O (ultra saf su) ile tamamlandı. 0. dakikada ilk ölçüm alındıktan sonra, 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 15. ve 25. dakikalarda, tüm dalga boylarında ölçüm alınarak sonuçlar kaydedildi. Hücre görüntülemesine kadar hücreler karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Çizelge 3.10. Hücre içi ATP miktarının ölçümünde kullanılan standart tamponun hazırlanması.

Malzeme	Miktar
ddH ₂ O	1780 µl
20X Reaksiyon Buffer	100 µl
0,1M DTT	20 µl
10 mM D-Lusiferin	100 µl
Lusiferaz	0,5 µl

3.3.3.4. Mitokondri Membran Potansiyelinin (MMP) Ölçümü

Deneyler opak well plate kullanılarak, maksimum 6 örnek ile çalışılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için PBMC'ler, opak well plate 500.000 hücre olacak şekilde aktarıldı ve santrifüj ile plate'e yapışması sağlandı. Üzerlerine 100 nM Mitotracker Red ilave edilerek 35 dakika, 37°C % 5 CO₂'de inkübatörde tutuldu. İnkübasyon sonrası 37°C'lik RPMI ile yıkama yapıldı. Üzerine 200 µl PBS ilave edilerek, 5 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde karanlıkta bırakıldı. SpectraMax i3x ile eksitasyon 583/emisyon 620'de (Ex. 583/Em. 620) 0. ve 10. dakikalarda ölçüm alınarak sonuçlar kaydedildi. Hücre görüntülemesi yapılana kadar hücreler karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.3.3.5. Hücre İçi ROS Miktarının Ölçümü

Deneyler opak well plate kullanılarak, maksimum 6 örnek ile çalışılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için PBMC'ler, opak well plate 500.000 hücre olacak şekilde aktarıldı ve santrifüj ile plate'e yapışması sağlandı. Üzerlerine 10 µM CM-H₂DCFDA ilave edilerek inkübasyon öncesi SpectraMax i3x ile Ex. 500/Em. 532'de ölçüm alındı. 35 dakika, 37°C % 5 CO₂'de (karbondioksit) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 37°C'lik PBS ile yıkama yapıldı. Üzerine 200 µl PBS ilave edilerek, 2 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde karanlıkta bırakıldı. SpectraMax i3x ile 500/Em. 532'de ölçüm alındı. Hücre görüntülemesi yapılana kadar hücreler karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.3.3.6. Hücre Görüntüleme Deneyleri

Hücre içi ROS ve mitokondri membran potansiyeli florometrik deneyleri için otomatik hücre görüntüleme sistemi (Juli Stage) kullanılarak, x20 büyütme ile görüntüleme yapıldı. Aydınlık alan, floresan (GFP-yeşil, RFP -kırmızı) ve birleştirme görüntüleri kaydedildi. Ayrıca hücre nükleusunun görüntülediği DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Cytocell; Cat No: DES150L) boyamalarında floresan mikroskopta, x63 büyütme ile görüntüler alındı. Otomatik hücre görüntüleme sistemi (Juli Stage) ile x20 büyütme kullanılarak yapılan hücre görüntülemesi için hücreler, santrifüj ile yüzeye yapıştırıldı. Üzerlerine oluşan hücre peletine zarar vermeden 100 µl 37°C PBS ilave edildi. Görüntü alınana kadar karanlıkta saklandı. Floresan mikroskopta, x63 büyütme yaparak görüntüleme için hücreler, santrifüj ile yüzeye yapıştırıldı. Üzerlerine, DAPI boyamasına kadar oluşan hücre peletine zarar vermemek için 100 µl 37°C PBS ilave edildi. DAPI boyaması öncesi pelete zarar vermeden üstteki PBS atıldı. Üzerine DAPI solüsyonu ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra görüntü alındı.

3.3.4. Oksidatif Stres, Antioksidan Enzimler ve Otofaji İlişkili Gen Ürünü Proteinlerin Ekspresyon Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Saptanması

Ticari olarak temin edilen antikörlerin çalışıp çalışmadığının kontrol edilmesi ve PBMC kaynaklı yaşanabilecek bir problemin ortaya çıkıp çıkmayacağını kontrolü için, öncelikle kontrol deneyleri yapıldı. Kontrol deneyleri sağlıklı PBMC ve fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Protein İzolasyonu: Deneyin tamamı buz üzerinde gerçekleştirildi. Hücre içi ATP, ROS ve mitokondri membran potansiyeli deneylerinden geriye kalan tüm hücreler kullanılarak protein izolasyonu yapıldı. Hücrelerin üzerine +4°C, 5 ml PBS ilave edildi. +4°C, 2500 x g, 5 dakika santrifüj yapılarak, süpernatant atıldı. +4°C'de 5 ml RIPA tamponu (Thermo; Cat No: 89901) içine ½ tablet proteaz inhibitörü (Thermo; Cat No: A32955) koyularak iyice çözünmesi sağlandı. PBMC peletinin üzerine hazırlanan RIPA tamponundan 5x10⁶ hücre başına 500 µl olacak şekilde ilave edildi. Hücreler eklenecek tampon içinde çözünene kadar pipet ile iyice karıştırıldı. Buz üstünde her 5 dakikada bir vorteksenerek 30 dakika çalkalayıcıda bekletildi. +4°C, 14.000 x g, 15 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant 1,5 ml'lik steril ependorflara aktarılarak western blot deneyine kadar -80°C'de saklandı.

Protein Miktarının Bradford Yöntemi İle Belirlenmesi: Protein miktarının Bradford yöntemi ile belirlenmesinde kullanılacak standartlar, ticari olarak temin edilen BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma; Cat No: A7906) ile ddH₂O kullanılarak ölçümlerin öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Standartlar; 0,125-0,25-0,5-1-2-5-10 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Hazırlanan her bir standarttan ve protein örneğinden 2 µl alınarak opak-düz taban well plate'e koyuldu. Üzerlerine 200 µl oda sıcaklığına getirilmiş Bradford çözeltilisinden (Sigma; Cat No: B6916) ilave edildi. 1 dakika çalkalayıcıya koyuldu. Sonrasında hiç ışık almayacak şekilde kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi. Ölçümler SpectraMax-M2 makinası ile alındı ve sonuçlar, standart grafiklerin optimum değerinde olduğu kontrol edilerek kaydedildi.

Western Blot Analizi: RT-PZR analizinde alınmış olan mRNA ekspresyon sonuçlarının protein düzeyinde de kontrol edilmesi amacıyla yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı gruptaki en yüksek ve en düşük ilk üç mRNA ekspresyon seviyelerine sahip olan iki birey seçilerek, western blot analizi gerçekleştirilmiştir.

Tamponların Hazırlanması

10x Yürütme Tamponu: 30,3 g tris (Sigma; Cat No: T6066), 144,1 g glisin (ICN; Cat No: 194825) ve 10 g SDS (sodyum dodesil sülfat) (Sigma; Cat No: L4390) tartılıp 1L ddH₂O'ya tamamlanarak hazırlandı. Deney sırasında 1x'e ddH₂O ile sulandırılarak kullanıldı.

10x TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20) Tamponu: 24,228 g tris ve 87,66 g NaCl (sodyum klorür) (Merck; Cat No: 1.06404) tartılıp 1 L ddH₂O'ya tamamlanarak hazırlandı. pH 7,6 olması için HCl (Sigma; Cat No: 30721) muamelesi uygulandı. % 0,2 Tween 20 (Sigma; Cat No: P8942) ilavesi gerçekleştirildi. Deney sırasında 1x'e ddH₂O ile sulandırılarak kullanıldı.

5x Transfer Tamponu: Ticari olarak temin edilen kit (BioRad, Trans-Blot Turbo RTA Mini PVDF Transfer Kit, Cat No: 1704272) ile temini sağlanmıştır. Deney sırasında 1x'e

kit protokolüne uygun olarak 200 µl 5x transfer tamponu, 200 µl etanol 600 µl ddH₂O ile sulandırılarak kullanıldı.

Jelin Hazırlanması

Deneyde, çalışılan proteinler ve ağırlıklarına (kDa) uygun olarak 3 farklı jel hazırlandı.

Çizelge 3.11. Çalışılan proteinler, ağırlıkları ve kullanılan jel yüzdeleri.

Çalışılan Proteinler	Ağırlıkları (kDa)	Kullanılan Jel (%)
Keap1	69,7	10
p62	62	10
Beclin1	52	10
LC3B	19-17	14
Nrf2	110	7,5
mTOR	289	7,5
Aktin	42	10-14-7,5

Çizelge 3.12. Western blot jeli için gerekli kimyasalların hazırlanması.

Gerekli Kimyasallar	Hazırlanışı
%40'lık akrilamid solüsyonu	Ticari olarak temin edilmiştir (Thermo Sci.).
1,5 M Tris pH 8,8 tampon	18, 171 g tris tartılıp 100 ml ddH ₂ O'ya tamamlandı. pH 8,8 olması için HCl muamelesi uygulandı.
0,5M Tris pH 6,8 tampon	6,057 g tris tartılıp 100 ml ddH ₂ O'ya tamamlandı. pH 8,8 olması için HCl muamelesi uygulandı.
%10'luk SDS	2 g SDS tartılıp 20 ml'ye ddH ₂ O ile tamamlandı.
%10'luk APS (Amonyum Persülfat)	3 jel için 40 mg APS (BioRad; Cat No: 161-0700) tartılıp 400 µl'ye ddH ₂ O ile tamamlandı. Her zaman taze hazırlandı.

TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Ticari olarak temin edilmiştir. (BioRad; Cat No: 161-0800)
---------------------------------------	---

Çizelge 3.13. Western blot çalışmasında hazırlanan jeller.

Jel İçerikleri	% 7,5	%10	%14
Ayırıcı (Separating) Jel			
ddH ₂ O	4,3 ml	3,8 ml	3 ml
%40'lık akrilamid solüsyonu	1,5 ml	2 ml	2,8 ml
1,5 M Tris pH 8,8 tampon	2 ml	2 ml	2 ml
%10'luk SDS	80 µl	80 µl	80 µl
%10'luk APS	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl
Toplama (Stacking) Jel	% 4		
ddH ₂ O	3,1 ml		
%40'lık akrilamid solüsyonu	0,5 ml		
0,5M Tris pH 6,8 tampon	1,25 ml		
%10'luk SDS	50 µl		
%10'luk APS	50 µl		
TEMED	5 µl		

Dikey elektroforez işlemi için ayırıcı (separating) jel steril bir falkonda hazırlanarak kasetlere döküldü. Üzerine izopropanol (Amresco; Cat No: 0918) eklenerek yaklaşık 15 dakika donması beklendi. Ayırıcı jel üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı. Toplama (stacking) jel steril bir falkonda hazırlanarak, kasetlere döküldü. Taraklar yerleştirilerek polimerizasyon tamamlanıncaya kadar beklendi.

Yüklenecek Proteinlerin Hazırlanması, Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Bradford yöntemi ile yapılan ölçümlere göre her protein örneği toplamda 30 µg olacak şekilde hazırlandı. %10 merkaptotanol içeren 4X Laemli tampon (BioRad; Cat No: 1610747) hazırlanarak, 1:3 oranında (merkaptotanol+Laemli:30 µg protein/1:3) protein örnekleri ile iyice karıştırıldı. Hazırlanan protein örnekleri 95°C’de 5 dakika bekletilerek denatüre edildi. Denatürasyon işlemi sırasında hazırlanan jeller, tanklara yerleştirildi. Her bir deneyde 3 jel ile çalışıldı. Tanka yerleştirilen jellerin üzerine 1x yürütme tamponu eklendi. Taraklar çıkartılarak jeller proteinlerin yüklenmesine hazır hale getirildi. Denatürasyonu tamamlanan protein lizatları, her kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde jele yüklendi. İlk kuyucuğa standart belirteç yüklemesi yapıldı. Düşük ve yüksek protein ağırlıkları göz önünde bulundurularak 2 farklı standart belirteç (Biorad, Precision Plus Protein Dual Color Standarts, Cat No: 161-0374; Thermo Sci., Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, Cat No: 26625) kullanıldı. Jelin yürütmesi için 80 Volt’ta yaklaşık 2 saat (belirteç tamamen ayrılanaya kadar) örnekler yürümeye bırakıldı.

Membrana Transfer

Jelin membrana transferinde ilgili firmanın ekipmanları ve kiti (BioRad, Trans-Blot Turbo RTA Mini PVDF Transfer Kit, Cat No: 1704272) kullanıldı. PVDF membran 5 dakika etanol içerisinde bekletildi, sonrasında transfer gerçekleştirilene kadar 1x transfer tamponunun bulunduğu kaba alındı. Kit içerisinde bulunan filtre kağıdı, yaklaşık 3 dakika 1x transfer tamponunda bekletildi. Jeller dikkatli bir şekilde kasetlerden çıkartılarak 1x transfer tamponuna koyuldu. Ticari olarak temin edilen kit protokolüne uygun olarak transfer işleminin gerçekleşmesi için, transfer cihazına sırasıyla filtre kağıdı, PVDF membran, jel, filtre kağıdı olacak şekilde yerleştirildi. Yarı ıslak yöntem (BioRad, Trans-Blot Turbo Transfer System, Cat No: 1704150) ile küçük proteinler için “standart”, yüksek ağırlığa sahip proteinler için “High MW”, 30 dakika optimizasyonu ile ilgili firmanın protokolleri izlenerek transfer işlemi tamamlandı.

Bloklama İşlemi

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran üzerine, önceden hazırlanan %5’lik süt tozu (2,5 g süt tozu tartılıp, 50 ml’ye 1x TBST ile tamamlanarak hazırlanır.) ilave edilerek 1,5 saat çalkalayıcıda, oda sıcaklığında bloklama işlemi yapıldı.

Primer/Sekonder Antikor İle Muamele ve Görüntüleme

%5'lik süt tozu ile hazırlanan antikorlar ile membranlar, gece boyu +4°C'de karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membranlar, 1x TBST ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Yıkanan membranlar, sekonder antikor ile 1 saat oda, sıcaklığında, çalkalayıcıda muamele edildi. Sekonder antikor ile muamele sonrası membranlar, 1x TBST ile 3 kez 10 dakika yıkandı. Yıkanan membranlar, ticari olarak temin edilen kit (BioRad, Clarity Western ECL Substrate, 1705061) protokolüne uygun olarak, 7ml ECL ile karanlık odada görüntüleri alındı.

Çizelge 3.14. Western blot yönteminde kullanılan antikorlar.

Antikorlar	Üretici Firma	Dlüsyon oranı
Primer Antikorlar		
Keap1	Thermo Sci., Cat No: MA5-17106	1:1000
p62	Abnova, Cat No: H00008878	1:1000
Beclin1	Thermo Sci., Cat No: MA5-25480	1:1000
LC3B	Thermo Sci., Cat No: PA1-16930	1:1000
Nrf2	Thermo Sci., Cat No: PA5-27882	1:1000
mTOR	Thermo Sci., Cat No: 14-2190-82	1:200
Aktin	Thermo Sci., Cat No: MA5-15739	1:1000
Sekonder Antikorlar		
Sekonder Antikor-Mouse	Thermo Sci., Cat No: 31430	1:5000
Sekonder Antikor-Rabbit	Thermo Sci., Cat No: 31460	1:5000

3.4. İstatistiksel Analiz

Analizler IBM SPSS Statistics 23 programı kullanılarak yapılmıştır. Sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, ortanca gibi tanımlayıcı istatistiklerden uygun olanlar verilmiştir. İki bağımsız grup arasındaki farklılığa, normallik varsayımı sağlandığında “İki Ortalama Arasındaki Farkın Anlamlılık Testi (Independent t Test)” ile, sağlanmadığından ise “Mann-Whitney U Testi” ile incelenmiştir. İki'den fazla bağımsız

grup arasındaki farklılığa, parametrik test varsayımları sağlandığında “Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA)” ile, sağlanmadığında “Kruskal Wallis Testi” ile bakılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. SONUÇLAR

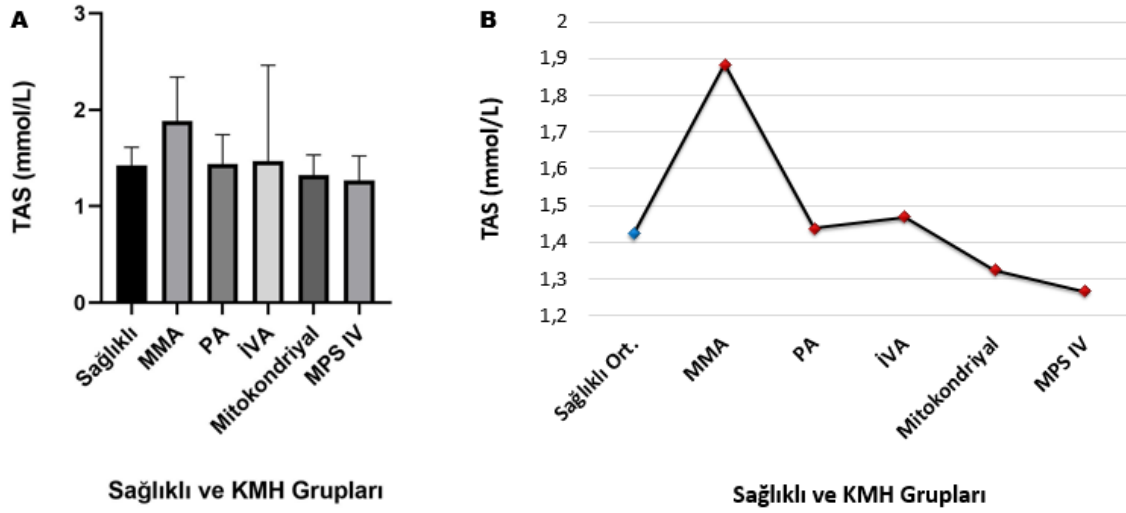
Bu tez çalışmasına; MMA, PA, İVA, mitokondriyal ve MPS IV olmak üzere KMH tanısı konan toplam 45 hasta ve 6 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Oksidatif stresin, mitokondriyal disfonksiyon ve otofaji yolağının; TAS/TOS analizleri, hücre içi ATP, ROS ve mitokondri membran potansiyelinin nicel analizleri ve görüntülenmesi, RT-PZR ve western blot analizleri kullanılarak KMH’lar ile olan ilişkisi incelenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular ve istatistiksel analizler aşağıda açıklanmaktadır.

4.1.1. TAS (Total Antioksidan Seviye) /TOS (Total Oksidan Seviye) Analizleri

4.1.1.1. TAS Analiz Sonuçları

Sağlıklı grup ile 5 farklı KMH hasta grubu; TAS değerleri açısından incelendiğinde gruplar arasında elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,004$). Yapılan ileri istatistiksel analizlerle KMH grubunda anlamlı bulunan hastalık gruplarının MMA, MİT ve MPS IV grupları olduğu saptandı. MMA/MİT ($p=0,012$) ve MMA/MPS IV ($p=0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak yüksek anlamlı fark olduğu gösterildi.

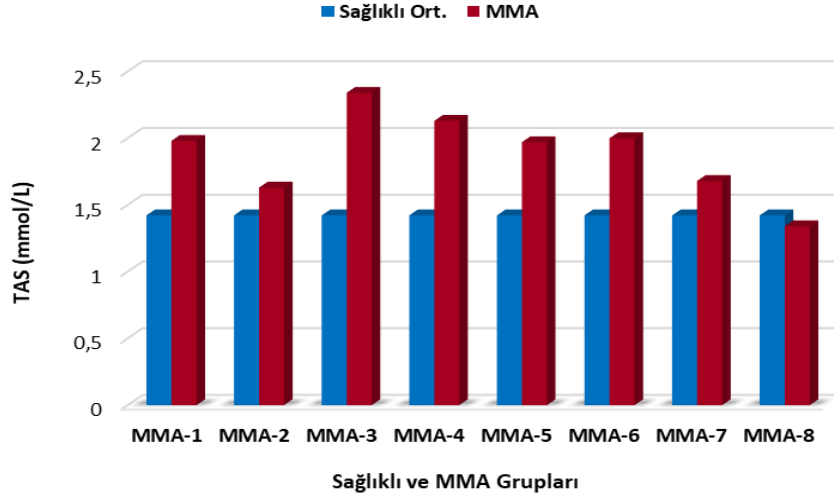
Hasta ve sağlıklı grupların ortalama TAS değerleri açısından incelemesi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Sağlıklı ve KMH gruplarının TAS ortalaması; A-bar grafiği, B-çizgi grafiği.

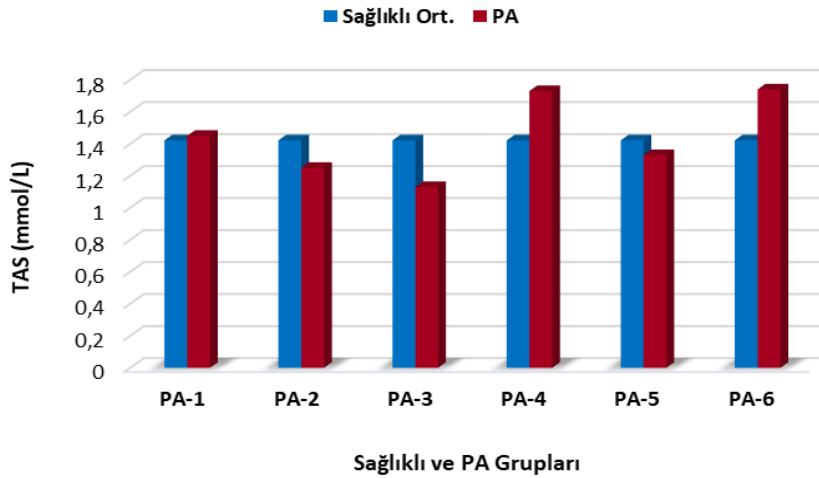
Ortalama değerler açısından sağlıklı ile KMH grupları karşılaştırıldığında en yüksek TAS değeri MMA grubunda saptanmıştır. Sağlıklı ve MMA grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanırken ($p=0,005$), diğer KMH gruplarının sağlıklı bireyler ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. TAS ortalama değerlerine göre çizilen grafikler incelendiğinde, PA ve İVA gruplarının sağlıklı grubun TAS değerlerine oldukça yakın olduğu, MİT ve MPS IV gruplarının ise sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen, daha düşük TAS değerine sahip olduğu bulundu.

KMH grubundaki her bir birey, TAS verileri açısından sağlıklı grup ortalaması ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu şekilde hem hastaların bireysel analizleri ve farklılıkları hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenirken, diğer yandan sağlıklı gruba göre daha yüksek veya düşük TAS ortalama değerlerine sahip olan hastaların istatistiksel analizler ile grup içi farklılaşmalarının kontrolünün yapılması sağlandı. TAS değerleri açısından KMH gruplarındaki her bir bireyin sağlıklı grubun ortalamasına göre karşılaştırıldığı grafikler aşağıda gösterilmektedir.



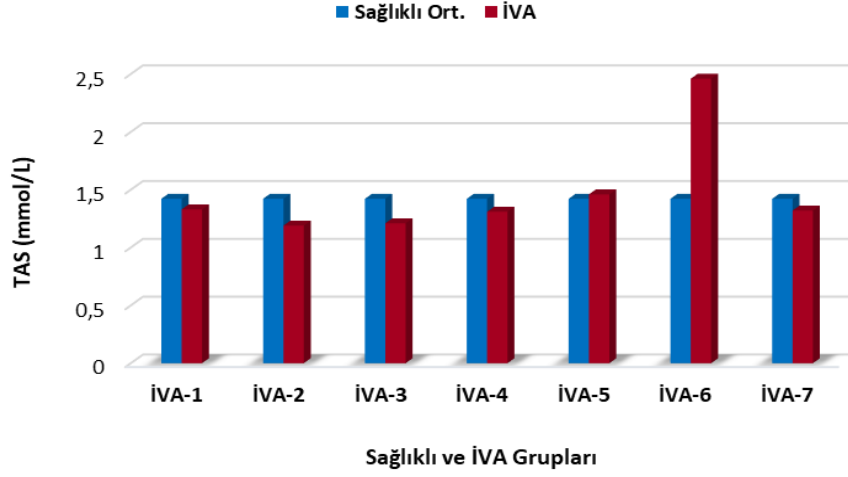
Şekil 4.2. Sağlıklı ve MMA gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve MMA grupları TAS değerleri açısından karşılaştırıldığında, çalışmaya dahil edilen 1 hasta birey hariç sağlıklı gruba göre daha yüksek TAS miktarı belirlendi. MMA grubunda genel olarak sağlıklıya oranla TAS değeri artışı olduğu bulundu.



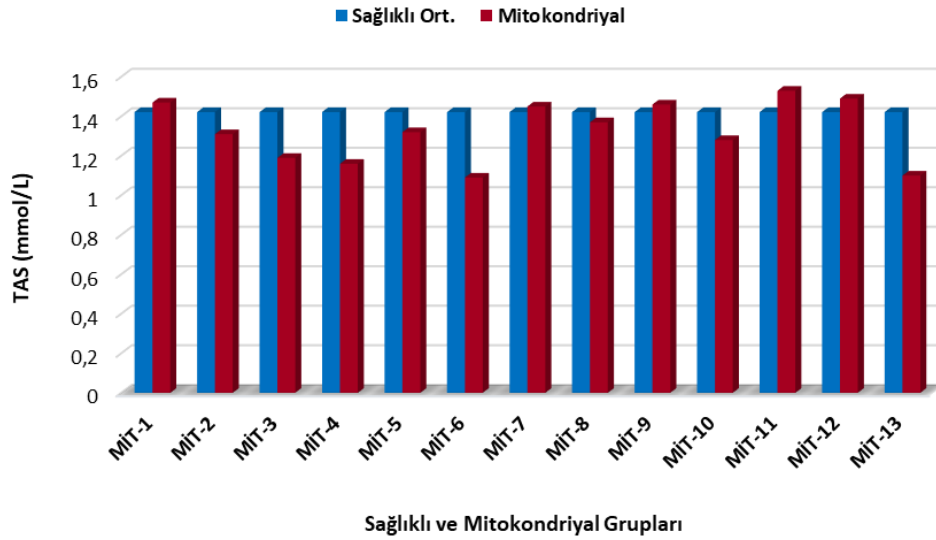
Şekil 4.3. Sağlıklı ve PA gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması.

Çalışmada PA tanısı olan hasta bireyler, grup içerisinde sağlıklı grubun ortalamasına kıyasla TAS miktarları için daha düşük veya yüksek olmak üzere 2 farklı şekilde sonuç vermesine rağmen, grup içi farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,1$). TAS değerleri açısından PA grubundaki bireyler karşılaştırıldığında sağlıklı gruba göre anlamlı bir yükseklik ya da düşüklük bulunmadı.



Şekil 4.4. Sağlıklı ve İVA gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması.

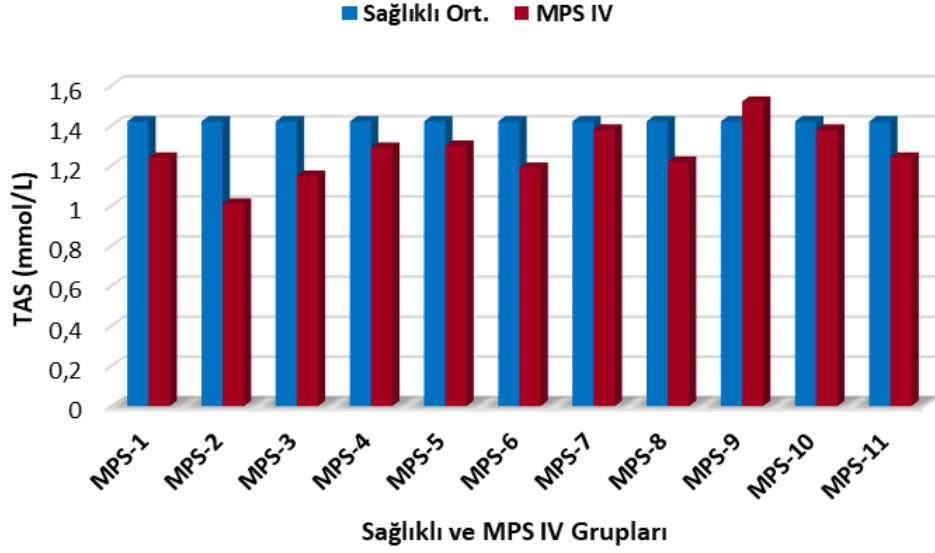
Sağlıklı bireyler ve İVA hasta grupları TAS değerleri açısından karşılaştırıldığında, çalışmaya dahil edilen 2 hasta hariç sağlıklı gruba göre daha düşük TAS miktarı bulundu. İVA grubunda genel olarak TAS miktarı seviyesinde düşüklük olduğu saptandı. İVA grubu ile sağlıklı grup arasında görülen farkın, MMA grubu ile sağlıklı grubun arasında görülen farka göre daha az ve ters orantılı olduğu tespit edildi.



Şekil 4.5. Sağlıklı ve mitokondriyal gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı grubun TAS ortalamasıyla karşılaştırıldığında çalışmaya dahil edilen 13 mitokondriyal hastalık sahibi bireyden 8'i düşük, 5'i ise yüksek TAS miktarına sahiptir.

Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında yüksek ve düşük TAS değerleri saptanan bireyler arasında yapılan değerlendirme sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,002$). Grup içi TAS değerlerinde sağlıklı gruba göre az ve çok olmak üzere iki farklı grup dağılımı gözlemlendi.



Şekil 4.6. Sağlıklı ve MPS IV gruplarının TAS değerleri açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve MPS IV grupları TAS değerleri açısından karşılaştırıldığında, çalışmaya dahil edilen 1 hasta hariç sağlıklı gruba göre düşük TAS değerleri gözlemlendi. MPS IV grubunda TAS miktarının sağlıklı bireylere göre genel olarak azalma gösterdiği bulundu.

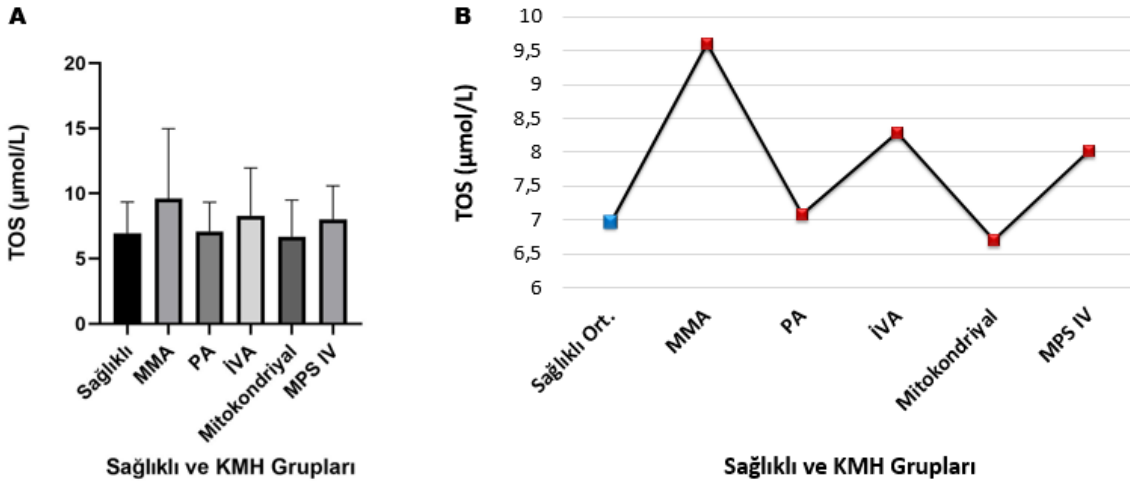
4.1.1.2. TOS Analiz Sonuçları

Sağlıklı grup ile 5 farklı KMH hasta grubu; TOS değerleri açısından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,66$). Her bir KMH grubunun sağlıklı grup ile istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda da anlamlı bir fark elde edilmedi.

Çizelge 4.1. Sağlıklı ile KMH gruplarının TOS değerleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Gruplar	p (Mann-Whitney U)
Sağlıklı-MMA	0,414
Sağlıklı-PA	0,937
Sağlıklı-İVA	0,534
Sağlıklı-MİT	0,701
Sağlıklı-MPS IV	0,462

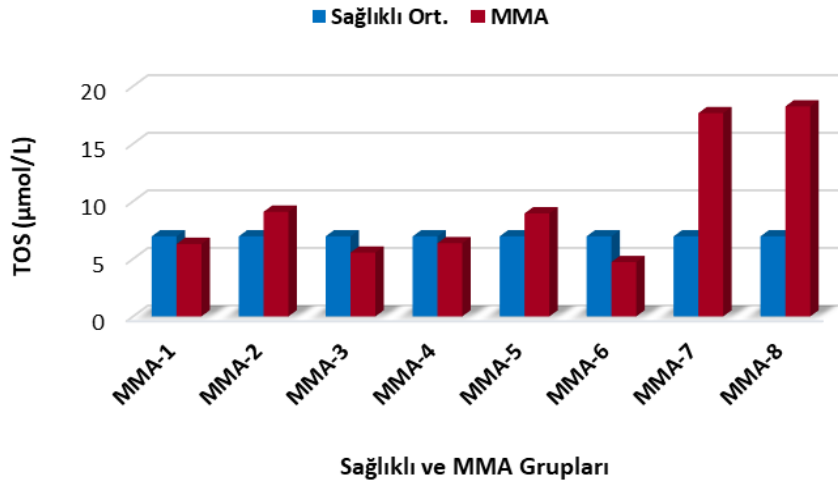
Hasta ve sağlıklı grupların ortalama TOS değerleri açısından incelemesi Şekil 4.7’de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Sağlıklı ve KMH gruplarının TOS ortalaması; A-bar grafiği, B-çizgi grafiği.

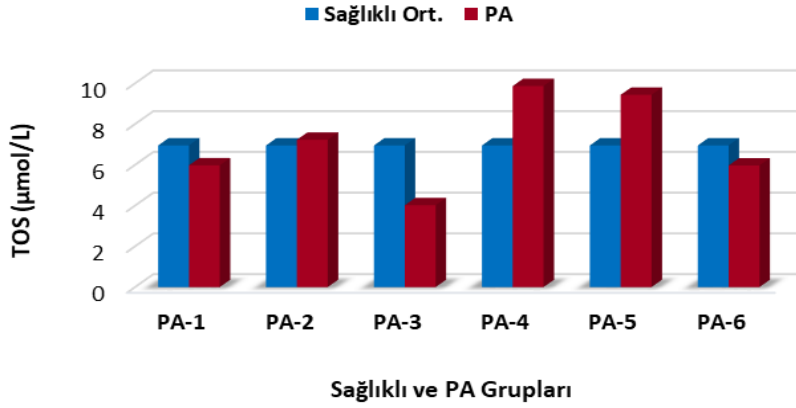
Saptanan TOS ölçümü ortalama değerlerine göre çizilen grafikler incelendiğinde, PA ve MİT gruplarının sağlıklı grubun TOS değerlerine oldukça yakın olduğu; sırasıyla MMA, İVA ve MPS IV gruplarının ise sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın, daha yüksek TOS değerine sahip olduğu bulundu.

KMH grubundaki her bir birey tek tek ele alınarak, TOS verileri açısından sağlıklı grup ortalaması ile karşılaştırıldı. Bu şekilde hastaların bireysel TOS değerleri hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenirken, diğer yandan sağlıklı gruba kıyasla daha yüksek ve düşük TOS ortalama değerlerine sahip olan hastaların istatistiksel analizler ile grup içi farklılaşmalarının kontrolü sağlandı. TOS değerleri açısından KMH gruplarındaki her bir bireyin sağlıklı grubun ortalamasına göre karşılaştırıldığı grafikler aşağıda gösterilmektedir.



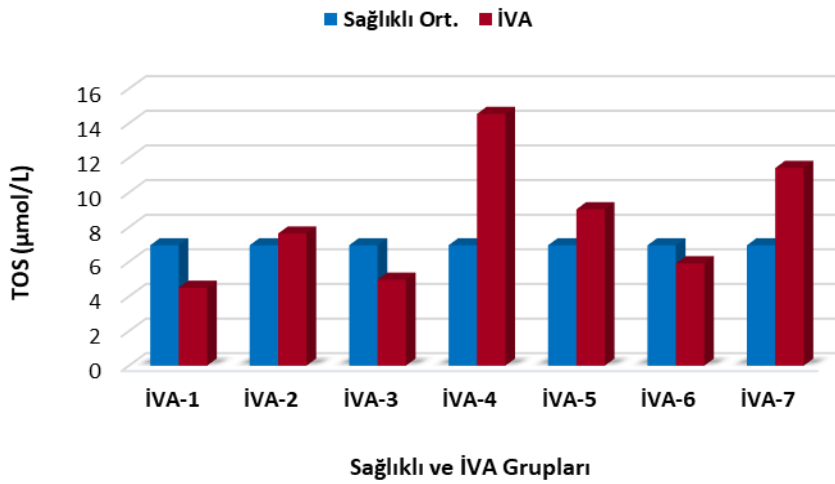
Şekil 4.8. Sağlıklı ve MMA gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması.

Yüksek ve düşük TOS değerleri saptanan MMA hastası bireyler arasında yapılan istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark olduğu bulundu ($p=0,029$). MMA grubunda TAS değerlerinde sağlıklı gruba göre az ve çok TOS miktarları olmak üzere iki farklı sonuç elde edildi.



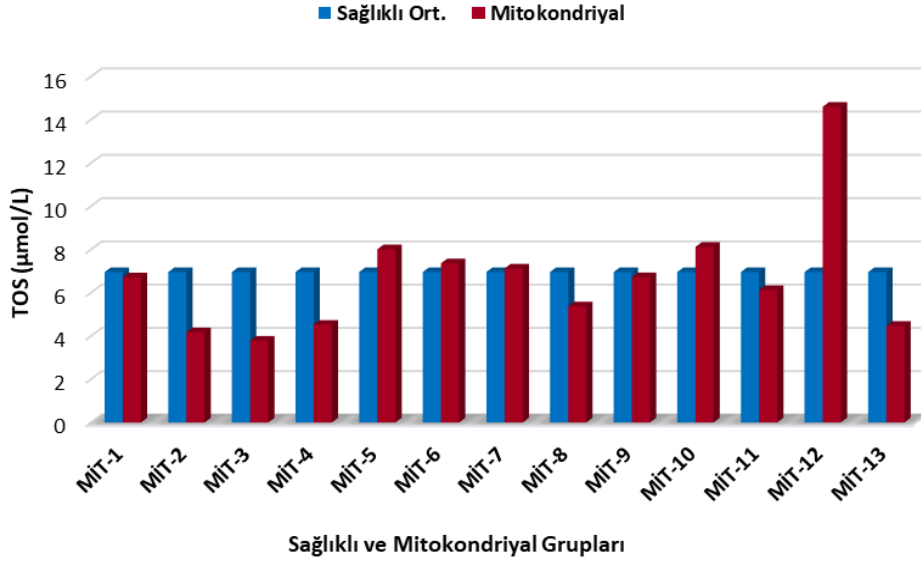
Şekil 4.9. Sağlıklı ve PA gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması.

Çalışmaya dahil edilen PA hastaları, TOS miktarları açısından grup içerisinde sağlıklı grubun ortalamasına kıyasla daha düşük ve yüksek olmak üzere 2 farklı seviyede değere sahipken, grup içi farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,1$). TOS değerleri açısından PA grubu bireyler karşılaştırıldığında sağlıklı gruba göre anlamlı bir yükseklik ya da düşüklük yoktur.



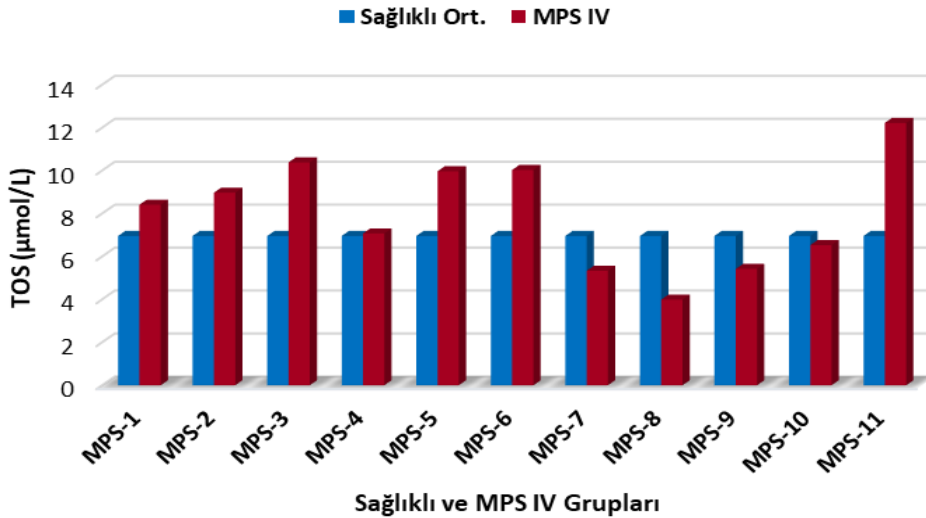
Şekil 4.10. Sağlıklı ve İVA gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması.

İVA hastaları, grup içerisinde sağlıklı grubun ortalamasına kıyasla daha düşük ve yüksek olmak üzere değişkenlik göstermesine rağmen, grup içi farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,057$). İVA grubu hastaları arasında özellikle 3 hastanın, TOS değerleri açısından sağlıklı gruba göre anlamlı bir yükseklik gösterdiği saptandı.



Şekil 4.11. Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı grubun TOS ortalamasıyla karşılaştırıldığında çalışmada yer alan 13 mitokondriyal hastalık tanısı ile izlenen bireyden 8'i düşük, 5'i yüksek TOS değerine sahiptir. Yüksek ve düşük TOS değerleri saptanan hastalar arasında yapılan istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark olduğu bulundu ($p=0,002$). Mitokondriyal hastalık grubunda hastalar arasında TOS değerlerinde sağlıklı gruba göre az ve çok olmak üzere farklı değerler bulundu.



Şekil 4.12. Sağlıklı ve MPS IV gruplarının TOS değerleri açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı grubun TOS ortalamasıyla karşılaştırıldığında çalışmaya dahil edilen 11 MPS IV hastasından 4'ü düşük, 7'si ise yüksek TOS değerine sahiptir. Yüksek ve düşük TOS değerleri saptanan hastalar arasında yapılan istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark olduğu bulundu ($p=0,006$). MPS IV hastalarında TOS değerlerinde sağlıklı gruba göre daha düşük ve yüksek değerler gözlemlendi.

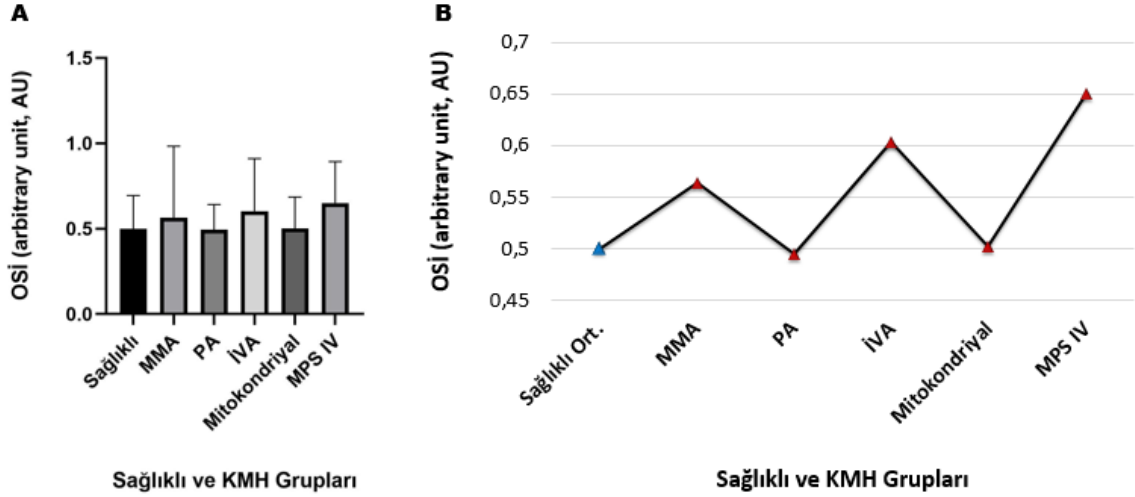
4.1.1.3. OSİ Analiz Sonuçları

Sağlıklı grup ile 5 farklı KMH hasta grubu; OSİ değerleri açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,64$). Her bir KMH grubunun sağlıklı grup ile OSİ değerleri açısından karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Çizelge 4.2. Sağlıklı ile KMH gruplarının OSİ değerleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Gruplar	p (Mann-Whitney U)
Sağlıklı-MMA	0,755
Sağlıklı-PA	0,937
Sağlıklı-İVA	0,628
Sağlıklı-MİT	0,966
Sağlıklı-MPS IV	0,256

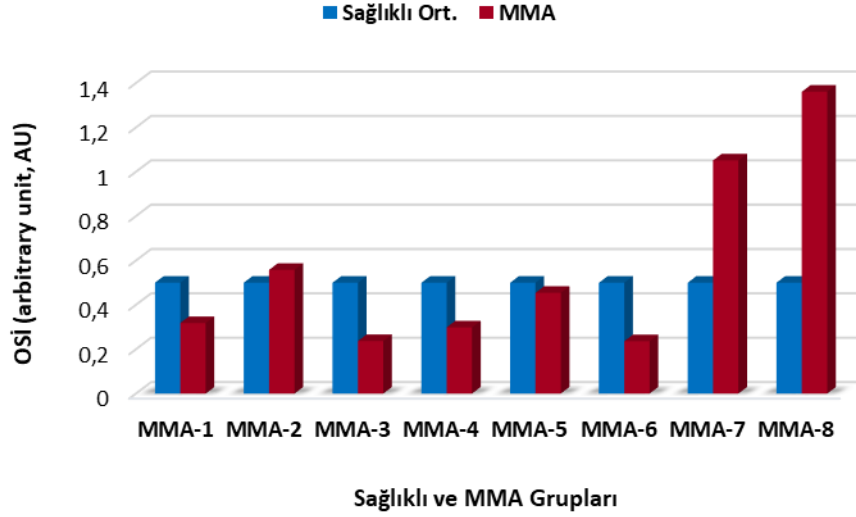
Hasta ve sağlıklı grupların ortalama OSİ değerleri açısından incelemesi Şekil 4.13'te gösterilmektedir.



Şekil 4.13. Sağlıklı ve KMH gruplarının OSİ ortalaması; A-bar grafiği, B-çizgi grafiği.

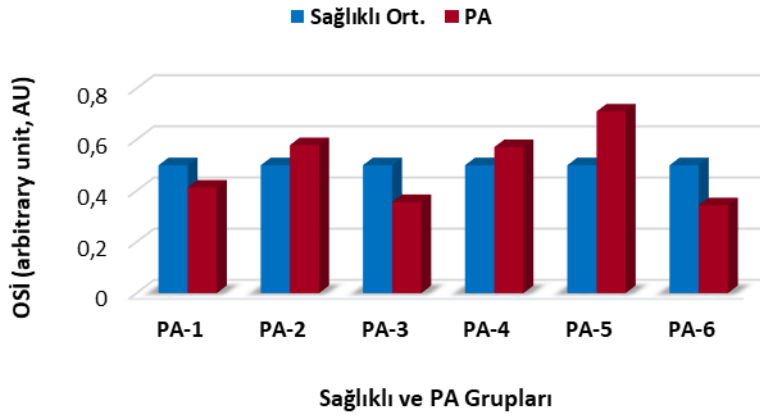
OSİ ortalama değerlerine göre çizilen grafikler incelendiğinde, PA ve MİT hasta gruplarının sağlıklı grubun OSİ değerlerine oldukça yakın olduğu; sırasıyla MPS IV, İVA ve MMA gruplarının ise sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın, daha yüksek OSİ değerine sahip olduğu bulundu.

Hasta gruplarındaki her bir bireye ait OSİ verileri sağlıklı grup ortalaması ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu şekilde hem hastaların bireysel analizleri hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenirken, diğer yandan sağlıklı gruba kıyasla daha yüksek ve düşük OSİ ortalama değerlerine sahip olan hastaların istatistiksel analizler ile grup içi farklılaşmalarının kontrolü sağlandı. OSİ değerleri açısından KMH gruplarındaki her bir bireyin sağlıklı grubun ortalamasına göre karşılaştırıldığı grafikler aşağıda gösterilmektedir.



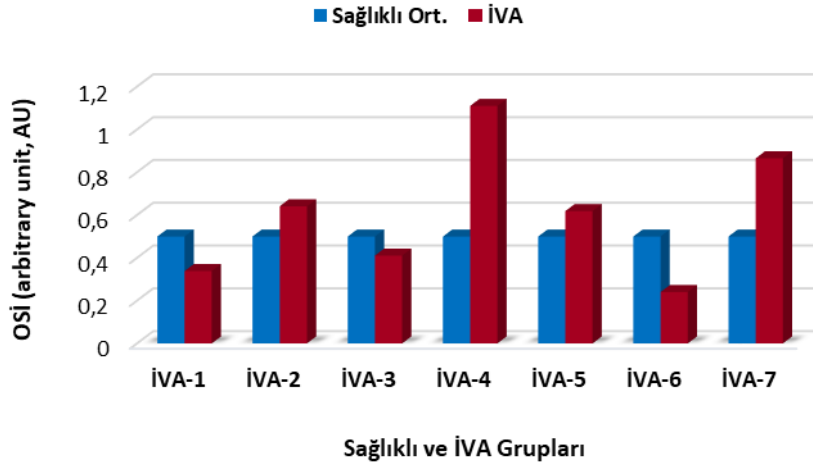
Şekil 4.14. Sağlıklı ve MMA gruplarının OSI değerleri açısından karşılaştırılması.

Yüksek ve düşük OSI değerleri saptanan MMA hastaları arasında yapılan istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark olduğu bulundu ($p=0,036$). MMA grubuna ait OSI değerlerinde sağlıklı gruba göre az ve çok olmak üzere iki farklı grup davranışı gözlemlendi. 2 hastada ise hem hasta hem de sağlıklılara oranla yüksek değerler bulundu.



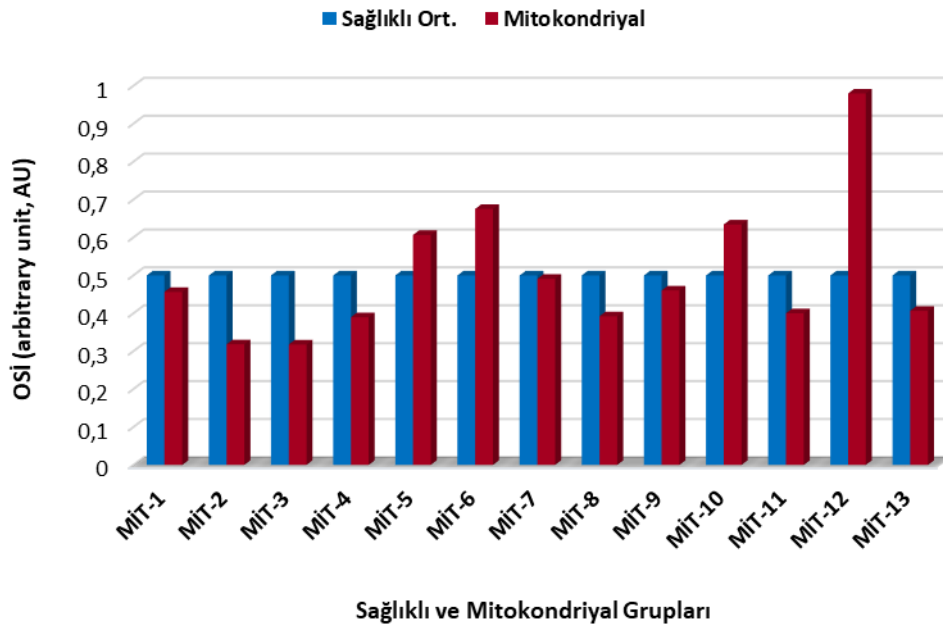
Şekil 4.15. Sağlıklı ve PA gruplarının OSI değerleri açısından karşılaştırılması.

PA tanısı alan hasta bireyler, grup içerisinde sağlıklı grubun ortalamasına kıyasla daha düşük ve yüksek OSI değerine sahipken, grup içi farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,1$). OSI değerleri açısından PA grubu bireyleri kendi içinde karşılaştırıldığında sağlıklı gruba göre önemli bir değişiklik saptanmadı.



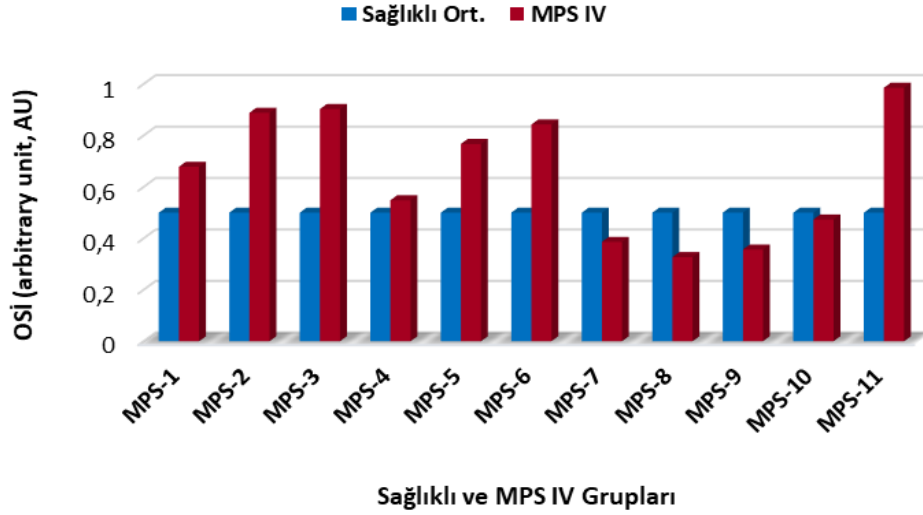
Şekil 4.16. Sağlıklı ve İVA gruplarının OSI değerleri açısından karşılaştırılması.

İVA hastalarında, OSI değerleri açısından grup içerisinde sağlıklı grubun ortalamasına göre nispeten daha düşük ve yüksek değerler saptanırken, grup içi farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,057$). İVA hastaları arasında özellikle 2 hastanın, OSI değerleri açısından sağlıklı gruba göre anlamlı bir yükseklik gösterdiği bulundu.



Şekil 4.17. Sağlıklı ve mitokondriyal gruplarının OSI değerleri açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı grubun OSİ ortalamasıyla karşılaştırıldığında 13 mitokondriyal hastalık düşünülen hasta bireyden 9'u düşük, 4'ü yüksek OSİ değerine sahiptir. Yüksek ve düşük OSİ değerleri saptanan bireyler arasında yapılan istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark olduğu saptandı ($p=0,003$). Mitokondriyal hastalık grubunda yer alan bireyler arasında OSİ değerlerinde sağlıklı gruba göre düşük ve yüksek olmak üzere farklı değerler bulundu.



Şekil 4.18. Sağlıklı ve MPS IV gruplarının OSİ değerleri açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı grubun OSİ ortalamasıyla karşılaştırıldığında 11 MPS IV hastasından 4'ü düşük, 7'si yüksek OSİ değerine sahiptir. Yüksek ve düşük OSİ değerleri saptanan hastalar arasında yapılan istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark bulundu ($p=0,006$). MPS IV hasta grubundaki bireylerin OSİ değerlerinde sağlıklı gruba göre düşük ve yüksek değerler olmak üzere değişiklik olduğu bulundu.

4.1.2. RT-PZR Analizleri

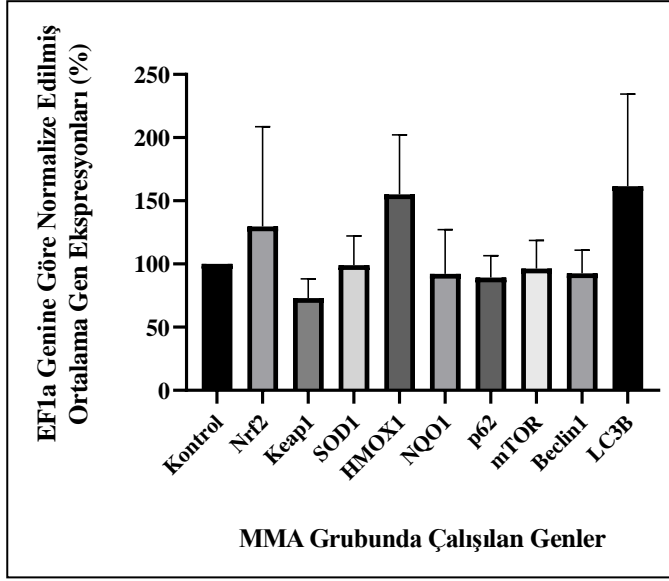
Sağlıklı grup ile 5 farklı hasta grubunda yer alan bireylerde; oksidatif stres, antioksidan yanıt ve otofaji yollarında görev alan *NRF2*, *KEAP1*, *SOD1*, *HMOX1*, *NQO1*, *p62*, *mTOR*, *BECN1* ve *LC3B* genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri ile incelendi. Hasta ve sağlıklı gruplarında yer alan tüm bireylerde incelenen genler açısından yapılan analizler sonucu istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmadı ($p<0,05$).

Tüm hasta gruplarının sağlıklı grup ile karşılaştırılmasında Mann-Whitney testi uygulandı. Analiz sonucunda MMA grubu ile sağlıklı grup arasında, *KEAPI* (p=0,029), *HMOX1* (p=0,043) ve *LC3B* (p=0,043) gen ekspresyonlarında anlamlı bir farklılık olduğu saptanırken, diğer genlerin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. PA ve İVA gruplarının sağlıklı grup ile tüm genler açısından karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MİT (p=0,007) ve MPS IV (p=0,048) grupları ile sağlıklı grup arasında, *LC3B* ekspresyonları seviyesinde anlamlı bir farklılık olduğu saptanırken, diğer genlerin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

RT-PZR sonuçları, her bir hasta grubunda incelenen genlerin ekspresyon seviyelerindeki kat değişimlerini gözlemlemek için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri kullanılarak da analiz edildi. Sağlıklı ve her bir KMH grubunun *EF1a* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri aşağıdaki çizelgede gösterilmiş ve sağlıklı gruba kıyasla gen ekspresyonlarının % değişimleri arasındaki farklar grafiklerde verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sağlıklı ile MMA gruplarının *EF1a* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri (ORT: ortalama)

Çalışma Grubu	<i>EF1a</i> Genine Göre Normalize Edilmiş Gen Ekspresyonları (%)								
	<i>NRF2</i>	<i>KEAPI</i>	<i>SOD1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>NQO1</i>	<i>p62</i>	<i>mTOR</i>	<i>BECN1</i>	<i>LC3B</i>
Sağlıklı	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MMA-1	114	58	116	146	65	75	115	93	109
MMA-2	68	64	105	93	152	69	112	87	116
MMA-3	96	74	67	176	95	93	109	88	322
MMA-4	135	65	109	174	93	113	81	134	161
MMA-5	183	106	111	233	33	98	120	97	203
MMA-6	95	80	129	95	104	80	81	76	124
MMA-7	297	74	91	184	80	112	97	75	155
MMA-8	50	63	65	140	115	74	55	90	103
ORT.	130	73	99	155	92	89	96	93	162

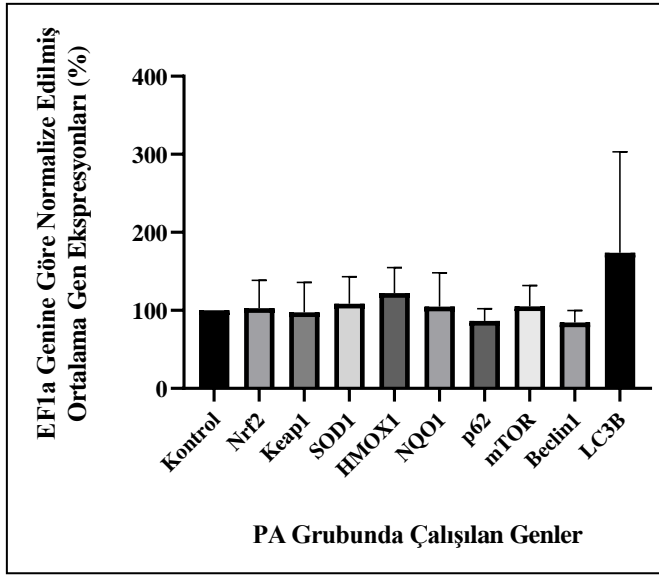


Şekil 4.19. Sağlıklı ve MMA gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri.

MMA grubu sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında; *NRF2* (%30), *HMOX1* (%55) ve *LC3B* (%62) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı düzeyde artış gözlemlendi. *KEAP1* (%27) gen ekspresyonu seviyesi anlamlı düzeyde azalırken, diğer gen ekspresyonlarında çok daha düşük seviyelerde azalma saptandı.

Çizelge 4.4. Sağlıklı ile PA hastalarının *EF1a* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri (ORT: ortalama).

Çalışma Grubu	<i>EF1a</i> Genine Göre Normalize Edilmiş Gen Ekspresyonları (%)								
	<i>NRF2</i>	<i>KEAP1</i>	<i>SOD1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>NQO1</i>	<i>p62</i>	<i>mTOR</i>	<i>BECN1</i>	<i>LC3B</i>
Sağlıklı	100	100	100	100	100	100	100	100	100
PA-1	82	74	60	126	75	74	75	82	74
PA-2	60	53	167	162	84	86	143	73	429
PA-3	156	108	101	111	86	94	125	91	156
PA-4	112	125	100	131	132	97	92	97	103
PA-5	79	70	105	65	71	63	82	61	115
PA-6	128	154	118	138	181	105	114	102	165
ORT.	103	97	109	122	105	86	105	85	174

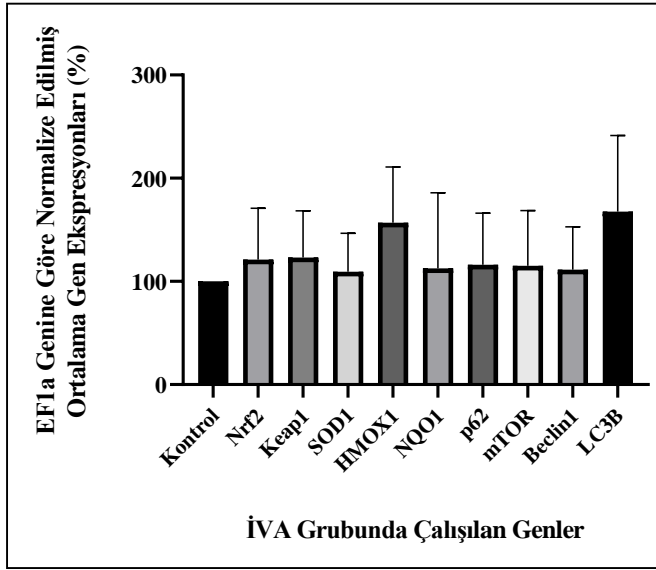


Şekil 4.20. Sağlıklı ve PA gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri.

PA hasta grubunun sağlıklı grup ile karşılaştırılması sonucu; *HMOX1* (%22) ve *LC3B* (%74) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı düzeyde artış gözlemlendi. *BECN1* (%15) ve *p62* (%14) genlerinin ekspresyonları anlamlı düzeyde azalırken, diğer gen ekspresyonlarında çok daha düşük seviyelerde azalma saptandı.

Çizelge 4.5. Sağlıklı ile İVA gruplarının *EF1a* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri (ORT: ortalama).

Çalışma Grubu	<i>EF1a</i> Genine Göre Normalize Edilmiş Gen Ekspresyonları (%)								
	<i>NRF2</i>	<i>KEAP1</i>	<i>SOD1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>NQO1</i>	<i>p62</i>	<i>mTOR</i>	<i>BECN1</i>	<i>LC3B</i>
Sağlıklı	100	100	100	100	100	100	100	100	100
İVA-1	69	95	173	100	45	83	174	90	268
İVA-2	128	112	140	173	56	141	92	92	208
İVA-3	122	177	113	120	111	77	114	116	137
İVA-4	163	64	88	131	33	86	62	80	94
İVA-5	66	112	85	119	150	72	92	65	132
İVA-6	203	192	105	244	233	204	203	168	249
İVA-7	96	109	61	211	160	150	68	168	85
ORT.	121	123	109	157	113	116	115	111	168



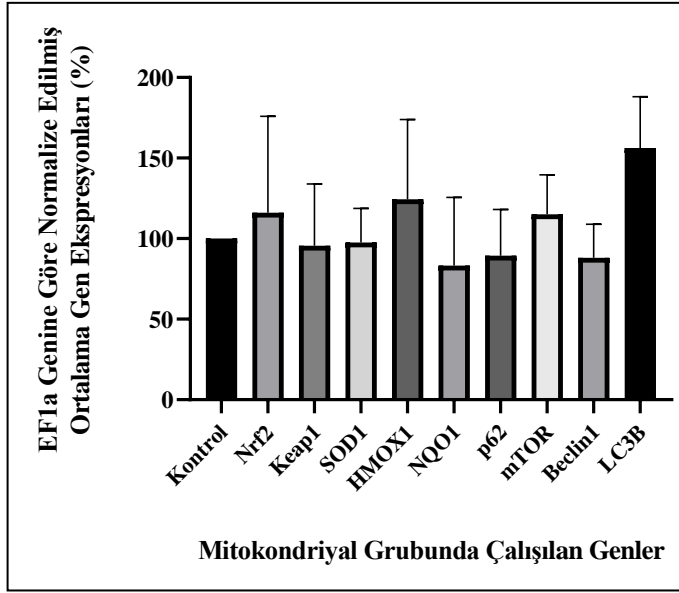
Şekil 4.21. Sağlıklı ve İVA gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri.

İVA hasta grubunun sağlıklı grup ile karşılaştırılması sonucu; tüm gen ekspresyonlarında, *HMOX1* (%57), *LC3B* (%68), *KEAP1* (%23) ve *NRF2* (%21) anlamlı düzeyde artış gözlemlendi.

Çizelge 4.6. Sağlıklı ile mitokondriyal gruplarının *EF1a* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri (ORT: ortalama).

Çalışma Grubu	<i>EF1a</i> Genine Göre Normalize Edilmiş Gen Ekspresyonları (%)								
	<i>NRF2</i>	<i>KEAP1</i>	<i>SOD1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>NQO1</i>	<i>p62</i>	<i>mTOR</i>	<i>BECN1</i>	<i>LC3B</i>
Sağlıklı	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MİT-1	70	91	105	163	59	83	131	104	211
MİT-2	107	74	99	125	45	74	162	99	169
MİT-3	66	122	102	223	107	126	113	117	126
MİT-4	74	69	116	56	45	65	86	64	126
MİT-5	113	99	102	71	41	59	124	64	130
MİT-6	191	61	88	100	115	82	84	81	141
MİT-7	104	192	144	158	163	85	153	125	142
MİT-8	87	64	82	117	125	64	116	76	196
MİT-9	130	87	87	134	136	157	122	77	195

MİT-10	279	75	66	137	57	103	86	75	114
MİT-11	121	77	77	116	80	94	99	91	153
MİT-12	107	152	79	172	81	110	100	108	142
MİT-13	60	80	122	45	28	61	121	64	187
ORT.	116	96	98	124	83	90	115	88	156

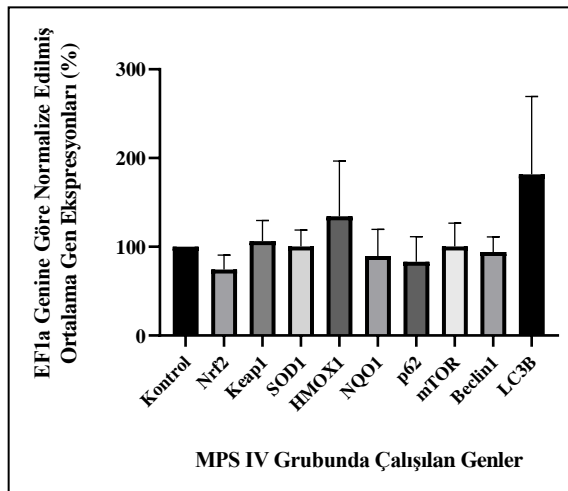


Şekil 4.22. Sağlıklı ve mitokondriyal gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri.

Mitokondriyal hastalık grubundaki bireyler sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında; *HMOX1* (%24), *LC3B* (%56), *NRF2* (%16) ve *mTOR* (%15) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı düzeyde artış gözlemlendi. *BECN1* (%12) ve *NQO1* (%17) gen ekspresyonu anlamlı düzeyde azalırken, diğer gen ekspresyonlarında çok daha düşük seviyelerde azalma saptandı.

Çizelge 4.7. Sağlıklı ile MPS IV gruplarının *EF1a* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyonlarının % değerleri (ORT: ortalama).

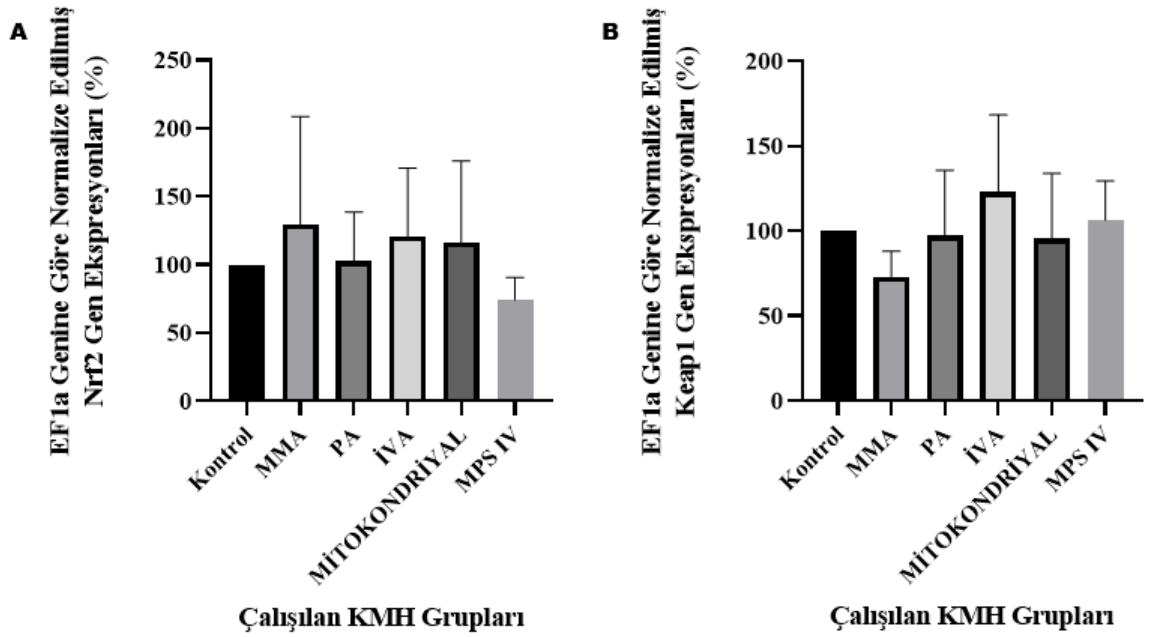
Çalışma Grubu	<i>EF1a</i> Genine Göre Normalize Edilmiş Gen Ekspresyonları (%)								
	<i>NRF2</i>	<i>KEAP1</i>	<i>SOD1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>NQO1</i>	<i>p62</i>	<i>mTOR</i>	<i>BECN1</i>	<i>LC3B</i>
Sağlıklı	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MPS-1	55	66	91	88	88	78	65	100	122
MPS-2	40	144	107	109	144	52	93	82	223
MPS-3	79	87	93	159	120	84	81	101	367
MPS-4	69	115	79	93	96	58	105	87	233
MPS-5	98	85	124	86	69	103	154	110	247
MPS-6	89	117	89	304	37	93	115	101	243
MPS-7	71	121	81	91	61	63	88	96	130
MPS-8	72	97	109	117	86	54	71	49	136
MPS-9	81	137	126	142	77	104	103	108	103
MPS-10	75	100	80	148	117	148	98	105	72
MPS-11	89	102	125	141	92	77	132	95	123
ORT.	74	106	100	134	90	83	100	94	182



Şekil 4.23. Sağlıklı ve MPS IV gruplarında gen ekspresyon değişikliklerinin RT-PZR ile % kat değişimleri.

MPS IV hastalarının sağlıklı grup ile karşılaştırılması sonucu; *HMOX1* (%34) ve *LC3B* (%82) genlerinin ekspresyonlarında anlamlı düzeyde artış gözlemlendi. *NRF2* (%26) ve *p62* (%17) gen ekspresyon seviyesi anlamlı düzeyde azalırken, diğer gen ekspresyonlarında çok daha düşük seviyelerde azalma saptandı.

KMH gruplarında, incelenen her bir genin ekspresyon farkının % değeri, aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.

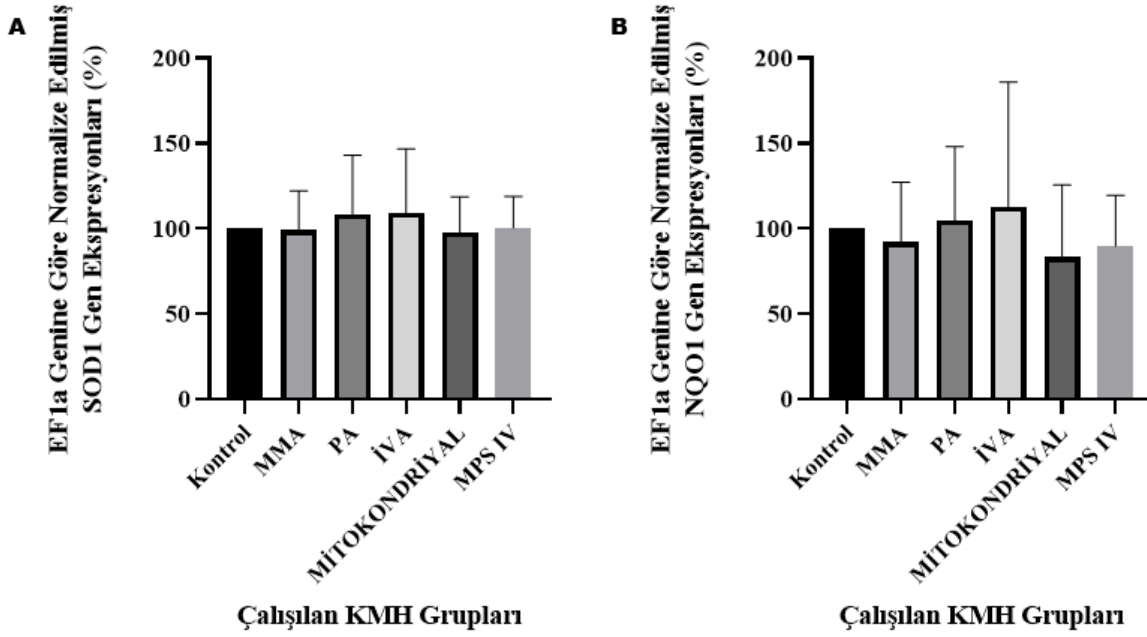


Şekil 4.24. Sağlıklı ve KMH gruplarının RT-PZR % kat değişimleri A) *NRF2* ekspresyonu, *KEAP1* ekspresyonu.

NRF2 gen ekspresyonu (A); MMA, İVA ve MİT hasta gruplarında anlamlı bir şekilde artarken; MPS IV hasta grubunda ise azalmıştır. PA hasta grubunda kontrol grubuna göre daha az oranda artış saptanmıştır. *KEAP1* gen ekspresyonu (B); İVA grubunda anlamlı bir şekilde artarken; MMA grubunda anlamlı bir şekilde azalmıştır. Diğer KMH gruplarında sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük seviyede artış ve azalış saptanmıştır.

KMH grupları ile sağlıklı grup karşılaştırılarak, grup içinde gözlenen yüksek ve düşük *NRF2* ve *KEAP1* gen ekspresyonu saptanan bireyler arasında, her bir gen için ayrı istatistiksel analizler yapıldı. *NRF2* ekspresyonu için, MMA (p=0,029) ve MİT (p=0,002) gruplarında anlamlı ekspresyon farkı olduğu saptanırken, diğer KMH grupları arasında

istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MMA ve MİT gruplarında, hastalar arasında *NRF2* gen ekspresyonu değerlerinde sağlıklı gruba göre daha düşük ya da yüksek değerler saptandı. *KEAPI* ekspresyonu için yapılan istatistiksel analizler sonucu ise, MİT ($p=0,007$) ve MPS IV ($p=0,006$) hastalarında anlamlı fark olduğu saptanırken, diğer KMH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MİT ve MPS IV gruplarında, grup içi hastalarda *KEAPI* ekspresyon değerlerinde sağlıklı gruba göre daha düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı ekspresyon profili saptandı.

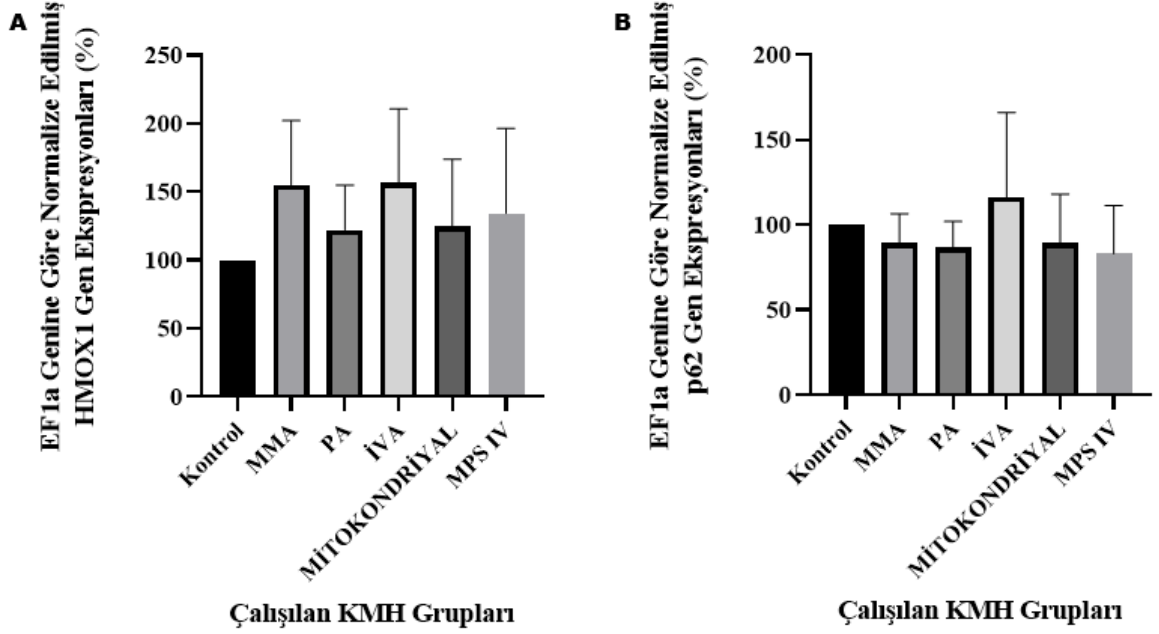


Şekil 4.25. Sağlıklı ve KMH gruplarının RT-PZR % kat değişimleri A) *SOD1* ekspresyonu, *NQO1* ekspresyonu.

KMH grupları ile sağlıklı grup karşılaştırıldığında, *SOD1* (A) gen ekspresyonunda, çok az düzeyde artış ve azalış saptanmıştır. *NQO1* (B) gen ekspresyonu ise sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında; PA ve İVA gruplarında ekspresyon artışı, MMA, MİT ve MPS IV gruplarında ekspresyonda azalış bulundu. *SOD1* ve *NQO1* ekspresyonlarının sağlıklı gruba göre artış ya da azalış gösterme eğiliminin aynı KMH grupları için benzerlik gösterdiği bulundu.

KMH grupları içerisinde gözlenen yüksek ve düşük *SOD1* ve *NQO1* ekspresyon değerleri saptanan bireyler arasında, her bir gen için ayrı istatistiksel analizler yapıldı. *SOD1* ekspresyonu için, MMA ($p=0,036$), MİT ($p=0,001$) ve MPS IV ($p=0,004$) gruplarında;

NQO1 ekspresyonu için ise, MMA (p=0,036), MİT (p=0,002) ve MPS IV (p=0,012) gruplarında anlamlı fark bulundu. Diğer KMH grupları için hem *SOD1* hem de *NQO1* ekspresyonları açısından, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MMA, MİT ve MPS IV gruplarında, hasta grubundaki bireyler arasında *SOD1* ve *NQO1* ekspresyon değerlerinde sağlıklı gruba göre daha düşük veya yüksek olmak üzere iki farklı ekspresyon paterni gözlemlendi.

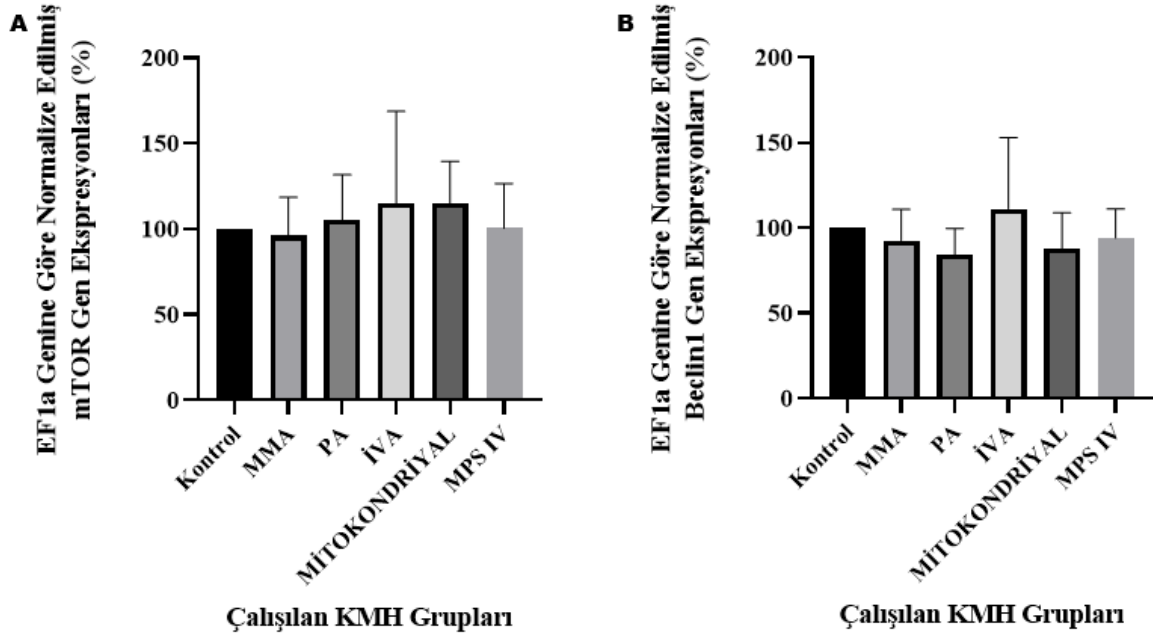


Şekil 4.26. Sağlıklı ve KMH gruplarının RT-PZR % kat değişimleri A) *HMOX1* ekspresyonu, B) *p62* ekspresyonu.

HMOX1 gen ekspresyonunun (A); KMH gruplarının tamamında arttığı saptandı. *p62* gen ekspresyonunun ise (B); İVA grubunda artarken, diğer KMH gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı görüldü.

KMH grupları içerisinde gözlenen yüksek ve düşük *HMOX1* ve *p62* ekspresyon değerleri saptanan bireyler arasında, her bir gen için ayrı istatistiksel analizler yapıldı. *HMOX1* gen ekspresyonu için, MİT (p=0,007) ve MPS IV (p=0,006) gruplarında anlamlı fark olduğu saptanırken, diğer KMH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MMA ve MİT gruplarında, hasta bireyler arasında *HMOX1* ekspresyon değerlerinde sağlıklı gruba göre düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı grup davranışı gözlenmekle birlikte, genel olarak *HMOX1* gen ekspresyonu artış gösterme

eğilimindedir. *p62* ekspresyonu için yapılan istatistiksel analizler sonucu ise, MİT ($p=0,003$) ve MPS IV ($p=0,012$) gruplarında anlamlı fark olduğu saptanırken, diğer KMH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MİT ve MPS IV gruplarında, grup içi *p62* ekspresyon değerlerinde azalma ve artış gözlenirken, genel olarak hastalarda *p62* ekspresyonu azalma gösterme eğilimindedir.

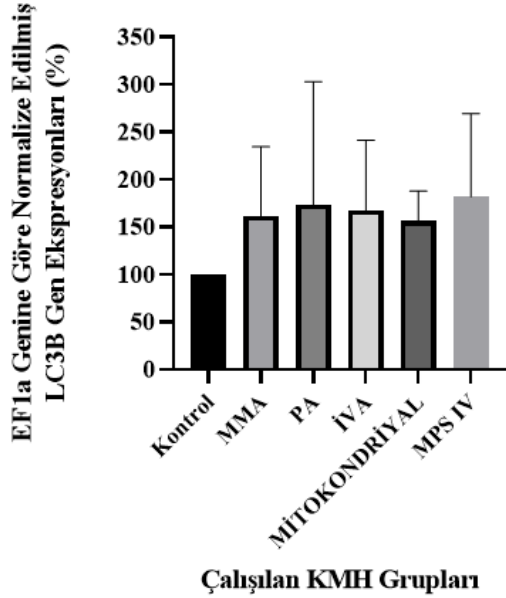


Şekil 4.27 Sağlıklı ve KMH gruplarının RT-PZR % kat değişimleri A) *mTOR* ekspresyonu, B) *BECN1* ekspresyonu.

KMH gruplarında *mTOR* (A) gen ekspresyonunda, çok düşük düzeyde artış ve azalış saptanmıştır. *BECN1* gen ekspresyonunun (B); İVA grubunda artarken, diğer KMH gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı görüldü.

KMH grupları ile sağlıklı grup karşılaştırılarak, grup içinde gözlenen yüksek ve düşük *mTOR* ve *BECN1* ekspresyon değerleri saptanan bireyler arasında, her bir gen için ayrı istatistiksel analizler yapıldı. *mTOR* ekspresyonu için, MMA ($p=0,029$), MİT ($p=0,003$) ve MPS IV ($p=0,004$) gruplarında anlamlı fark olduğu saptanırken, diğer KMH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MMA, MİT ve MPS IV gruplarında, hastalar arasında *mTOR* ekspresyon değerlerinde sağlıklı gruba göre daha düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı grup davranışı gözlemlendi. *BECN1* ekspresyonu için yapılan istatistiksel analizler sonucu ise, MİT ($p=0,003$) ve MPS IV ($p=0,004$) gruplarında

anlamli fark olduğu saptanırken, diğer KMH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. MİT ve MPS IV gruplarında, grup içi *BECN1* ekspresyon seviyesinde daha düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı grup davranışı gözlenmekle birlikte, genel olarak hastalarda *BECN1* ekspresyonu azalma gösterdi.



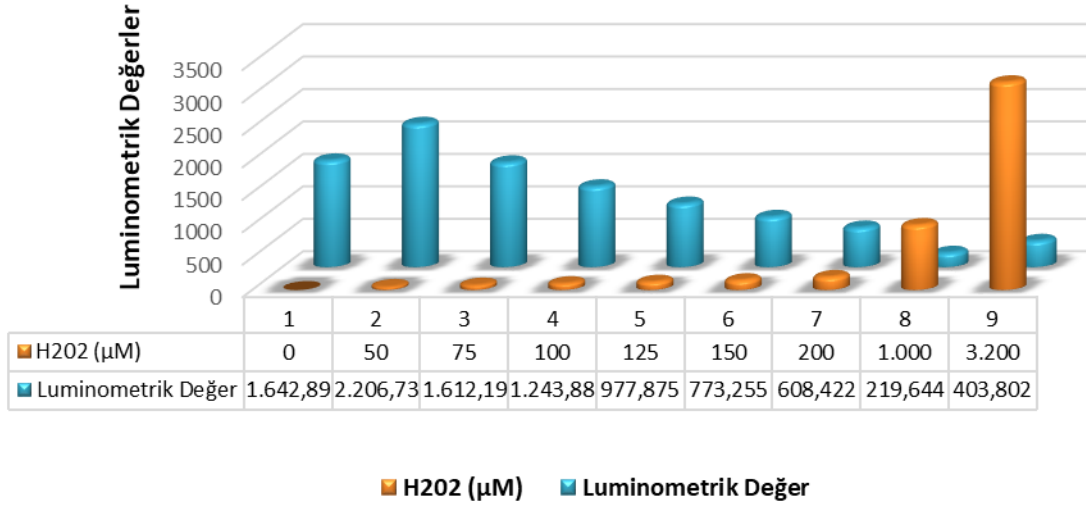
Şekil 4.28. Sağlıklı ve KMH gruplarının *LC3B* RT-PZR % kat değışimleri.

LC3B gen ekspresyonunun (A); KMH gruplarının tamamında arttığı saptandı. Hasta bireylerin tümünde ekspresyon seviyesinin artma yönünde olduğu bulundu.

4.1.3. Hücre İçi ROS Miktarı, Mitokondriyal Membran Potansiyeli ve Hücre İçi ATP Miktarı Ölçüm Analizleri

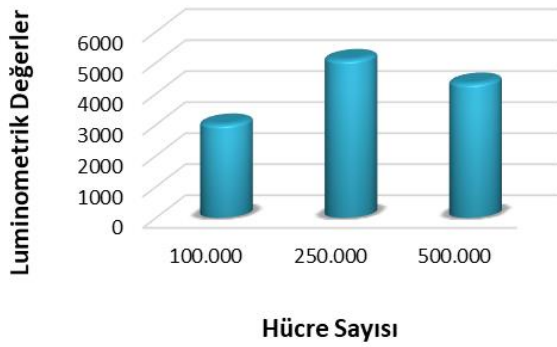
4.1.3.1. Kontrol Deneyleri Sonuçları

Kontrol deneyleri, deneylerde kullanılabilen minimum hücre sayısının ve sağlıklı hücreler ile gerçekleştirilen kontrol deneylerinde hücrelerde stres yaratılabilecek optimum H_2O_2 miktarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Hücre içi ATP miktarının ölçüm deneyinde, sağlıklı 500.000 PBMC kullanılarak farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 muamelesi uygulanması sonucu elde edilen grafik aşağıda gösterilmiştir. Hücrede stres uyarımının gerçekleştirebildiği H_2O_2 miktarı, 100 μM olarak belirlendi.



Şekil 4.29. Hücre içi ATP miktar ölçümü deneyinde optimum stresin indüklendiği H₂O₂ miktarının belirlenmesi.

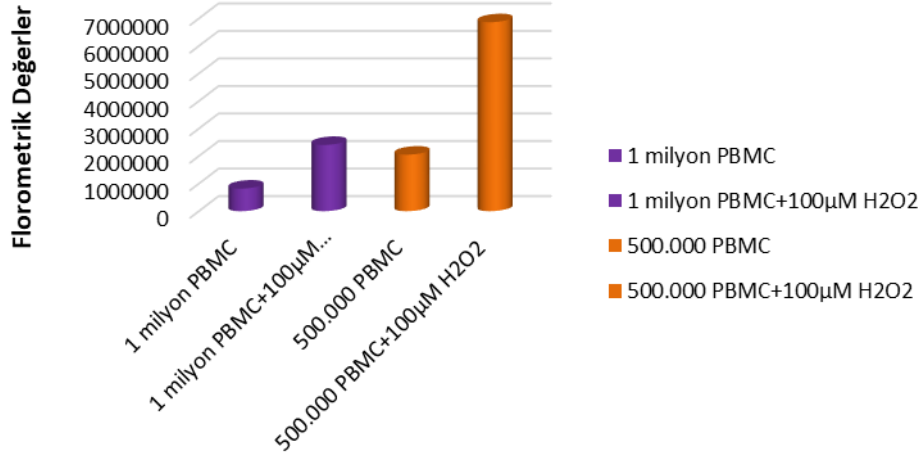
500.000 PBMC'den daha az hücre kullanılarak, hücre içi ATP miktarı ölçüm deneylerinin gerçekleştirilebilirliği; 500.000, 250.000 ve 100.000 PBMC kullanılarak denendi. Hücre sayısının azaltılmasının deney sonuçlarında sapmalara neden olması sebebiyle 500.000 hücrenin minimum hücre sayısı olduğu saptandı.



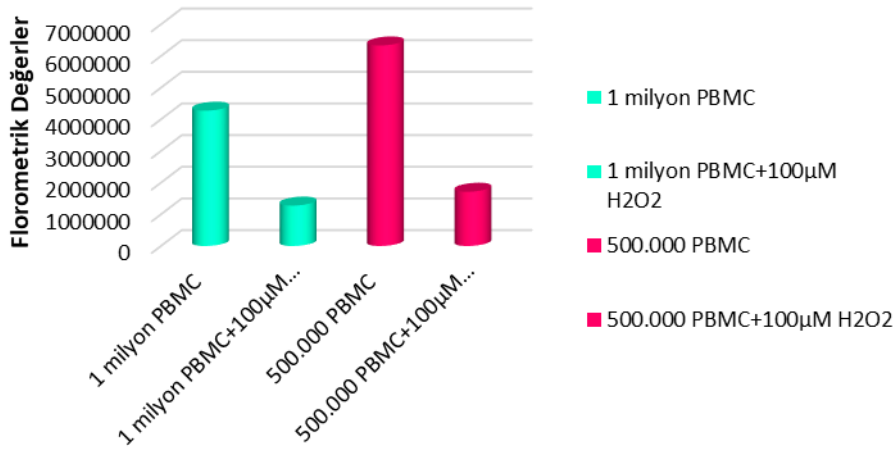
Şekil 4.30. Hücre içi ATP miktarı ölçüm deneyinde optimum hücre sayısının doğrulanması.

Hücre içi ROS miktarı ve mitokondri membran potansiyeli ölçümü deneyleri için de belirlenen 500.000 PBMC sayısının yeterliliğinin kontrolü, 500.000 ve 1.000.000 PBMC ile 100 µM H₂O₂ uygulamalarıyla gerçekleştirildi. 500.000 PBMC'nin deneylerin gerçekleştirilmesi için yeterli-minimum hücre sayısı olduğu saptandı. Hücre içi ROS

miktarı ve mitokondri membran potansiyeli ölçümü kontrol deneylerinin grafikleri aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 4.31. Hücre içi ROS miktarının ölçümü deneyinde optimum hücre sayısının doğrulanması ve H₂O₂ etkisi.



Şekil 4.32. Mitokondri membran potansiyelinin ölçümü deneyinde optimum hücre sayısının doğrulanması ve H₂O₂ etkisi.

4.1.3.2. Hücre İçi ATP Miktarının Ölçüm Analizleri

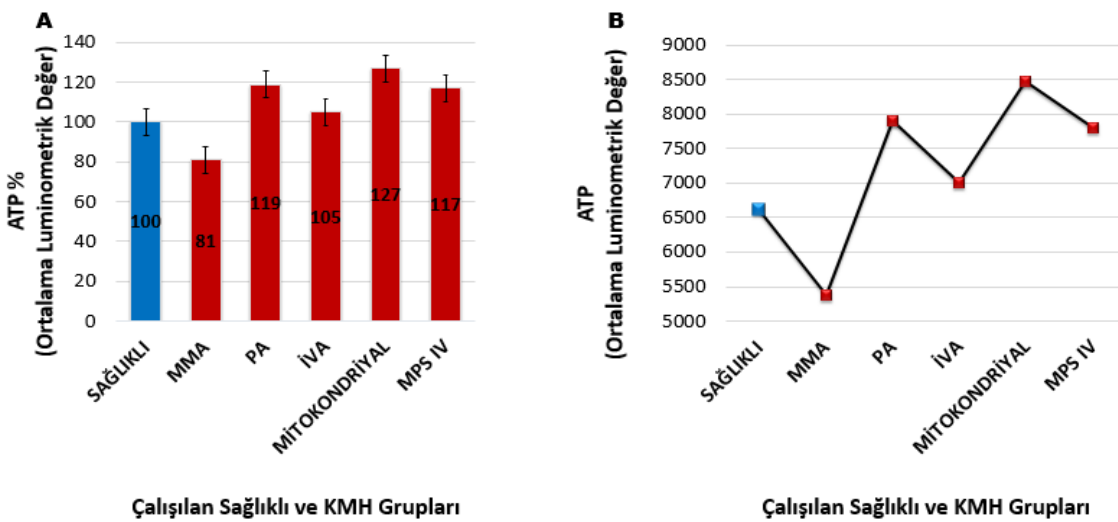
Sağlıklı grup ile 5 farklı KMH hasta grubu; hücre içi ATP miktarının ölçüm değerleri açısından tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,514$). Etki büyüklüğüne bakıldığında hasta gruplarında 0,087 ile orta ve büyük etki büyüklüğü arasında olduğu görüldü. İki ortalama

arasındaki farkın anlamlılık testi (Independent Samples t Test) ile de istatistiksel analiz gerçekleştirildi, anlamlı fark saptanmadı ($p=0,594$). Etki büyüklüğüne bakıldığında 0,208 ile küçük etki büyüklüğüne yakın olmakla birlikte, küçük ve orta etki büyüklüğü arasında olduğu görüldü. Her bir KMH grubunun sağlıklı ile karşılaştırıldığı istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark gözlenmedi.

Çizelge 4.8. Sağlıklı ile KMH gruplarının hücre içi ATP miktarının ölçüm değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Gruplar	p (Mann-Whitney U)
Sağlıklı-MMA	0, 662
Sağlıklı-PA	0, 699
Sağlıklı-İVA	0, 945
Sağlıklı-MİT	0, 244
Sağlıklı-MPS IV	0, 591

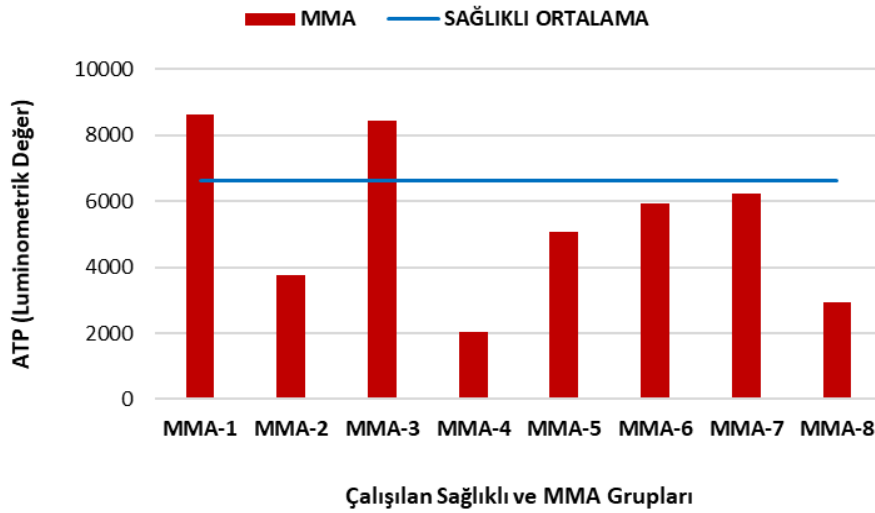
Hasta ve sağlıklı grupların hücre içi ATP miktarının ortalama değerleri açısından incelemesi Şekil 4.33'te gösterilmektedir.



Şekil 4.33. Sağlıklı ve KMH gruplarında hücre içi ATP miktarının ortalaması; A-bar grafiği, B-çizgi grafiği.

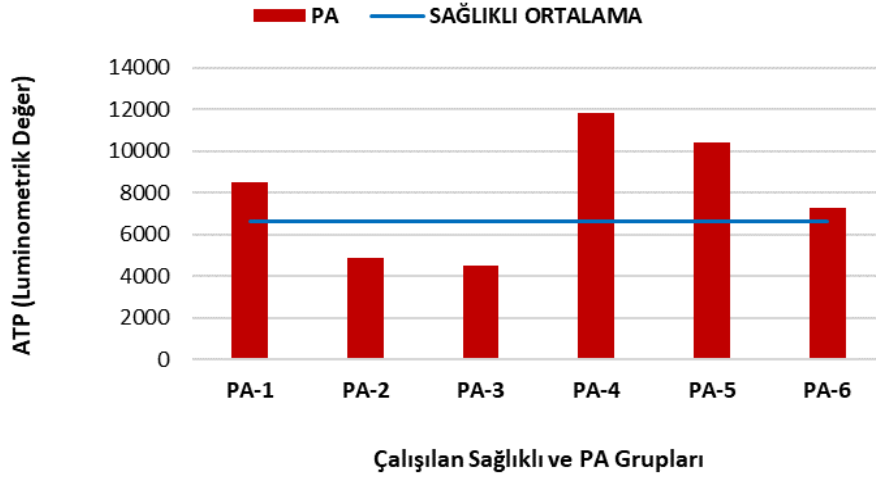
Hücre içi ATP miktarının ortalama değerlerine göre çizilen grafikler incelendiğinde, İVA grubunun sağlıklı grubun hücre içi ATP değerlerine oldukça yakın olduğu saptandı. Sırasıyla MİT, PA ve MPS IV hasta gruplarının ise sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın daha yüksek, MMA grubunun ise daha düşük hücre içi ATP miktarına sahip olduğu görüldü.

Farklı KMH gruplarında yeralan her bir birey, hücre içi ATP miktarı verileri açısından sağlıklı grup ortalaması ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu şekilde hem hastaların bireysel analizleri hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenirken, diğer yandan sağlıklı gruba kıyasla daha yüksek ve düşük hücre içi ATP miktarlarının ortalama değerlerine sahip olan hastaların istatistiksel analizler ile grup içi farklılaşmalarının kontrolü sağlandı. Hücre içi ATP miktarı değerleri açısından KMH gruplarındaki her bir bireyin sağlıklı grubun ortalamasına göre karşılaştırıldığı grafikler aşağıda gösterilmektedir.



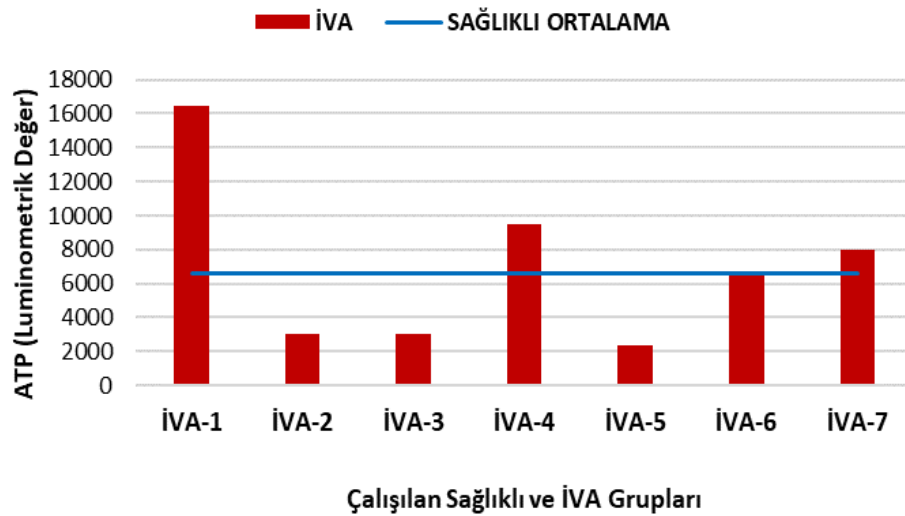
Şekil 4.34. Sağlıklı ve MMA gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve MMA grupları hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırıldığında, çalışmaya dahil edilen 2 hasta hariç sağlıklı gruba göre düşük ATP miktarları gözlemlendi. MMA grubunda genel olarak hücre içi ATP miktarında azalma yönünde dağılım olduğu görüldü.



Şekil 4.35. Sağlıklı ve PA gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.

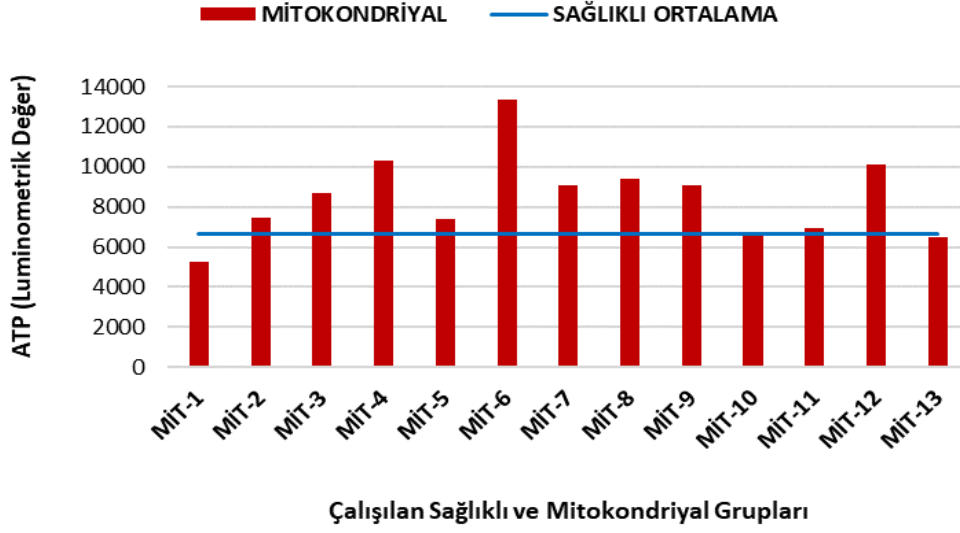
PA hastaları ile sağlıklı grubun ortalama hücre içi ATP miktarları karşılaştırıldığında, çalışmaya dahil edilen 2 hasta hariç sağlıklı gruba göre yüksek ATP miktarları bulundu.



Şekil 4.36. Sağlıklı ve İVA gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.

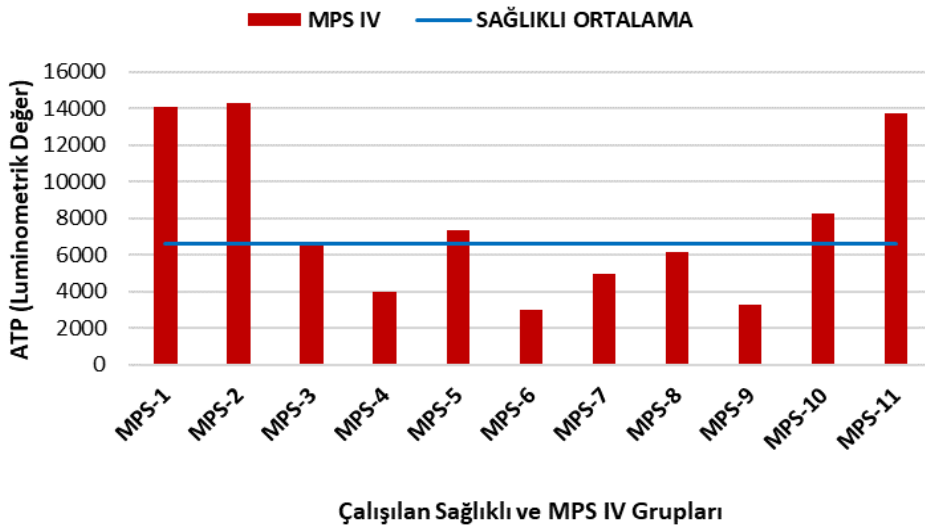
Çalışmaya dahil edilen kısıtlı sayıdaki İVA sahibi hasta birey, grup içerisinde sağlıklı grubun ortalama hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırıldığında, anlamlı düşüş ve artışın olduğu görüldü. Grup içerisindeki 1 hasta hariç, İVA hastalarında hücre içi ATP miktarları açısından sağlıklı gruba göre ciddi farklılıklar saptanmıştır ancak bununla

birlikte hücre içi ATP miktarı bireysel farklılıklar sergilemektedir. ATP miktarı artan ve azalan hastalar arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,057$).



Şekil 4.37. Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.

Çalışmaya dahil edilen mitokondriyal hastalık tanımlı bireylerde çalışmaya dahil edilen 2 hasta hariç sağlıklı gruba göre yüksek ATP miktarları gözlemlendi. Grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek ATP miktarları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,007$).



Şekil 4.38. Sağlıklı ve MPS IV hasta gruplarının hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve MPS IV hasta grupları hücre içi ATP miktarları açısından karşılaştırıldığında, hücre içi ATP miktarının değişkenlik gösterdiği görüldü. Grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek ATP miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlılık saptandı ($p=0,004$).

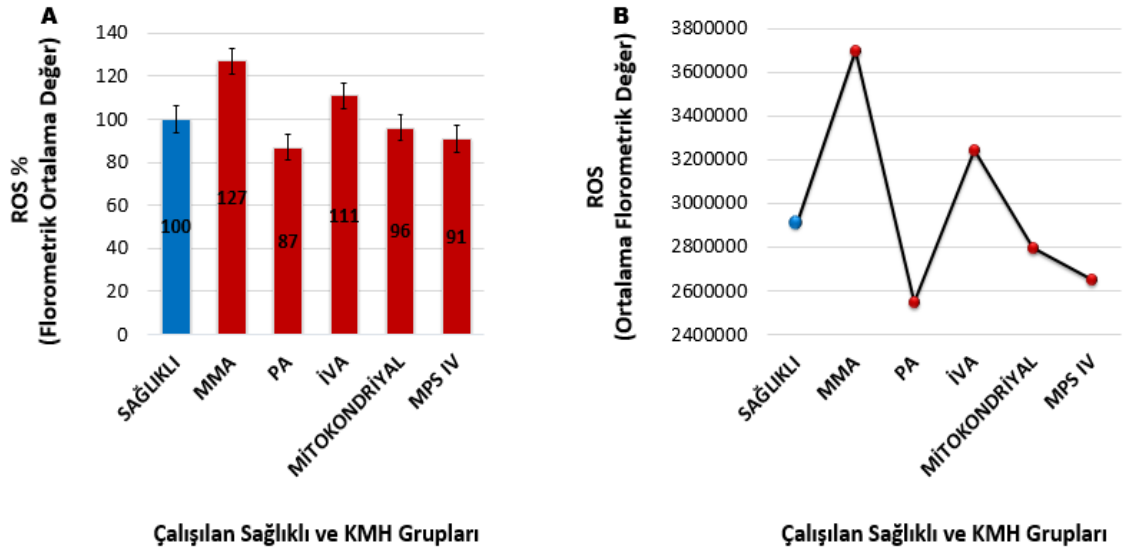
4.1.3.3. Hücre İçi ROS Miktarının Ölçüm Analizleri

Sağlıklı grup ile 5 farklı KMH hasta grubu; hücre içi ROS miktarının ölçüm değerleri açısından tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,269$). Etki büyüklüğüne bakıldığında 0,129 ile orta ve büyük etki büyüklüğü arasında olduğu görüldü. İki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (Independent Samples t Test) ile de istatistiksel analiz gerçekleştirildi, anlamlı fark saptanmadı ($p=0,918$). Etki büyüklüğüne bakıldığında 0,052 ile küçük etki büyüklüğünün de altında olduğu görüldü. Her bir KMH grubunun sağlıklı ile karşılaştırıldığı istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark gözlenmedi.

Çizelge 4.9. Sağlıklı ile KMH gruplarının hücre içi ROS miktarının ölçüm değerleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Gruplar	p (Mann-Whitney U)
Sağlıklı-MMA	0, 491
Sağlıklı-PA	0, 310
Sağlıklı-İVA	0, 628
Sağlıklı-MİT	0, 831
Sağlıklı-MPS IV	0, 591

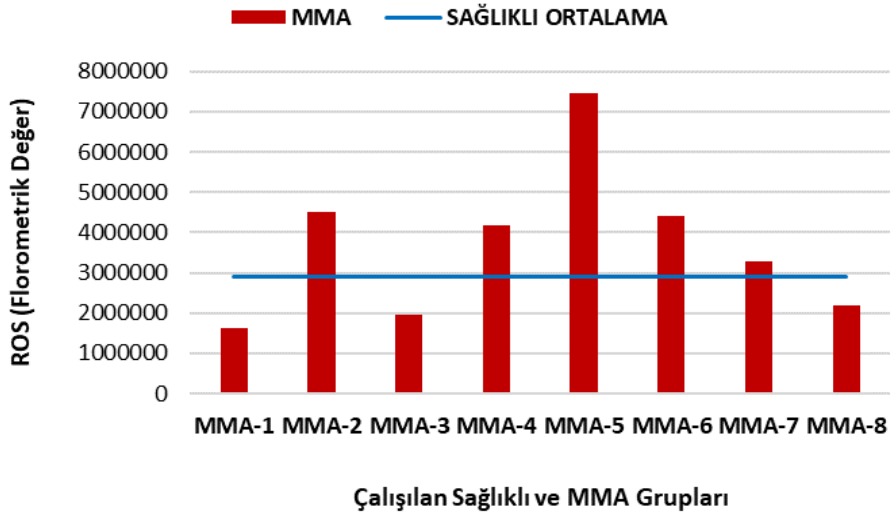
Hasta ve sağlıklı grupların hücre içi ROS miktarının ortalama değerleri açısından incelemesi Şekil 4.39'da gösterilmektedir.



Şekil 4.39. Sağlıklı ve KMH gruplarında hücre içi ROS miktarının ortalaması; A-bar grafiği, B-çizgi grafiği.

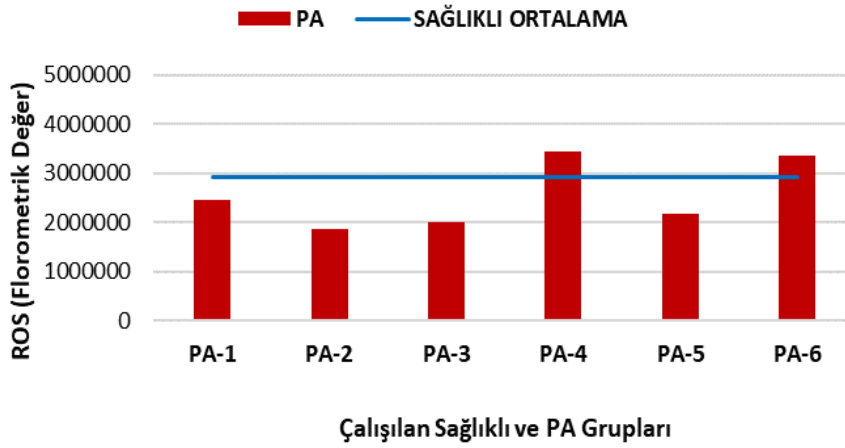
Hücre içi ROS miktarının ortalama değerlerine göre çizilen grafikler incelendiğinde, sırasıyla MMA ve İVA grupları sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın daha yüksek; PA, MPS IV ve MİT hastalık gruplarının ise daha düşük hücre içi ROS miktarına sahip olduğu görüldü.

Her bir KMH grubundaki hasta birey, hücre içi ROS miktarı verileri açısından sağlıklı grup ortalaması ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu şekilde hem hastaların bireysel analizleri hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenirken, diğer yandan sağlıklı gruba kıyasla daha yüksek ve düşük hücre içi ROS miktarlarının ortalama değerlerine sahip olan hastaların istatistiksel analizler ile grup içi farklılaşmalarının kontrolü sağlandı. Hücre içi ROS miktarı değerleri açısından KMH gruplarındaki her bir bireyin sağlıklı grubun ortalamasına göre karşılaştırıldığı grafikler aşağıda gösterilmektedir.



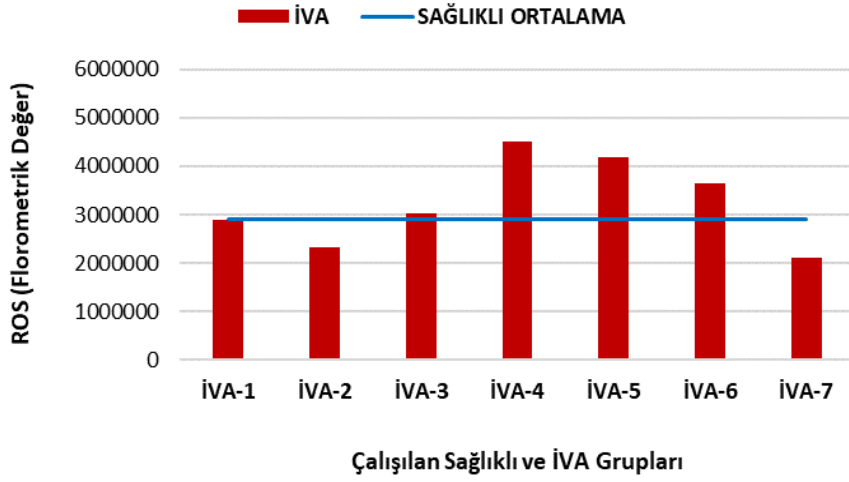
Şekil 4.40. Sağlıklı ve MMA gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve MMA grupları hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırıldığında, çalışmaya dahil edilen 3 hasta hariç sağlıklı gruba göre yüksek ROS miktarları gözlemlendi. Grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek ROS miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlılık saptandı ($p=0,036$).



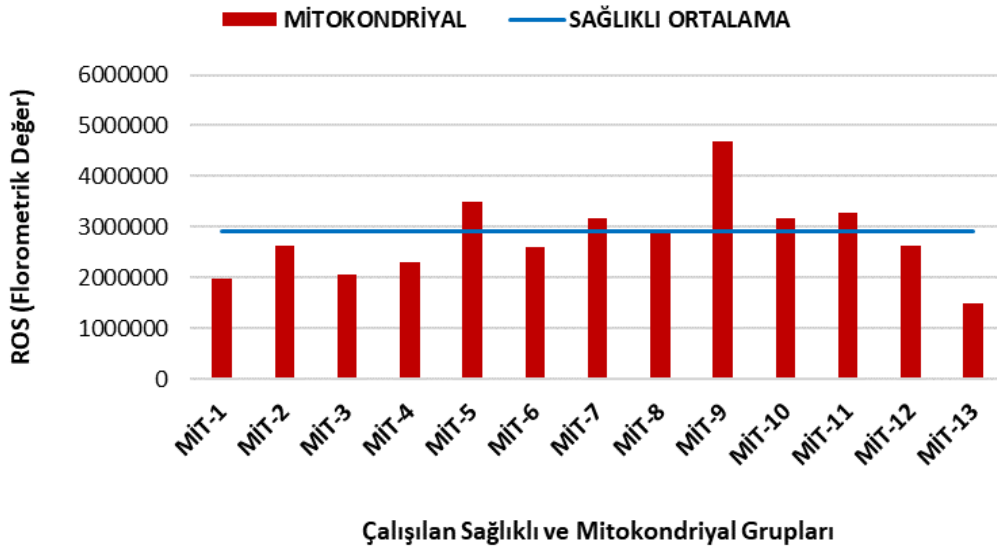
Şekil 4.41. Sağlıklı ve PA gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması.

PA hastalarında çalışmaya dahil edilen 2 hasta hariç sağlıklı gruba göre düşük ROS miktarları gözlemlendi.



Şekil 4.42. Sağlıklı ve İVA gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması.

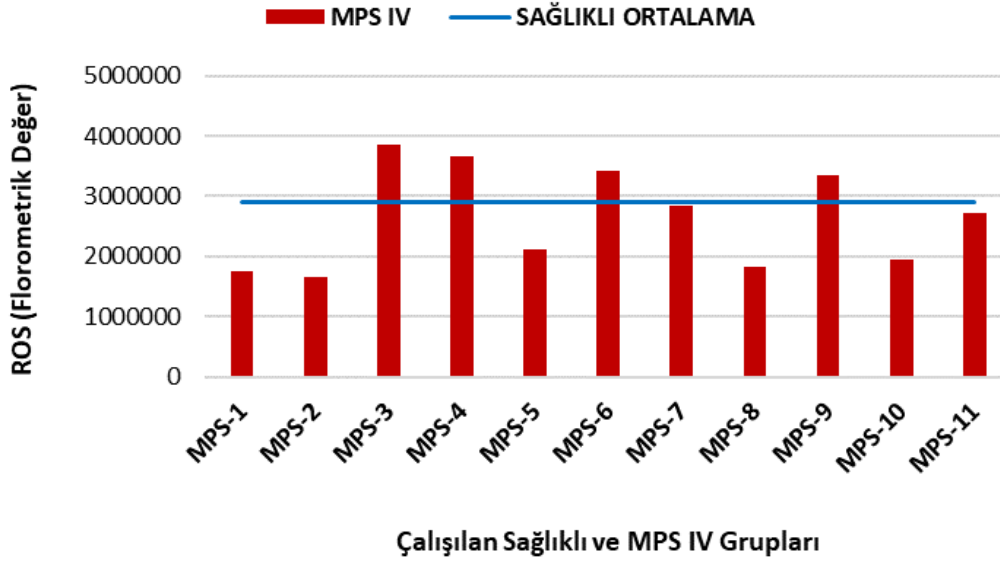
Sağlıklı ve İVA grupları hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırıldığında grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek ROS miktarları istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,057$).



Şekil 4.43. Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık grupları hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırıldığında, genel olarak düzenli bir hücre içi ROS miktarı dağılımı olmadığı

görüldü. Grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek ROS miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlılık saptandı ($p=0,002$). Genel olarak grup içi ROS miktarı değerlendirildiğinde sağlıklı gruba kıyasla düşük ROS miktarları bulundu.



Şekil 4.44. Sağlıklı ve MPS IV gruplarının hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve MPS IV hasta grupları hücre içi ROS miktarları açısından karşılaştırıldığında, genel olarak düzenli bir hücre içi ROS miktarı dağılımı olmadığı görüldü. Grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek ROS miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlılık saptandı ($p=0,006$).

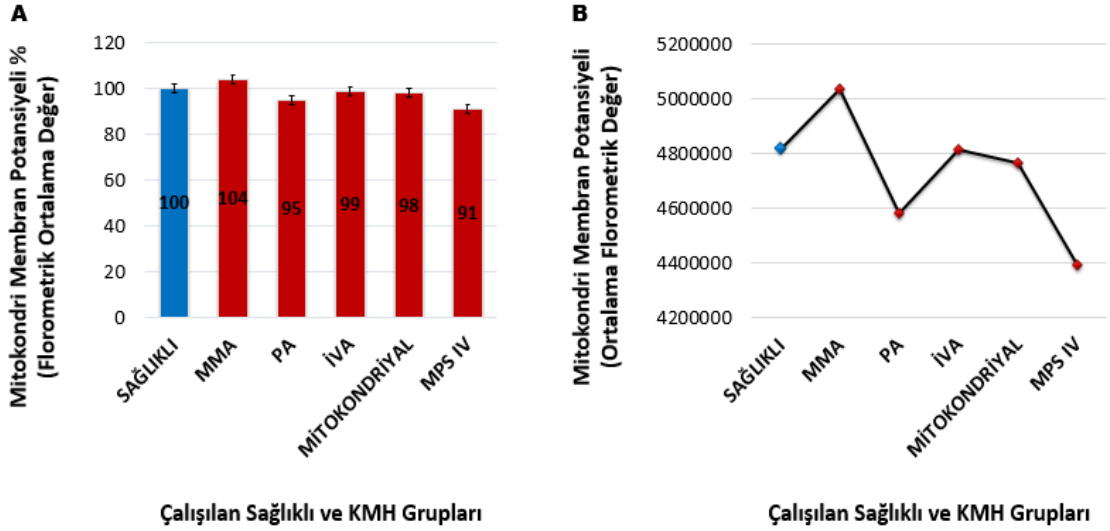
4.1.3.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (MMP) Ölçüm Analizleri

Sağlıklı grup ile 5 farklı KMH hasta grubu; hücre içi MMP miktarının ölçüm değerleri açısından tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,522$). Etki büyüklüğüne bakıldığında 0,086 ile orta ve büyük etki büyüklüğü arasında olduğu görüldü. İki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (Independent Samples t Test) ile de istatistiksel analiz gerçekleştirildi, anlamlı fark saptanmadı ($p=0,728$). Etki büyüklüğüne bakıldığında 0,165 ile küçük etki büyüklüğünün de altında olduğu görüldü. Her bir KMH grubunun sağlıklı ile karşılaştırıldığı istatistiksel analizler sonucu anlamlı fark gözlenmedi.

Çizelge 4.10. Sağlıklı ile KMH gruplarının hücre içi MMP miktarının ölçüm değerleri açısından istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Gruplar	p (Mann-Whitney U)
Sağlıklı-MMA	0,491
Sağlıklı-PA	0,485
Sağlıklı-İVA	0,945
Sağlıklı-MİT	0,898
Sağlıklı-MPS IV	0,350

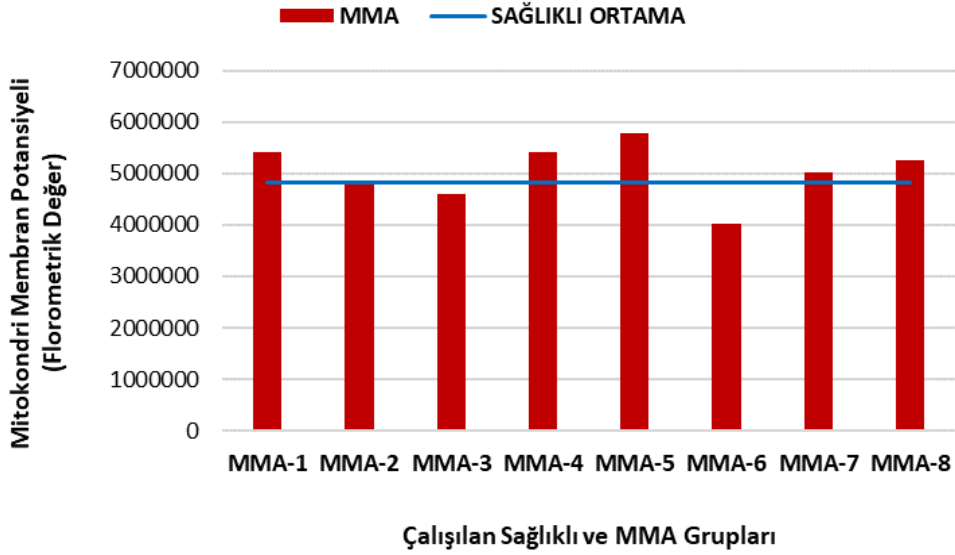
Hasta ve sağlıklı grupların hücre içi MMP miktarının ortalama değerleri açısından incelemesi Şekil 4.45'te gösterilmektedir.



Şekil 4.45. Sağlıklı ve KMH gruplarında hücre içi MMP miktarının ortalaması; A-bar grafiği, B-çizgi grafiği.

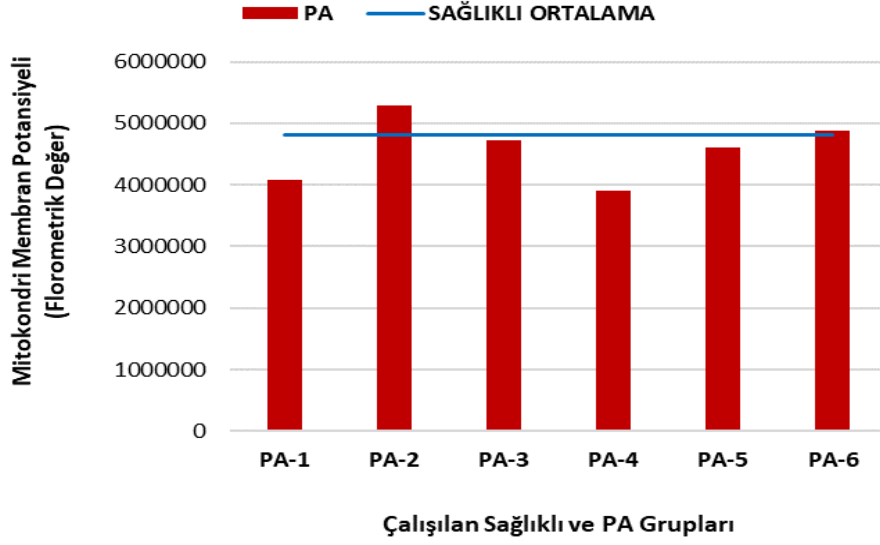
Hücre içi MMP miktarının ortalama değerlerine göre çizilen grafikler incelendiğinde, hiçbir KMH grubunda anlamlı bir yükseklik ya da düşüklüğe rastlanmadı. Her bir KMH grubundaki birey, hücre içi MMP miktarı verileri açısından sağlıklı grup ortalaması ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu şekilde hem hastaların bireysel analizleri hakkında

bilgi sahibi olunması hedeflenirken, diğer yandan sağlıklı gruba kıyasla daha yüksek ve düşük hücre içi MMP miktarlarının ortalama değerlerine sahip olan hastaların istatistiksel analizler ile grup içi farklılaşmalarının kontrolü sağlandı. Hücre içi MMP miktarı değerleri açısından KMH gruplarındaki her bir bireyin sağlıklı grubun ortalamasına göre karşılaştırıldığı grafikler aşağıda gösterilmektedir.



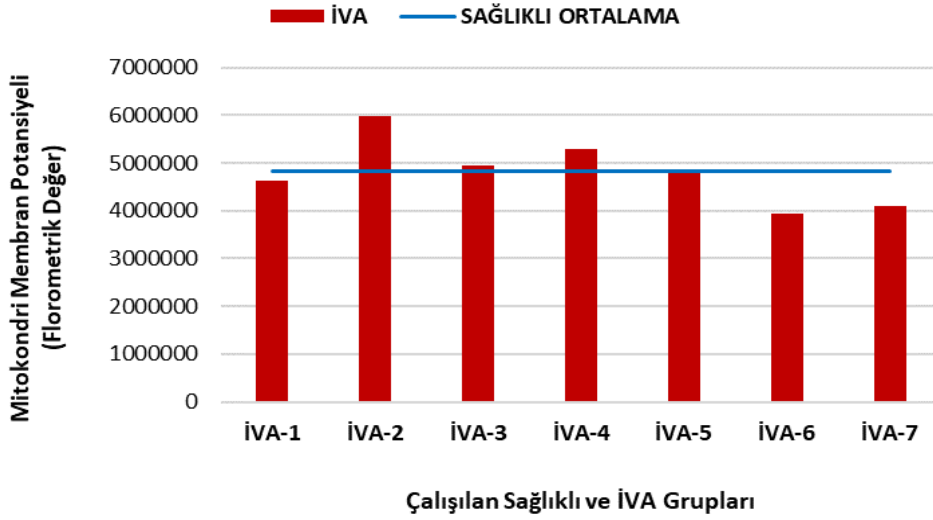
Şekil 4.46. Sağlıklı ve MMA gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve MMA hasta grupları hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırıldığında, grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek MMP miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulundu ($p=0,036$).



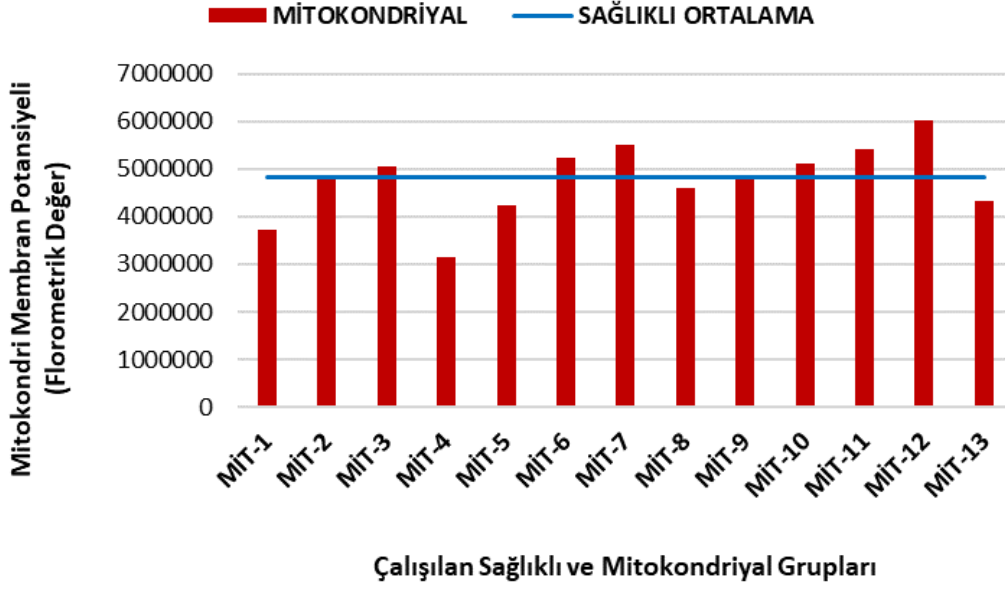
Şekil 4.47. Sağlıkli ve PA gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması.

PA hastalarında sağlıkli gruba göre düşük MMP miktarları saptandı.



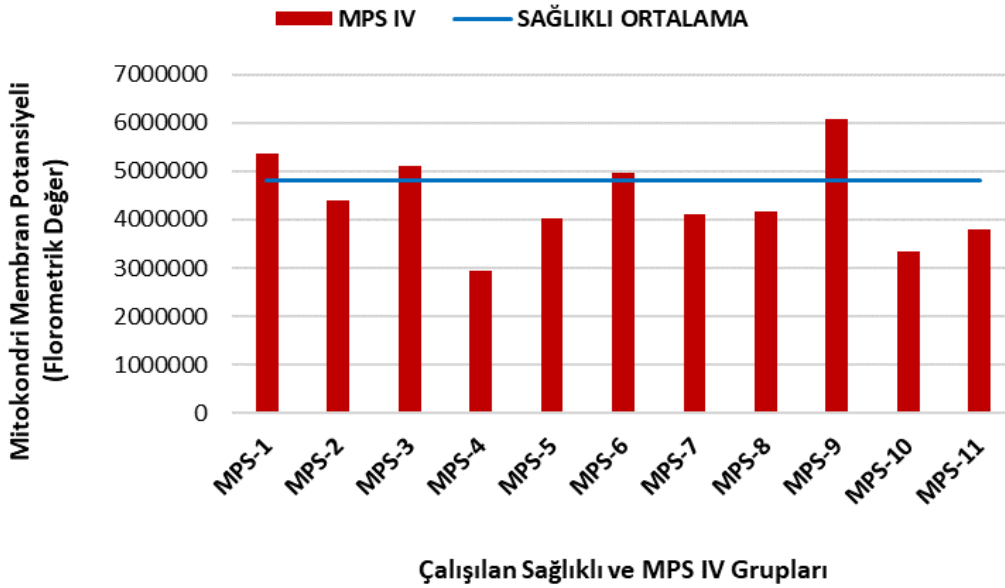
Şekil 4.48. Sağlıkli ve İVA gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması.

Çalışmaya dahil edilen İVA hastalarında, 2 hasta hariç sağlıkli gruba yakın MMP miktarlarının gözleendiği saptandı.



Şekil 4.49. Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması.

Sağlıklı ve mitokondriyal hastalık grupları hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırıldığında, grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek MMP miktarları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulundu ($p=0,001$).

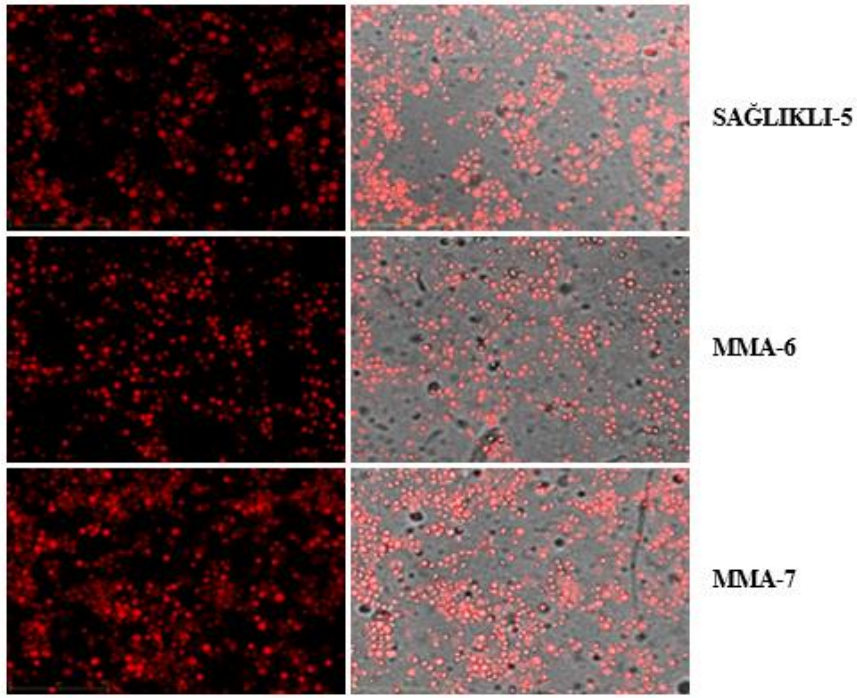


Şekil 4.50. Sağlıklı ve MPS IV hasta gruplarının hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırılması.

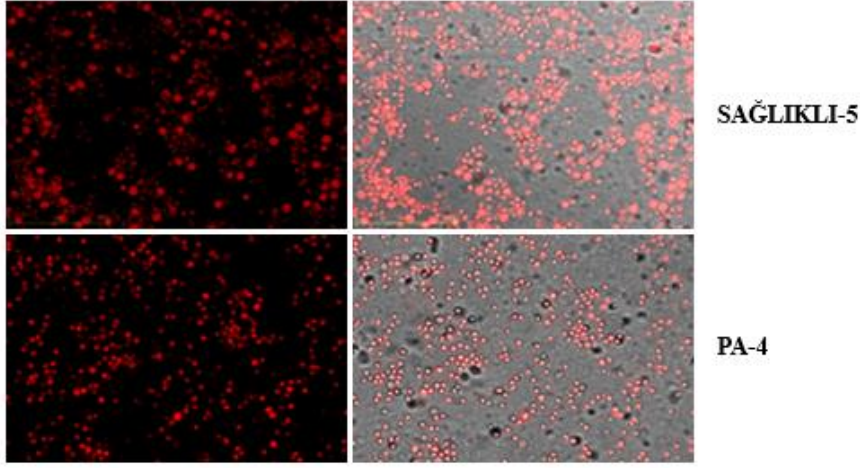
Sağlıklı ve MPS IV grupları hücre içi MMP miktarları açısından karşılaştırıldığında, grup içerisinde gözlenen düşük ve yüksek MMP miktarları anlamlı bulundu ($p=0,006$).

4.1.3.5. Görüntüleme Sonuçları

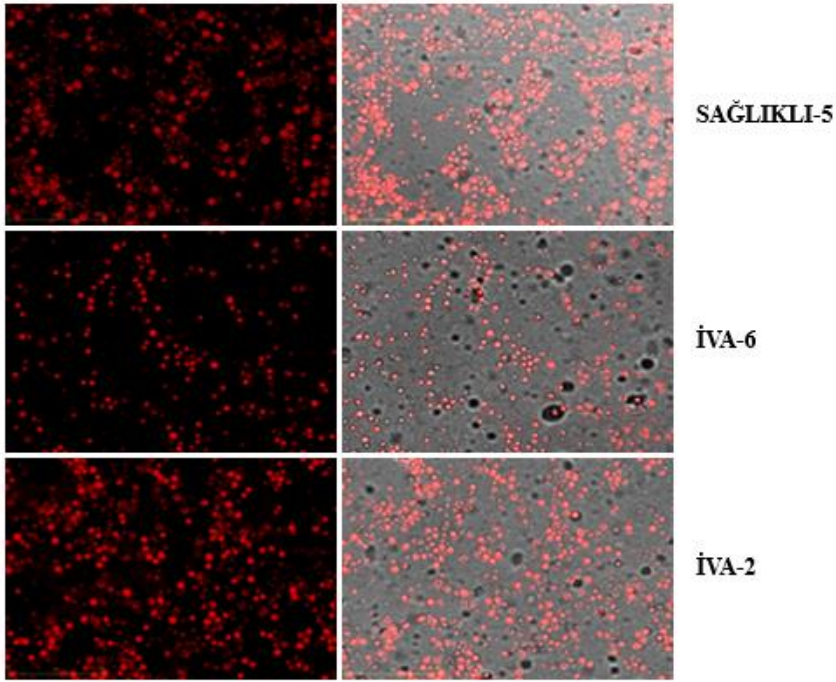
MMP ve ROS florometrik ölçümleri yapılan sağlıklı ve KMH gruplarında nicel verilerin doğrulanması amacıyla hücrelerin görüntülenmesi gerçekleştirildi. Sağlıklıya göre daha yüksek ve düşük olarak tespit edilen MMP ve ROS miktarlarını değerlendirmek için her KMH grubundan birer hasta seçildi. Sağlıklı ve KMH hasta gruplarında hücre içi MMP ve ve ROS miktarları için elde edilen görüntülerin, nicel verileri ile uyumlu olduğu saptandı.



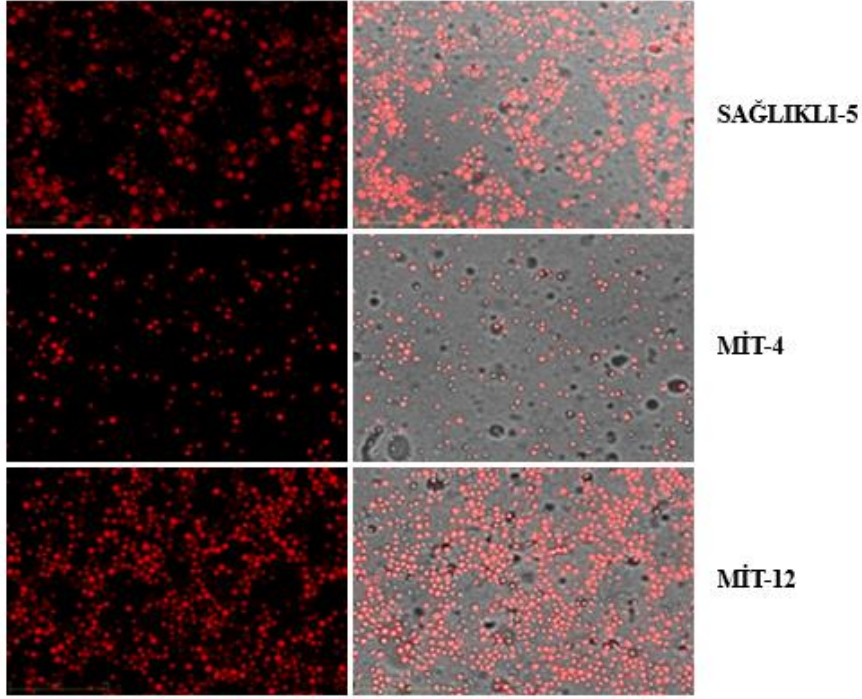
Şekil 4.51. Sağlıklı ve MMA hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, RFP/RFP-aydınlık alan birleşik).



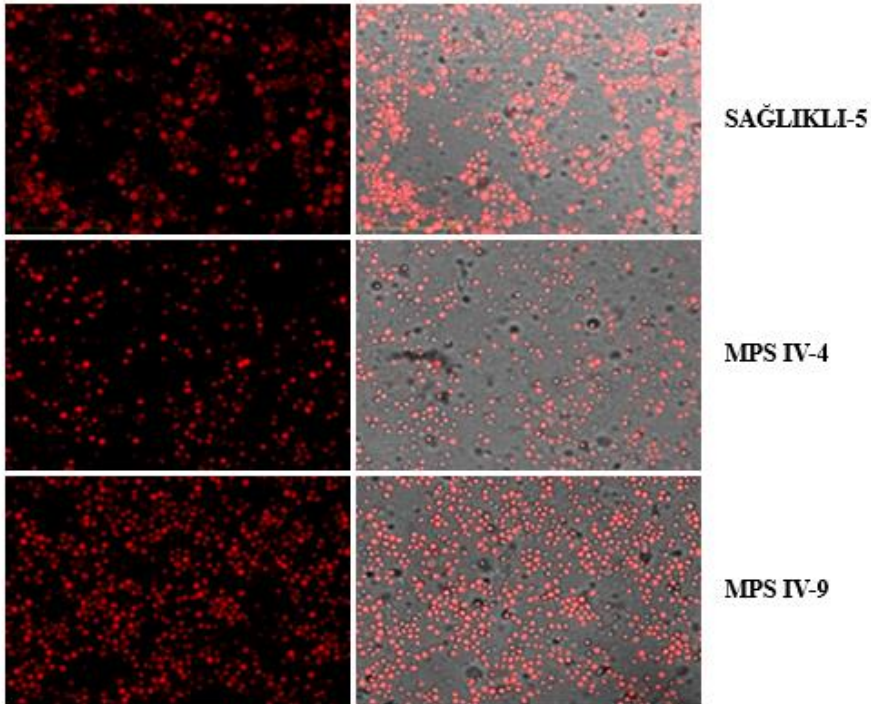
Şekil 4.52. Sağlıklı ve PA hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, RFP/RFP-aydınlık alan birleşik).



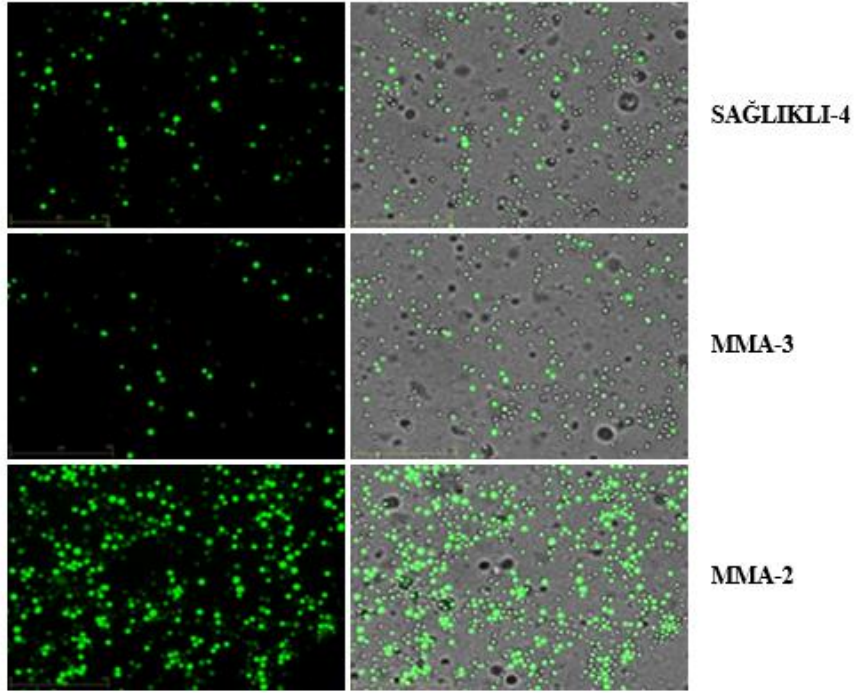
Şekil 4.53. Sağlıklı ve İVA hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, RFP/RFP-aydınlık alan birleşik).



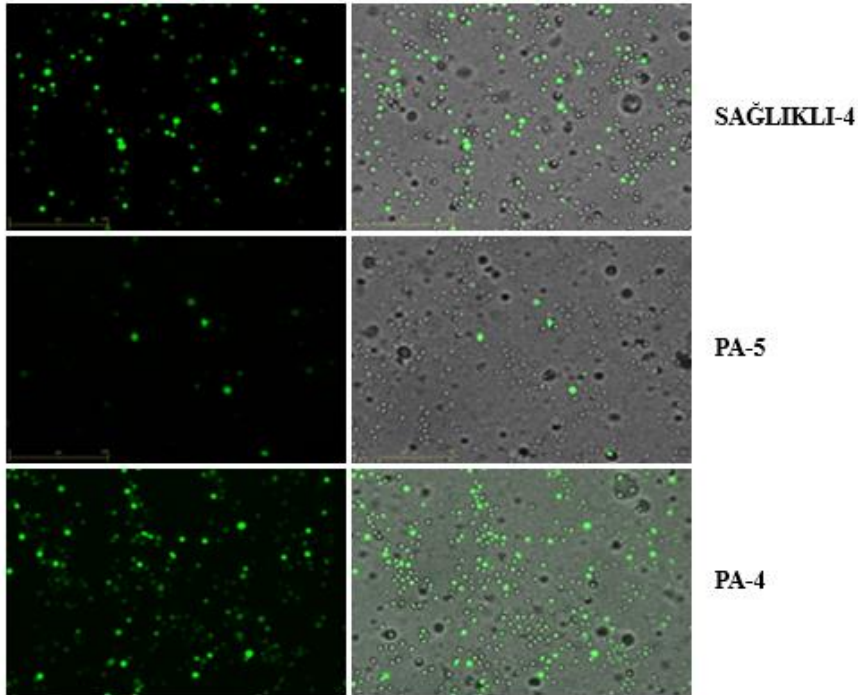
Şekil 4.54. Sağlıklı ve MİT hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, RFP/RFP-aydınlık alan birleşik).



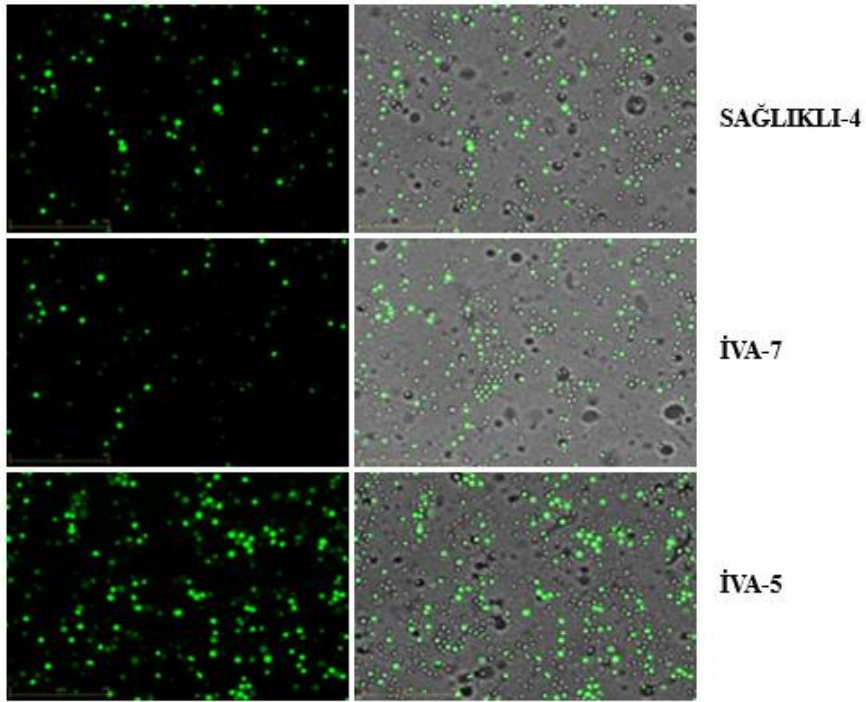
Şekil 4.55. Sağlıklı ve MPS IV hasta gruplarında hücre içi MMP miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, RFP/RFP-aydınlık alan birleşik).



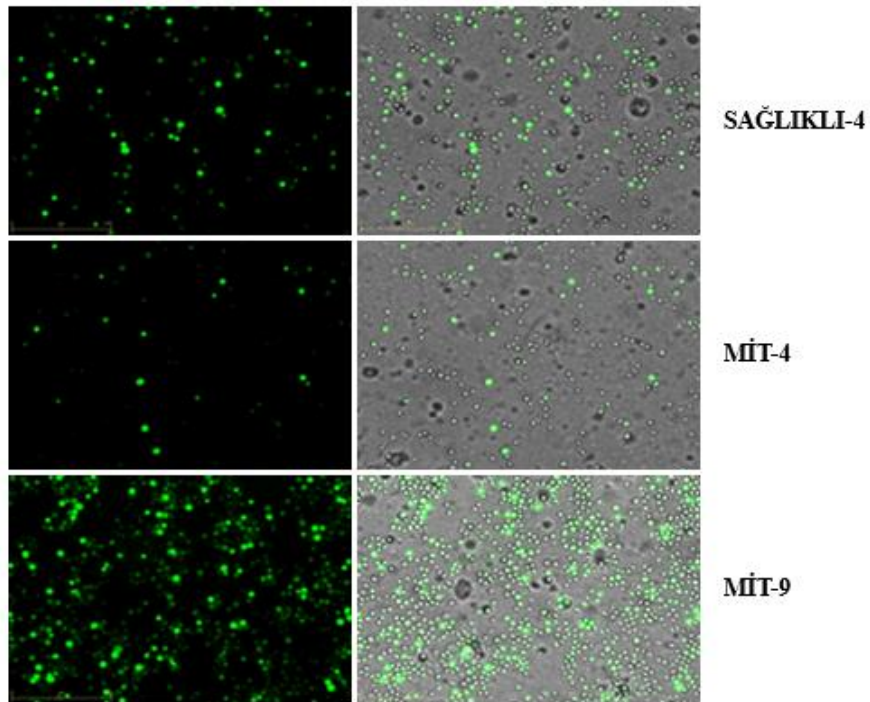
Şekil 4.56. Sağlıklı ve MMA hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, GFP/GFP-aydınlık alan birleşik).



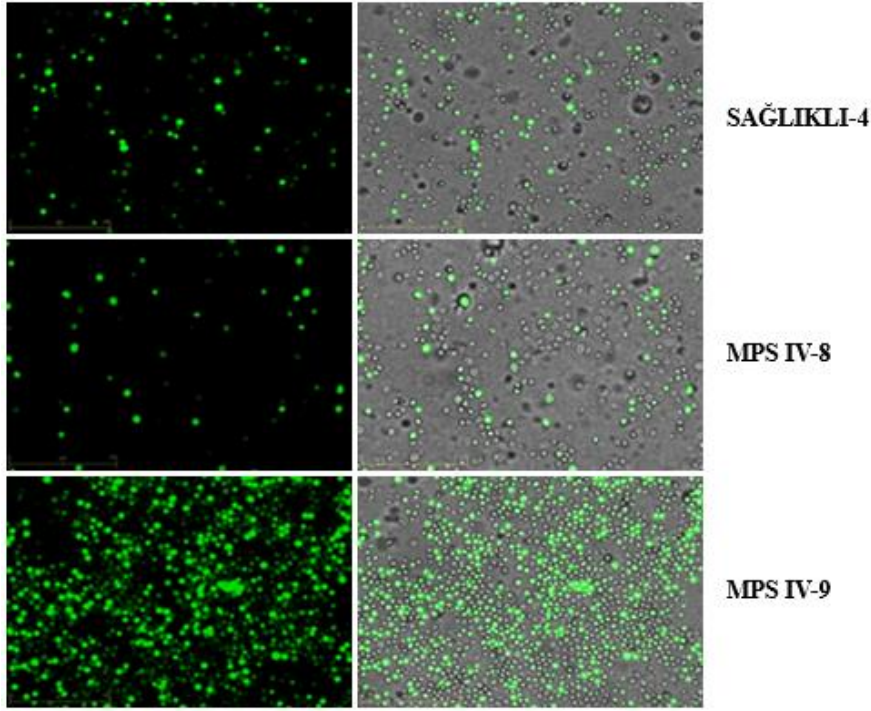
Şekil 4.57. Sağlıklı ve PA hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, GFP/GFP-aydınlık alan birleşik).



Şekil 4.58. Sağlıklı ve İVA hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, GFP/GFP-aydınlık alan birleşik).

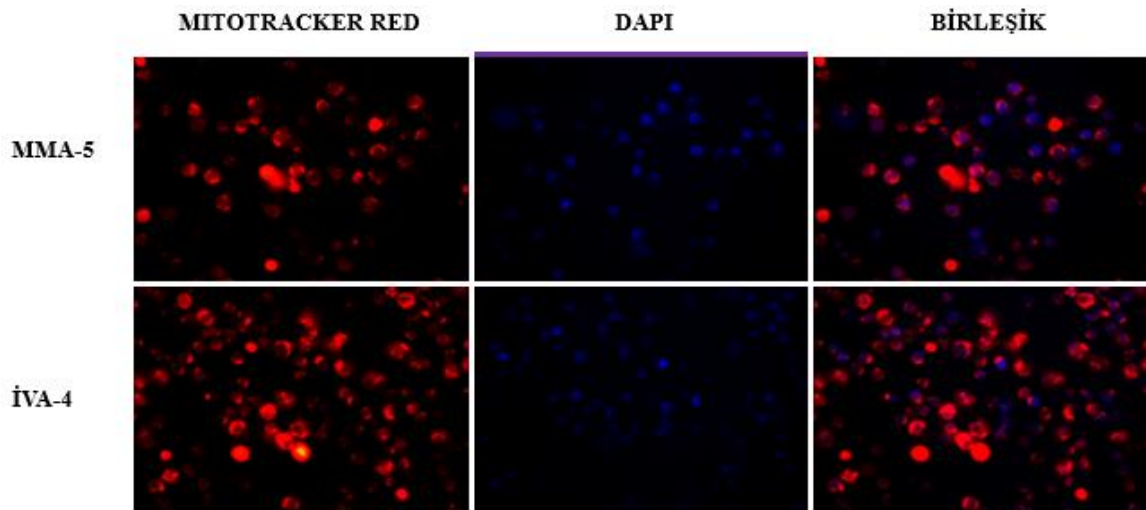


Şekil 4.59. Sağlıklı ve MİT hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, GFP/GFP-aydınlık alan birleşik).

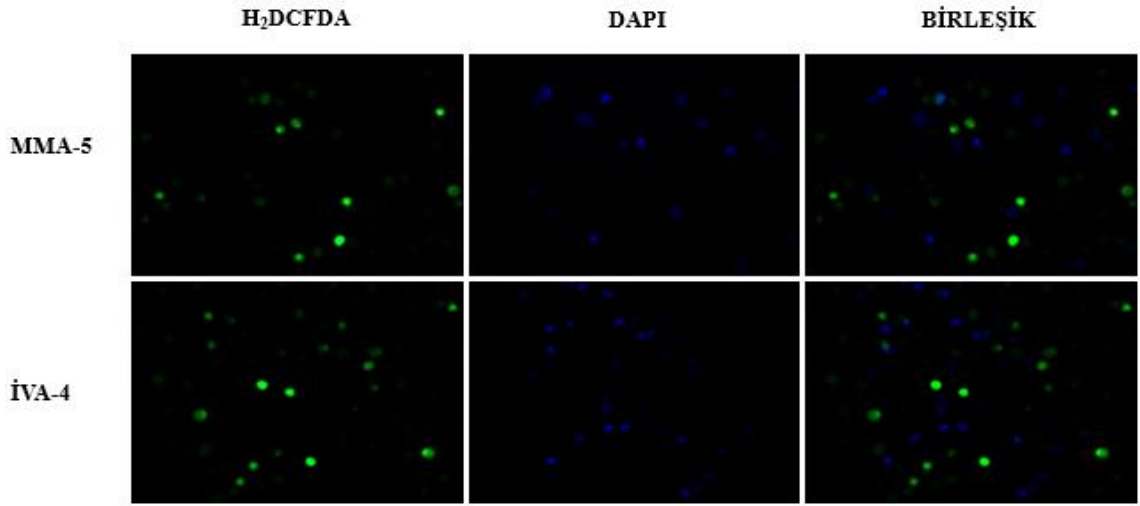


Şekil 4.60. Sağlıklı ve MPS IV hasta gruplarında hücre içi ROS miktarlarının görüntülenmesi (x20 büyütme, GFP/GFP-aydınlık alan birleşik).

MMP ve ROS'un PBMC içerisindeki dağılımını görebilmek amacıyla her KMH grubundan rastgele seçilen birer hastanın x63 büyütme ile floresan mikroskopta görüntüsü alındı. Görüntüleme sonuçlarına örnek teşkil etmesi amacıyla MMA ve İVA gruplarından seçilen görüntüler Şekil 4.61 ve Şekil 4.62'de gösterilmiştir.



Şekil 4.61. MMA ve İVA hasta gruplarında Mitotracker Red ve DAPI görüntülenmesi (x63 büyütme).

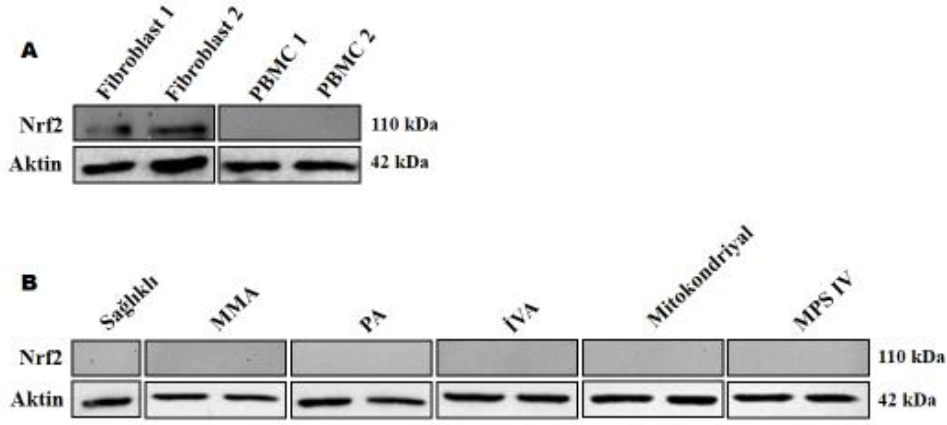


Şekil 4.62. MMA ve İVA hasta gruplarında H₂DCFDA ve DAPI görüntülenmesi (x63 büyütme).

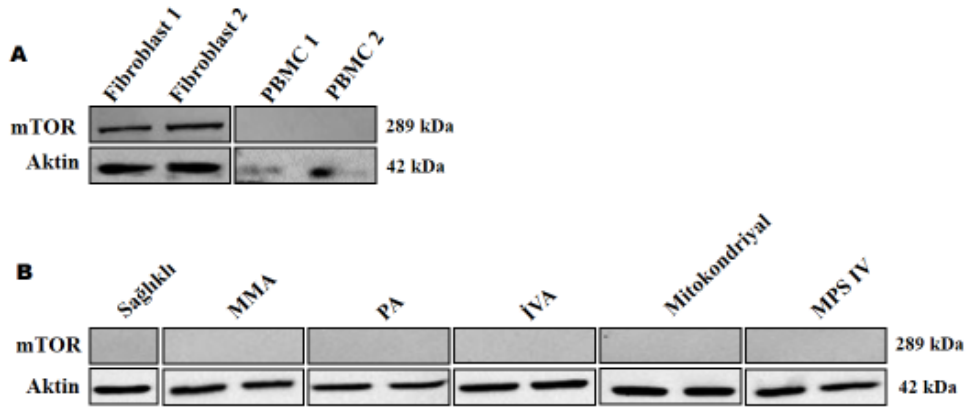
4.1.4. Western Blot Analizleri

Western Blot analizi ile sağlıklı ve KMH gruplarından izole edilen protein ekstraktlarında anti- Nrf2, anti-Keap1, anti-p62, anti-Beclin1, anti- LC3B ve anti-mTOR primer antikorları kullanılarak Nrf2 ve mTOR hariç diğer proteinlerin özgül protein ifadeleri gösterildi. Housekeeping olarak β -aktin proteini kullanıldı. Nrf2 ve mTOR proteinleri kontrol deneylerinin yapıldığı fibroblastlarda görüntülenebilirken, gerek kontrol deneylerinde gerekse çalışma kapsamında kullanılan PBMC'lerde protein ifadesi gösterilemedi. Yapılan hücre çalışmalarının bir indüksiyon basamağı içermemesi, PBMC'lerin hücre kültürüne alınamaması, ekstra deterjan muamelesi uygulanmaması (hücre zarları ile protein bağlantısının indirgenmesi için), 30 μ g total protein miktarının ekspresyonu görüntülemek için yeterli olmaması ve protein zenginleştirme (immünopresipitasyon ya da sitoplazmik/nükleer protein izolasyonu ile) yapılamaması sebebiyle fibroblasta göre az olan protein ekspresyon seviyelerinin gösterilemediği düşünülmektedir [237-240].

Nrf2 ve mTOR proteinlerine ait kontrol ve çalışma grubu deneylerinin western blot membran görüntüleri aşağıda gösterilmektedir.

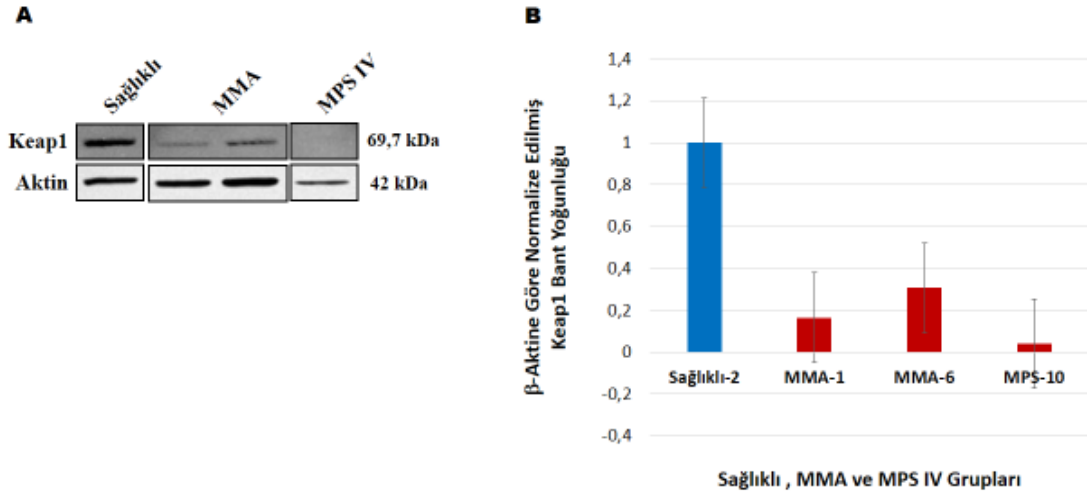


Şekil 4.63. Sağlıklı ve KMH gruplarında Nrf2 western blot analizi (A-Kontrol deneyi; B- çalışma deneyi).

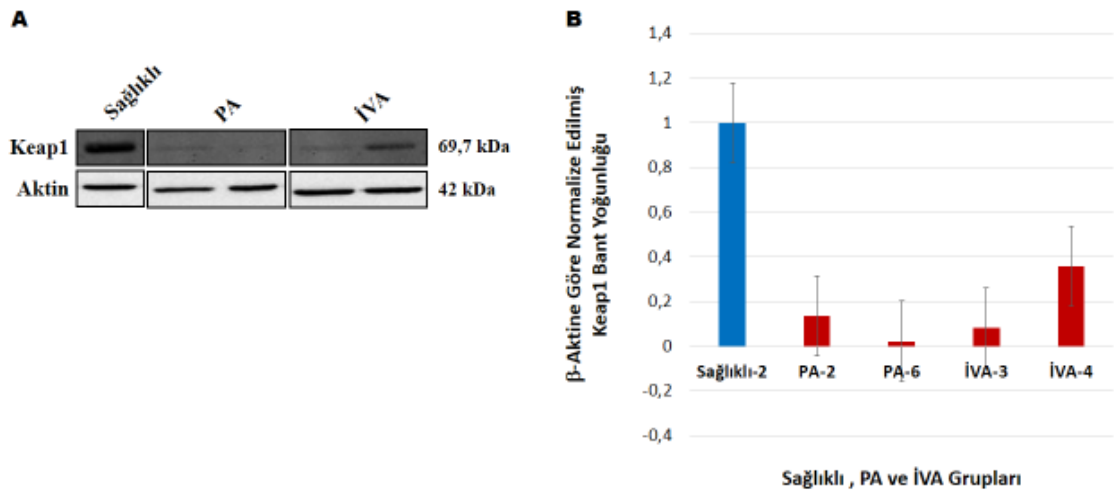


Şekil 4.64. Sağlıklı ve KMH gruplarında mTOR western blot analizi (A-Kontrol deneyi; B- çalışma deneyi).

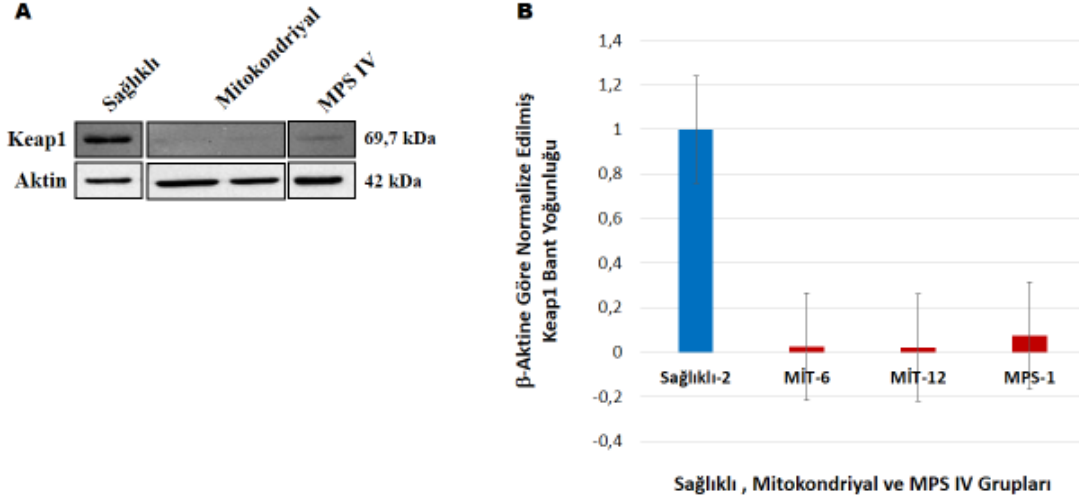
Keap1, p62, Beclin1 ve LC3B proteinlerinin çalışma deneylerinin western blot membran görüntüleri ve image j analizi sonrası β -aktine göre normalize edilmiş bant yoğunlukları aşağıda gösterilmektedir.



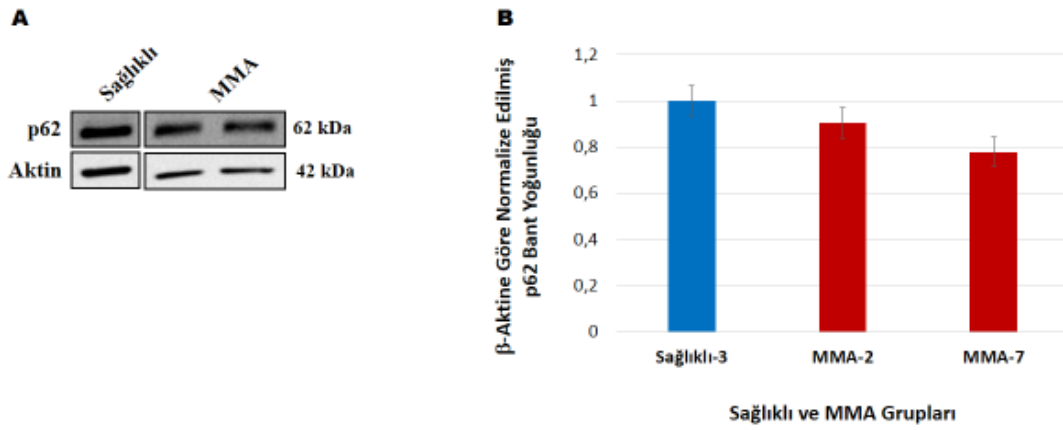
Şekil 4.65. Sağlıklı, MMA ve MPS IV gruplarında Keap1 western blot analizi (A-membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



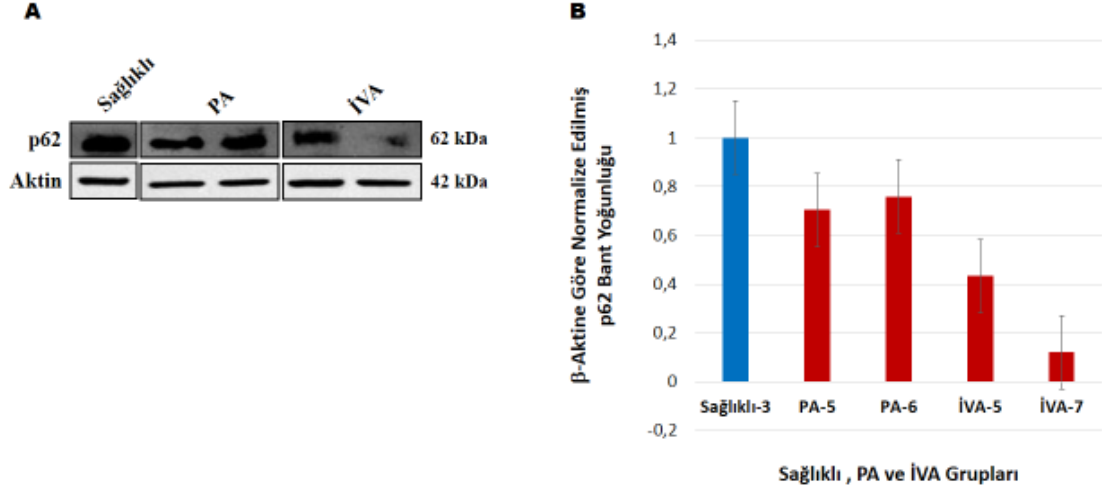
Şekil 4.66. Sağlıklı, PA ve İVA gruplarında Keap1 western blot analizi (A-membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



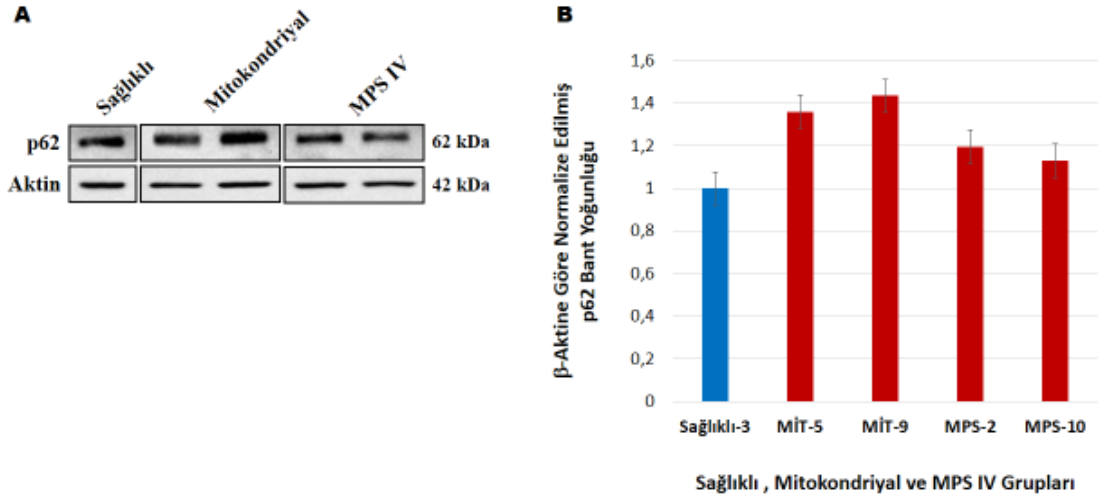
Şekil 4.67. Sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında Keap1 western blot analizi (A- membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



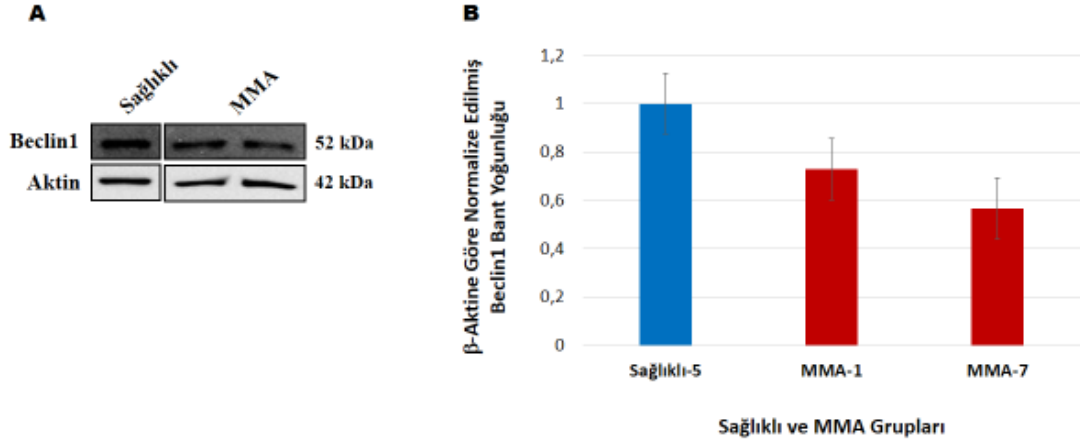
Şekil 4.68. Sağlıklı ve MMA gruplarında p62 western blot analizi (A- membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



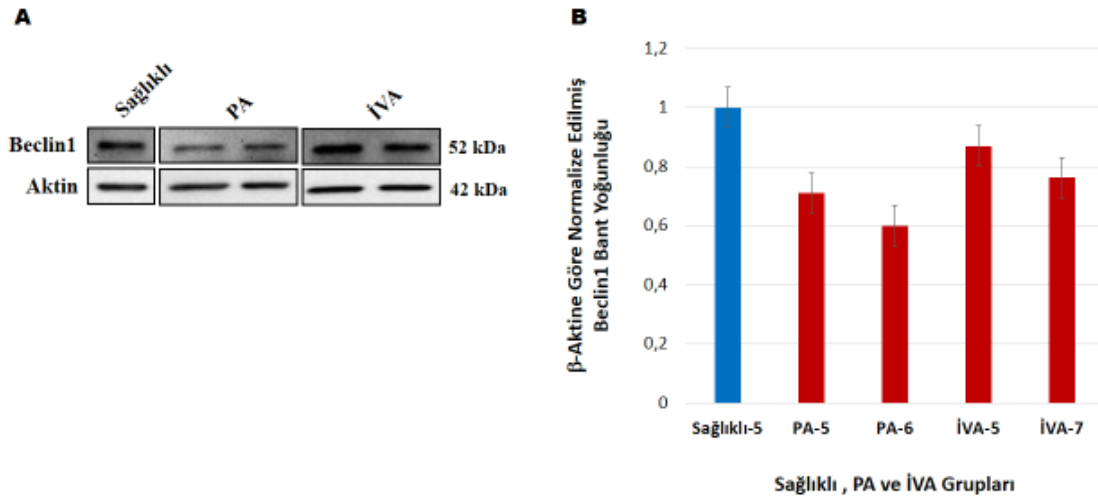
Şekil 4.69. Sağlıklı, PA ve İVA gruplarında p62 western blot analizi (A-membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



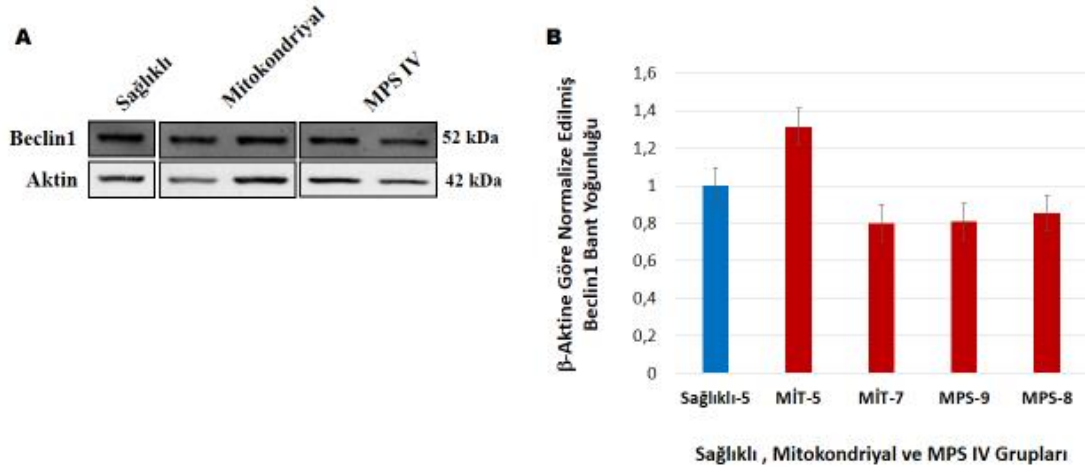
Şekil 4.70. Sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında p62 western blot analizi (A-membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



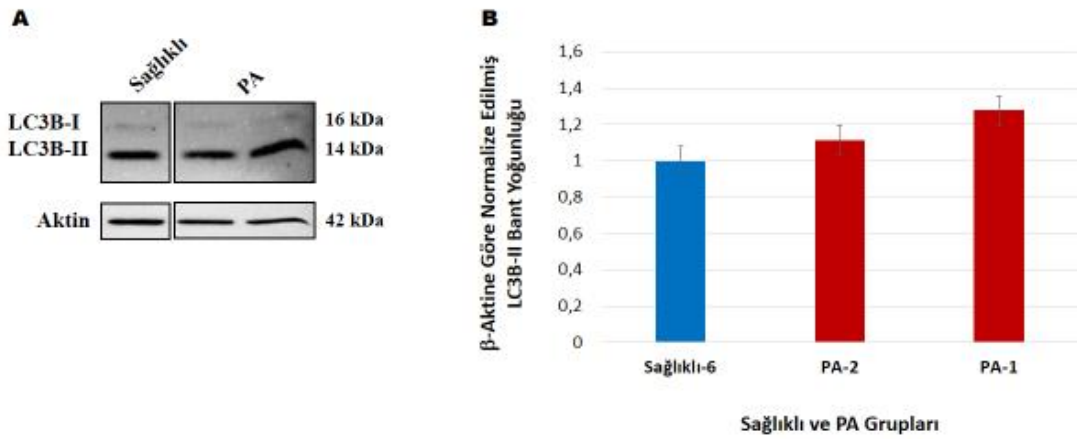
Şekil 4.71. Sağlıklı ve MMA gruplarında Beclin1 western blot analizi (A-membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



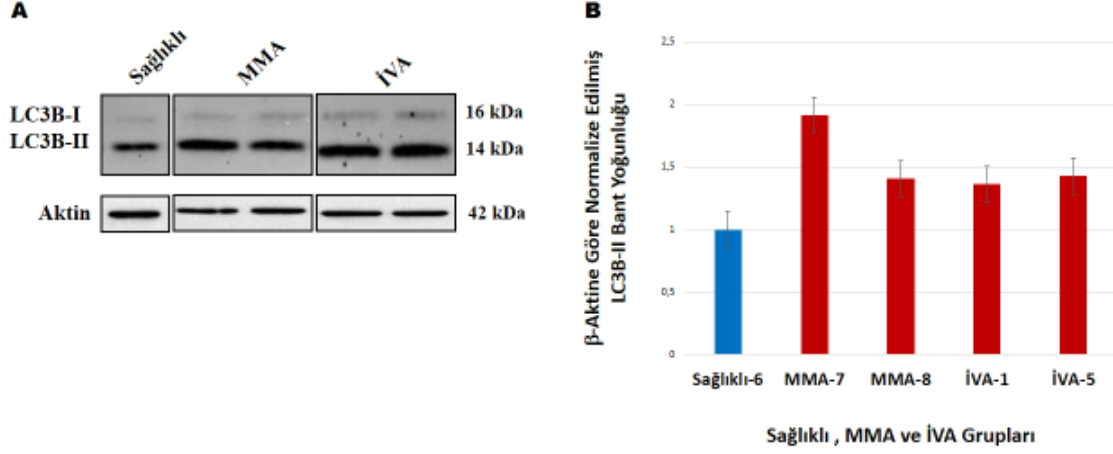
Şekil 4.72. Sağlıklı, PA ve İVA gruplarında Beclin1 western blot analizi (A-membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



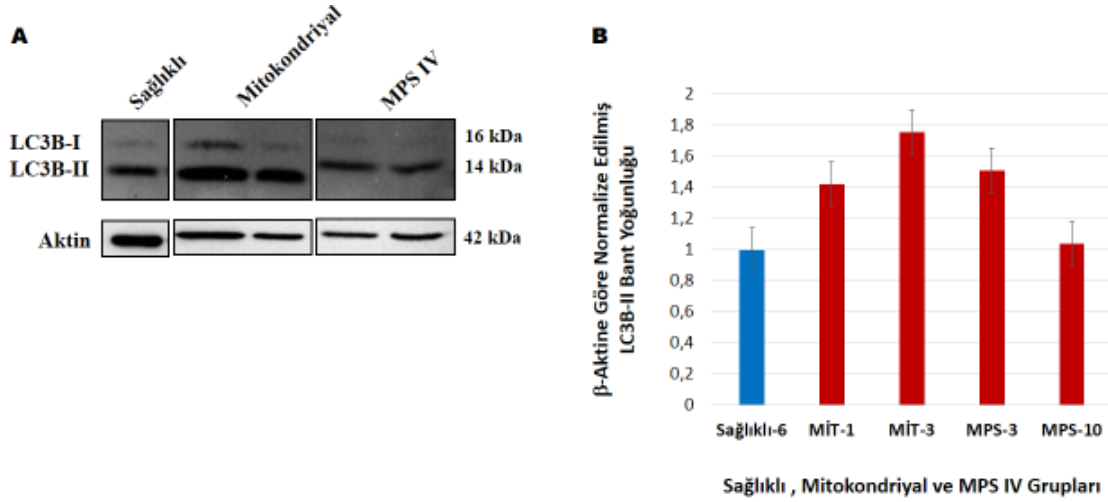
Şekil 4.73. Sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında Beclin1 western blot analizi (A-membran görüntüsü; B- bant yoğunluğu).



Şekil 4.74. Sağlıklı ve PA gruplarında LC3B western blot analizi (A-membran görüntüsü; B- LC3B-II bant yoğunluğu).



Şekil 4.75. Sağlıklı, MMA ve İVA gruplarında LC3B western blot analizi (A- membran görüntüsü; B- LC3B-II bant yoğunluğu).



Şekil 4.76. Sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında LC3B western blot analizi (A- membran görüntüsü; B- LC3B-II bant yoğunluğu).

4.2. TARTIŞMA

Birçok KMH'nin patofizyolojisinin, birbiriyle ilişkili ve sıklıkla çakışan faktörler içerdiği önerilmektedir:

- Temel bir metabolik ara maddenin eksikliği,
- Zararlı bir metabolitin birikimi sonucu ikincil toksisite,
- Toksik metabolitlerin birikimi ile oksidatif stresin artışı ve mitokondriyal disfonksiyon,

- Mitokondriyal disfonksiyon sonucu mitokondriyal enzimlerin ve süreçlerin inhibisyonu, bozulmuş enerji metabolizması ve ROS seviyelerinin artışı,
- Artan ROS seviyesi ile birlikte antioksidan kapasitesinde değişiklikler ve DNA, protein ve lipitlerde oksidatif hasarın artması [8-10].

Geçmiş yıllarda ROS sinyallerinin karmaşık ve dinamik rolleri, normal ve patolojik süreçlerde yapılan çalışmalarla derinlemesine anlaşılmasına rağmen, KMH'lar ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda da KMH'ların ROS'u ürettiği kesin mekanizmaların tam olarak bilinmediği ve KMH'larda redoks sinyal yolları ile ilgili yapılan çalışmaların hala başlangıç aşamasında olduğu belirtilmektedir [7, 8].

ROS ile otofaji arasındaki kesin moleküler detaylar hakkındaki araştırmalar hala sürmekte birlikte, hücrel ROS homeostazının sağlanması için ROS'un otofajiyi indükleyebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. KMH'ların yeni bir grubu olarak tanımlanan otofajinin konjenital bozukluklarının ve lizozomal depo hastalıklarının doğrudan otofaji yolağı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak organik asidürilerde ve mitokondriyal hastalıklarda otofajinin yadsınmayacak rolü olduğu bilinmekle birlikte literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır [208, 221, 223, 230, 232].

Bu çalışmada oksidatif stres ve antioksidan cevabın sistemik etkisini gözlemleyebilmek için, sağlıklı ve hasta gruplarının serum örneklerinde TAS/TOS/OSİ analizleri gerçekleştirildi. TAS analizleri sonucu, sağlıklı ve KMH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan farklılığın ($p=0,004$) MMA, MİT ve MPS IV gruplarından kaynaklandığı bulunmuştur. Sağlıklı gruba kıyasla en yüksek TAS değeri MMA grubunda saptanmıştır ($p=0,005$). İstatistiksel olarak anlamlılık saptanamamakla birlikte sağlıklı gruba kıyasla düşük TAS değerine sahip KMH grupları sırasıyla MİT ve MPS IV grupları olarak tespit edilmiştir. PA ve İVA gruplarının TAS değerlerinin sağlıklı gruba çok yakın olduğu görülmüştür. TOS analizi sonucu sağlıklı ve KMH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilememekle birlikte, sırasıyla MMA, İVA ve MPS IV gruplarında sağlıklı gruba kıyasla yüksek TOS değerleri saptanmıştır. PA ve MİT gruplarının TOS değerlerinin sağlıklı gruba çok yakın olduğu görülmüştür. Oksidatif gücün bir göstergesi olan, TAS değerinin TOS değerine bölünmesi ile bulunan OSİ analizi sonucu sağlıklı ve KMH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde

edilmemekle birlikte, sırasıyla MPS IV, İVA ve MMA gruplarında sağlıklı gruba kıyasla yüksek TOS değerleri saptanmıştır. PA ve MİT gruplarının OSİ değerlerinin sağlıklı gruba çok yakın olduğu görülmüştür.

Elde edilen TAS/TOS/OSİ analizleri sonucu, MMA grubunda serum düzeyinde saptanan yüksek oksidatif strese, aynı şekilde yüksek antioksidan kapasite ile cevap verildiği söylenebilir. PA grubunda serum seviyesinde oksidan ve antioksidan seviyelerinin sağlıklı gruba oldukça yakın olması bu grupta sistemik bir oksidatif stres etkisinin görülmediğini düşündürmektedir. İVA grubunda sağlıklı gruba kıyasla bir miktar yüksek seyreden oksidan seviyesi, sağlıklı gruba oldukça yakın olmakla birlikte bir miktar düşük seyreden antioksidan kapasite seviyesi nedeniyle serum düzeyinde kısmi oksidatif yük artışı görülmüştür. En yüksek oksidanın tespit edildiği MMA grubu, göstermiş olduğu yüksek antioksidan kapasite sayesinde İVA grubuna göre oksidatif yük ile daha efektif bir şekilde başa çıkmıştır. MİT grubunun serum oksidan ve antioksidan seviyeleri sağlıklı gruba göre kısmi bir düşüklük göstermekle birlikte oldukça yakın olması, bu grupta sistemik bir oksidatif stres etkisinin görülmediğini düşündürmektedir. MPS IV grubunda sağlıklı gruba kıyasla bir miktar yüksek seyreden oksidan seviyesi, sağlıklı gruba oldukça yakın olmakla birlikte bir miktar düşük seyreden antioksidan kapasite seviyesi nedeniyle serum düzeyinde kısmi oksidatif yük artışı görülmüştür.

KMH gruplarında grup içi bireysel TAS değerleri incelendiğinde, MMA grubundaki bireylerin TAS değerlerinin sağlıklı gruba kıyasla artma eğiliminde olduğu görülmektedir. PA grubunda bireylerde sağlıklı gruba kıyasla düzenli bir artış ve azalış görülmemiştir. İVA grubundaki bireylerin TAS değerlerinin sağlıklı gruba kıyasla MMA grubundaki bireylerin aksine azalma eğiliminde olduğu görülmektedir. İVA grubundaki bir bireyde gözlenen yüksek TAS değerinin yaş dolayısıyla kaynaklandığı görülmüştür. MİT grubundaki bireyler sağlıklı gruba kıyasla azalan ve artan TAS değerleri ile 2 farklı grup gibi davranmaktadır. MPS IV grubundaki bireylerin TAS değerlerinin, İVA grubu ile benzer şekilde sağlıklı gruba kıyasla azalma eğiliminde olduğu görülmektedir.

KMH gruplarında grup içi bireysel TOS değerleri incelendiğinde, MMA, MİT ve MPS IV gruplarındaki bireylerin sağlıklı gruba kıyasla azalan ve artan TOS değerleri ile 2 farklı grup gibi davrandıkları görülmüştür. PA ve İVA gruplarındaki bireylerde ise sağlıklı gruba göre fark yoktur. KMH gruplarında grup içi bireysel OSİ değerleri de TOS

değerlerinin rastgele davranış paterni sergilemesi sebebiyle TOS değerleriyle aynı sonuçları göstermektedir.

Bugüne kadar KMH'lar için serumda TAS/TOS/OSİ analizlerinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmalar, genel olarak idrarda antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi, antioksidan enzimlerin ölçümü ve DNA, protein, lipid hasarının belirlenmesine yönelik gerçekleştirilmiştir. Oksidan miktarı ve oksidatif yükün antioksidan kapasite ile eş zamanlı değerlendirildiği çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Mc Guire ve arkadaşları; 8 homosistinüri, 9 MSUD, 9 kobalamin hastalığı, 8 PA ve 8 ornitin transkarbamilaz eksikliği olan toplam 41 KMH ve 60 kontrol bireyini dahil ettiği çalışmada idrarda oksidatif stres hasar belirteçleri ve idrar antioksidan aktivitesini değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda izoprostan ve di-tirosin hasar belirteçlerinin özellikle kobalamin bozuklukları başta olmak üzere tüm KMH gruplarında anlamlı düzeyde yüksek olduğu, idrar antioksidan kapasitesinin başta kobalamin bozuklukları ve PA olmak üzere düşük olduğu saptanmıştır. PA ile aynı metabolik yolda yer alan MMA hastalarının da düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirtilmiştir [9, 241, 242].

Ribas ve arkadaşları; tanı koyulan 3 PA ve 4 MMA, tedavi altında olan 3 PA ve 5 MMA olmak üzere toplamda 7 ve 8 bireyi içeren 2 KMH ve 6 kontrol bireyini dahil ettiği çalışmada idrarda oksidatif stres hasar belirteçleri, L-karnitin ve idrar antioksidan aktivitesini değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda izoprostan ve di-tirosin hasar belirteçlerinin tedavi edilen hastalarda tedavi edilmeyenlere göre daha düşük çıktığı, lipid ve protein oksidatif hasarı daha yüksek olan hastalarda L-karnitin seviyelerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir. Hem tedavi edilen hem de tedavi edilmeyen hastalarda kontrol grubuna göre düşük idrar antioksidan kapasitesi saptanırken, tedavi edilen grupta anlamlı olmamakla birlikte tedavi edilmeyen gruba göre daha düşük idrar antioksidan kapasitesi görülmüştür. Bu durumun, tedavi için uygulanan kısıtlı diyet nedeniyle ya da hücrenin antioksidan kapasitesini doğrudan veya dolaylı olarak hücrenin antioksidan kapasitesini tüketen metabolik yan ürünlerde olağandışı bir artışla meydana gelebileceği varsayılmaktadır [242, 243].

Victor'un yapmış olduğu tez çalışmasında MMA ve PA için hücre modeli oluşturup, ayrıca 7 MMA, 4 PA ve 5 kontrol bireyini dahil ettiği çalışmada plazma ve idrar örneklerinde yağ asidi oksidasyonu, dallı-zincirli amino asit metabolizması, protein ve lipit oksidasyonu ve antioksidan kapasiteyi değerlendirmiştir. İdrar antioksidan kapasitesi MMA grubuna göre düşük saptanırken, PA grubunda da düşük görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir [244].

Örnek toplama işlemi kolaylığından dolayı idrar, antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde değerli bir biyolojik örnektir. Ancak idrarın; kan bileşiminin, dokuların metabolik aktivitesinin ve üretildikleri ve atıldıkları organların durumunu yansıtmada yetersiz kaldığı bilinmektedir [245]. Bu sebeple çalışmada antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi serum örneklerinde gerçekleştirilmiş, ilaveten oksidan kapasite ve oksidatif gücün göstergesi olan OSİ analizi kullanılmıştır. Literatürde MMA ve PA grupları için saptanan düşük idrar antioksidan kapasitesinin aksine, çalışmada serum düzeyinde MMA grubunda sağlıklı gruba kıyasla yüksek, PA grubunun ise sağlıklı grup ile benzer antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür. Bu durum idrar antioksidan kapasite ölçümünün oksidatif stresin sistemik etkisini yansıtmada yetersiz kaldığını düşündürmektedir. İlaveten, çalışmada sadece MMA grubunda anlamlı antioksidan kapasite değerinin elde edilmesi, diğer gruplarda sağlıklı gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı sonuçların bulunmamasının sebebinin; her bir KMH grubundaki birey sayısının azlığı, KMH grupları içindeki bireylerin sağlıklı gruba kıyasla TAS/TOS değerleri açısından düzenli bir artış ve azalış göstermemesi ve her bir KMH grubunun almış olduğu tedaviye bağlı olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında ayrıca, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun KMH'larda hücresel etkisini gözlemleyebilmek için hücre içi ATP, ROS ve MMP nicel ölçümleri ve hücre görüntülemesi gerçekleştirildi. Sağlıklı grup ile 5 farklı KMH hasta grubu; ayrı ayrı hücre içi ATP, ROS ve MMP miktarının ölçüm değerleri açısından tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (Independent Samples t Test) ile incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Hücre içi ATP, ROS ve MMP ölçümlerinin değerlendirilmesinde kullanılan tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile yapılan etki büyüklüğü analizleri sonucu gözlenen orta ile büyük arasındaki etki büyüklükleri, klinik olarak önemli kabul edilecek fark olduğunu göstermekle birlikte, örneklem büyüklüğünün küçük olmasına

işaret etmektedir. Yine benzer şekilde hücre içi ATP, ROS ve MMP ölçümlerinin değerlendirilmesinde kullanılan iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi (Independent Samples t Test) ile yapılan etki büyüklüğü analizleri sonucu gözlenen küçük etki büyüklükleri, çalışmanın daha fazla örneklem genişliği gerektirdiğini vurgulamaktadır. Dolayısıyla istatistiksel olarak anlamlı farklılığın bulunamama sebebinin örneklem büyüklüğünün azlığının olduğu düşünülmekle birlikte, nadir hastalıklar çalışılması sebebiyle ortalama değerler ve bireysel analizlerle sonuçlar değerlendirilmiştir [246, 247].

Hücre içi ROS miktarı ortalama değerlerine göre incelendiğinde, sırasıyla MMA ve İVA grupları sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında daha yüksek; PA, MPS IV ve MİT gruplarının ise daha düşük hücre içi ROS değerine sahip olduğu görüldü. Hücre içi ATP miktarı ortalama değerlerine göre incelendiğinde, İVA grubunun sağlıklı grubun hücre içi ATP değerlerine oldukça yakın olduğu saptandı. Sırasıyla MİT, PA ve MPS IV gruplarının ise sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında daha yüksek, MMA grubunun ise daha düşük hücre içi ATP değerine sahip olduğu görüldü. Hücre içi MMP miktarının ortalama değerleri incelendiğinde, hiçbir KMH grubunda anlamlı bir yükseklik ya da düşüklüğe rastlanmadı. Ancak MMP'nin optimum değerinin %10 altı ve üstündeki değişikliklerin bile, ATP sentezinde ~% 90 azalma ve ROS üretiminin ~% 90 artışı ile sonuçlandığının bilinmesi sebebiyle, çalışmada MMP'de gözlenen küçük değişimlerin dahi göz ardı edilmemesinin gerektiği sonucuna varılmıştır [248].

MMA grubunda gözlenen yüksek ROS miktarı ve ATP tüketimi, oksidatif stresin varlığına işaret etmektedir. Genel anlamda mitokondriyal disfonksiyon, ATP ve MMP'de azalma, ROS miktarındaki artış ile karakterizedir. MMA grubunda az da olsa gözlenen MMP'deki artış, başta mitokondrideki fonksiyon bozukluğunu dışlıyor gibi görünse de hücrelerdeki artan MMP ile gözlenen biyoenerjetik dengesizlik mitokondri fonksiyonunda meydana gelen bir değişikliğe işaret etmektedir. Bu durumun, H⁺-ATP sentaz inhibisyonu ile hücre sağkalımı, antioksidan ve onarım yollarının aktivasyonu yoluyla sitoprotektif etki sağlayan hafif mitokondriyal disfonksiyonu (IF1-aracılı mitohormetik cevap) temsil ediyor olabileceği düşünülmektedir. IF1-aracılı mitohormetik yanıt, sitotoksik maddeye yanıt olarak hücre ölümünün keskin bir şekilde azaltılmasıyla ifade edilir. [249-251]. TAS analizlerinde MMA grubunda gözlenen anlamlı yükseklik, ATP tüketimini ve hafif mitokondriyal disfonksiyonu doğrular

niteliktedir. Ancak tespit edildiği düşünölen hafif mitokondriyal disfonksiyonun, MMA grubunda saptanan oksidatif stres ile hücrenin başa çıkabilmek, ölüm yollarına yönlendirilmeden hayatta kalmak için geliştirdiği bir adapasyon mu yoksa yüksek oksidatif stres ile karakterize mitokondriyal bir hasar olup olmadığının öğrenilmesi için ileri mitokondriyal fonksiyon analizlerine ihtiyaç olduğu düşünölmektedir.

Brasil ve arkadaşları, 4 MMA hastası ve 1 kontrol fibroblastı ile yapmış olduğu çalışmada her bir hastayı oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon ile ilgili çeşitli parametreler açısından inceledi. Hastalar arası farklılık görölmekle birlikte ROS üretiminde artış, mitokondriyal solunumda azalma ve mitokondri morfolojisinde kontrol hücrelerine kıyasla değişiklik olduğunu göstererek MMA hastalarında mitokondriyal disfonksiyon olduğunu düşündüklerini rapor etmişlerdir [252].

Luciani ve arkadaşları MMA hasta böbrek hücresi ve hayvan modelleri ile yapmış olduğu oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon, antioksidan cevap ve otofaji ilişkili yapmış olduğu çalışmada, mitokondriyal disfonksiyon ve artan oksidatif stres sonucu sağlıklıya göre yüksek antioksidan cevabın geliştiğini bildirmiştir [253].

Richard ve arkadaşları, 19 MMA hasta fibroblastı ve 3 kontrol hücre hattı ile yapmış olduğu çalışmada, hastalar arası farklılık görölmekle birlikte genel olarak ROS üretiminde artışın hastalık patafizyolojisi ile ilişkili olduğunu belirtmiştir [254].

Genel olarak, bugüne kadar MMA hastaları, hücre hatları ve model organizmalar ile yapılan deneyler; bu hastalıktaki mitokondriyal bozulma, spesifik enzimlerin ve taşıyıcıların inhibisyonu, mitokondriyal metabolik yollar için substratların mevcudiyetinde sınırlama, ara metabolitlerin toksisitesi ve oksidatif hasarın bir kombinasyonu ile ortaya çıktığına işaret etmektedir [255].

Yapılan tüm çalışmalar, bu çalışmada MMA grubunda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermekle birlikte, mitokondriyal disfonksiyon açısından kuvvetli bir kanıtımız bulunmamaktadır. İlâveten, literatürdeki çalışmalarla benzer şekilde bu çalışmada da sağlıklı bireylere oranla artmış ATP tüketimi ve ROS miktarı saptanmasına rağmen, MMP'de artış tespit edilmiştir. Çalışmalarda MMA hastalarının farklı hücrelerinin kullanılması ve gruptaki hasta bireyler arasındaki farklılıklar sebebiyle bu durumun

görüldüğü düşünülmektedir. Bu çalışmada yapılan hücre görüntülemeleri de MMA grubu içerisindeki bireyler arası farklılığı gözler önüne sermektedir. Bu durumun MMA hastalarının almış olduğu tedavilere ve beslenme farklılıklarına bağlı olduğu düşünülmektedir.

İVA grubunda MMA grubu dışındaki diğer gruplara göre görülen yüksek ROS seviyesi, MMA grubundaki kadar şiddetli olmamakla birlikte, ATP seviyelerinde saptanan düşük seviyedeki artışın hücrenin yüksek ROS seviyesi ile başa çıkmak için enerji seviyelerini arttırdığını düşündürmektedir. Ancak İVA grubu için yapılan TAS analizleri sonucunun sağlıklı gruba çok yakın olması, antioksidan cevabın yetersiz kaldığına işaret etmektedir. MMA grubunda olduğu düşünülen mitohormetik cevap ile yüksek ROS seviyesine karşılık geliştirilen artmış antioksidan yanıt İVA grubunda görülmemektedir. İVA grubunda MMP analizi sonuçlarının sağlıklı gruba yakın olması hafif mitokondriyal disfonksiyunun görülmediğini doğrular niteliktedir. İVA grubundaki hasta bireyler arasında ATP tüketimi, ROS miktarı ve mitokondri fonksiyonu açısından farklılık gözlenmektedir. Çalışmada yapılan hücre görüntülemeleri de İVA grubu içerisindeki bireyler arası farklılığı göstermektedir. Bu farklılığın İVA hastalarına uygulanan tedavilere ve beslenme farklılıklarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma İVA hastalarında ATP, ROS ve MMP ölçümlerinin yapıldığı ilk çalışmadır.

Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında, sırasıyla PA, MPS IV ve MİT gruplarında saptanan daha düşük ROS miktarları bu hastalarda azaltıcı stresi işaret etmektedir. ATP miktarlarında sırasıyla MİT, PA ve MPS IV gruplarında sağlıklı gruba oranla görülen yüksek ATP düzeyi, bu gruplarda görülen düşük ROS seviyeleri ile uyumlu değildir. Çünkü hücre içi ATP miktarı artışının ETS'de ROS üretimini de arttırması beklenirken, hasta gruplarında düşük ROS seviyeleri saptanmıştır. Düşük ROS seviyesine karşı saptanan yüksek ATP miktarının, kronik azaltıcı stres ile başa çıkabilmek için mitohormesis olarak adlandırılan bir işlem sonucu geliştiği düşünülmektedir. Hücrede mitohormesis mekanizması kullanılarak mitokondriyal biyogenez ve antioksidan kapasite arttırılıp, kısmi ROS oluşumu sağlanarak, en az yüksek ROS miktarı kadar zararlı olan düşük ROS miktarının da hücresel optimum seviyeye getirilmesi sağlanmaktadır. Kronik olarak gözlenen azaltıcı stres, arttırılan ROS miktarı ile giderilmeye çalışılmakla birlikte, yüksek antioksidan seviyeleri de azaltıcı stresi tetikleyerek bir kısır döngü oluşturabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı azaltıcı streste; antioksidan yanıtın,

dolayısıyla NRF2 ekspresyonunun ve ROS miktarının eş zamanlı değerlendirilmesi gereklidir. Buna ek olarak, aşırı hücrel NAD(P)H ve/veya GSH birikimi ile karakterize olan azaltıcı stresin ER'deki katlanmamış protein cevabı ile de ilişkili olduğunun göz ardı edilmemesi gerekmektedir [12, 14, 16].

Bugüne kadar PA, MİT ve MPS IV hasta gruplarında ROS, ATP ve MMP'nin birlikte incelendiği bir çalışma mevcut değildir. Yapılan kısıtlı sayıdaki çalışmalarda PA ve MPS IV hastalarında, sadece ROS ve hücrel hasar üzerine odaklanılmıştır. MİT ve MPS IV grubu hastalarda ROS, ATP ve MMP'nin bir arada çalışıldığı bir yayın yoktur.

Gallego-Villar ve arkadaşlarının 10 PA hastası ve 5 sağlıklı bireye ait fibroblastlar ile yapmış olduğu çalışmada PA hastalarında oksidatif stres tespit edilmiştir. Yüksek oksidatif stresin saptandığı hasta fibroblastlarının çoğunda, bazal apoptoz seviyesinde kontrole kıyasla orta seviyede bir artış görülmüştür [256]. Gallego-Villar ve arkadaşlarının yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise 10 PA hastası ve 2 ticari kontrol fibroblast kullanılarak, yedi antioksidanın PA hastalarının hücrelerinde ROS üretimini azaltma yeteneği analiz edilmiştir. Antioksidan uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre yüksek ROS değerleri saptadıkları fibroblastlarda, ROS üretiminde azalma gözlediklerini belirterek, antioksidan tedavilerinin PA hastalarında bir tedavi yöntemi olarak uygulanabileceğini belirtmektedirler [257].

Gallego-Villar ve arkadaşlarının aksine, De Keyzer ve arkadaşlarının 2 PA ve 4 MMA hastasının fibroblastı ile yapmış olduğu çalışmada, 1 PA hastasında azalmış ROS üretimi ve antioksidan tespit edilmiştir [258].

Bu tez çalışmasına dahil edilen 6 PA hastasının 4'ünde sağlıklı gruba göre düşük, 2 PA hastasında ise yüksek ROS seviyesi saptanmıştır. Çalışmada yapılan hücre görüntülemeleri de PA grubu içerisindeki bireyler arasında değişen ROS seviyelerini göstermiştir. Dolayısıyla PA hastalarında gözlenen sağlıklı gruba göre az ve çok ROS seviyeleri sebebiyle diğer organik asidüriler gibi PA hastalarının oksidatif stres ile ilişkili olduğunu söyleyebilmenin mümkün olmadığını düşünmekteyiz. Ayrıca azalan ROS miktarının en az artan ROS miktarı kadar tehlikeli olması sebebiyle, PA hastalarının patofizyolojisinde bu durum göz ardı edilmemelidir. Antioksidan terapilerin azaltıcı stresi

daha da şiddetlendirebileceği göz önünde bulundurularak her bir PA hastasının bireysel değerlendirilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmaya dahil edilen MİT hastalarında PA ve MPS IV hastalarına göre daha yüksek ROS miktarı saptanmakla birlikte, ATP miktarı en yüksek olan gruptur. MİT hastalarında kısmi düşük ROS miktarına karşı gözlenen en yüksek ATP miktarı, bu hastalıkların patofizyolojisinde rol alan mekanizmalardan birisi olarak önermiş olduğumuz mitohormesis hipotezini doğrular niteliktedir. Çalışmada yapılan hücre görüntülemelerinde, MİT grubu içerisindeki bireyler arasında değişen ROS seviyeleri olması sebebiyle, bireysel değerlendirmenin MİT hastaları için de önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Donida ve arkadaşları 17 MPS IV ve 10-15 kontrol bireyinin kan ve idrar örnekleri ile yapmış olduğu çalışmada, enzim replasman tedavisi uygulanan hastalarda bile pro-enflamatuar ve pro-oksidan durumların ortaya çıktığını göstermiştir. MPS IV hastalarında oksidatif stresin gösterildiği ilk çalışma olduğunu belirterek, enzim replasman tedavisi ile antioksidanların kombinasyon halinde takviyesinin, MPS IV hastalarının yaşam kalitesini iyileştirmek amacıyla geçici bir terapötik yaklaşım olabileceğini belirtmiştir [259].

Donida ve arkadaşlarının 15 MPS IV ve 39 kontrol bireyi ile yapmış olduğu ileri çalışmada, MPS IV hastalarında yüksek oksidatif stres ile uyumlu olarak lipit ve DNA hasarını göstermiş, antioksidan terapilerin MPS IV hastalarında bir tedavi yöntemi olarak uygulanabileceğini belirtmektedir [260].

Bu tez çalışmasında ise, MPS IV hastalarında sağlıklı gruba kıyasla az da olsa düşük ROS değerleri ve yüksek ATP miktarının saptanması sebebiyle oksidatif stresin yıkıcı etkileri doğrudan reddedilmemekle birlikte bunun yanında azaltıcı stres ve mitohormesis mekanizmalarında devrede olduğu düşünülmektedir. Çalışmada yapılan hücre görüntülemeleri de MPS IV grubu içerisindeki bireylerde düşük ve yüksek ROS değerlerinin bulunduğunu göstermektedir. Literatürde MPS IV hastaları için önerilen antioksidan terapilerin uygulanmasının, azaltıcı stresi bulunan hastalarda ROS miktarının daha da düşmesine neden olarak patofizyolojik açıdan daha büyük problem yaratacağını düşünmekteyiz. Bu çalışma MPS IV hastaları ile ROS, ATP ve MMP'nin çalışıldığı ilk çalışma olma özelliğindedir.

Bu çalışmada sırasıyla MİT, PA ve MPS IV hastalarında saptanan yüksek ATP değerlerine karşılık; sırasıyla MPS IV, PA ve MİT hastalarında düşük MMP miktarı saptanmıştır. Bu durum MİT, PA ve MPS IV hastalarında mitokondriyal disfonksiyonu düşündürmekle birlikte, çalışmada patofizyolojide rol aldığı önerilen mitohormesis hipotezini de doğrular niteliktedir. Mitohormesis ile arttırılan mitokondriyal biyogenez sonucu, MMP’de artış görüldüğü düşünülmektedir. Çalışmada yapılan hücre görüntüleme sonuçları; MİT, PA ve MPS IV hasta grupları içerisindeki bireyler arasında değişen MMP seviyelerini göstermiştir. Bu çalışma MİT, PA ve MPS IV hastaları ile ROS, ATP ve MMP’nin çalışıldığı ilk çalışma olma özelliğindedir.

Bu güne kadar literatürde MİT, PA ve MPS IV hastaları ile ROS, ATP ve MMP’nin birlikte incelendiği bir çalışma olmaması sebebiyle mitohormesis ve azaltıcı stres hipotezini doğrulamak için ileri çalışmalara ihtiyaç duymaktayız. Ancak tüm KMH hastalarında olduğu gibi MİT, PA ve MPS IV hastalarının da ROS, ATP ve MMP açısından eş zamanlı olarak bireysel değerlendirilmesi son derece önemlidir. Çalışmada saptanmış olan düşük ROS değerleri; uygulanan tedaviler, tedavilerin süresi ve beslenme farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Düşük ROS değerleri ile seyreden hastalık patofizyolojisinde, uygulanacak olan antioksidan terapilerin daha da yıkıcı bir tablo oluşturma potansiyeli olması sebebiyle, ileri çalışmalarla antioksidanların etkisinin incelenmesi ve tüm bu parametrelerin bir arada değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında ayrıca; antioksidan enzimler, otofaji belirteçleri ve Nrf2-Keap1 yolağı bileşenlerinin protein ve mRNA ekspresyonları RT-PZR ve western blot analizleri ile incelenmiştir. Sağlıklı grup ile 5 farklı KMH hasta grubu, incelenen her bir gen ekspresyonu açısından analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Tüm hasta gruplarının sağlıklı grup ile karşılaştırılması sonucu elde edilen istatistiksel veriler, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri kullanılarak elde edilen gen ekspresyonlarının % değişimlerinin ortalaması ve protein ekspresyonlarının western blot analiz verileri göz önünde bulundurularak her bir KMH grubundaki hastaların antioksidan cevap, Nrf2/Keap1/p62 ve otofaji yolağı incelendi.

Sağlıklı grup ile MMA grubundaki hastalar, *KEAP1* (p=0,029) gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte, *NRF2* ve *p62* genlerinin

ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında MMA grubunda görülen *NRF2* gen ekspresyonundaki % 30 artış, *KEAP1* genindeki % 17 azalma ve *p62* genindeki % 11 azalma, Nrf2/Keap1/p62 yolağının aktif olarak çalıştığına işaret etmektedir. Keap1 ve p62 proteinlerinin ekspresyonlarında görülen azalma da Nrf2/Keap1/p62 yolağının aktivasyonunu doğrular niteliktedir. p62'nin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde saptanan farklılıkların; transkripsiyonel, translasyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde regülasyon ve mRNA ve proteinlerin yarı ömürlerindeki farklılıklar sebebiyle saptandığı düşünülmektedir [261].

Sağlıklı grup ile MMA grubundaki hastalar, *HMOX1* (p=0,043) gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte, *SOD1* ve *NQO1* genlerinin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında MMA grubunda görülen *HMOX1* gen ekspresyonundaki % 55 artış, Nrf2/Keap1/p62 yolağının aktif olarak çalıştığına işaret etmektedir. Hücre ve serum deneylerinde saptandığı üzere MMA hastalarında görülen oksidatif stresin, Nrf2'nin aktivasyonuna neden olarak *HMOX1* antioksidan geninin transkripsiyonunu indüklediği görülmektedir.

Bugüne kadar Nrf2 ve Keap1 yolağı ile eş zamanlı olarak SOD1, HMOX1 ve NQO1 aracılığıyla antioksidan cevabın araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. MMA hastalarında antioksidan cevabın araştırıldığı çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Fernandes ve arkadaşlarının fare stratumu ile metil malonik asit uygulayarak oluşturdukları hayvan modelinde; ROS miktarında artış, GPx miktarında azalma saptanırken; CAT ve SOD miktarlarında değişiklik saptanmamıştır [262]. Schumann'ın MMA hastalarının tubüler/epitel hücreleri ile yapmış olduğu tez çalışmasında ise oksidatif stres ile uyumlu olarak SOD1 miktarında artış görülmüştür [263]. Luciani ve arkadaşları MMA hasta böbrek hücresi ve hayvan modelleri ile yapmış olduğu oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon, antioksidan cevap ve otofaji ilişkili yapmış olduğu çalışmada, mitokondriyal disfonksiyon ve artan oksidatif stres sonucu sağlıklıya göre yüksek SOD1 miktarı gözlemlendiğini belirtmiştir [253].

Yapılan bu çalışmamızda, SOD1 ekspresyonunda anlamlı bir yükseklik ile karşılaşılmaması, hücrelerin oksidatif strese karşı farklı antioksidan enzimlerle cevap

verdiğini düşündürmektedir. HO-1'in, MMA hastalarında PBMC'ler için temel detoksifikasyon enzimi olarak davrandığı görülmektedir.

Sağlıklı grup ile İVA grubundaki hastaların, analiz ettiğimiz tüm genler açısından karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında İVA grubunda *NRF2*'de % 21, *KEAP1*'de % 23 ve *p62*'de % 16 oranında görülen artışa rağmen; Keap1 ve p62 proteinlerinin ekspresyonlarında görülen azalma Nrf2/Keap1/p62 yolağının aktivasyonuna işaret etmektedir. Keap1 ve p62'nin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde saptanan farklılıkların; transkripsiyonel, translasyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde regülasyon ve mRNA ve proteinlerin yarı ömürlerindeki farklılıklar sebebiyle saptandığı düşünülmektedir.

Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında İVA grubunda görülen *SOD1*'deki % 9, *HMOX1*'deki % 57, *NQO1*'deki % 13'lük ekspresyon seviyesindeki artış; Nrf2/Keap1/p62 yolağının aktif olarak çalıştığını doğrular niteliktedir. Hücre deneylerinde saptandığı üzere İVA hastalarında görülen oksidatif stresin, Nrf2'nin aktivasyonuna neden olarak *SOD1*, *HMOX1* ve *NQO1* antioksidan genlerinin transkripsiyonunu indüklediği görülmektedir. Ancak serum düzeyinde MMA hastalarında saptanan yüksek TAS sonuçlarının İVA hastalarında görülmemesi ve İVA grubunda *NRF2* ekspresyonunun MMA grubuna göre daha düşük olması; MMA grubu için önerdiğimiz IF1-aracılı mitohormetik cevap hipotezini doğrular niteliktedir. İVA grubunda MMA grubundaki kadar yüksek serum antioksidan yanıt saptanmamıştır. İVA grubunda sağlıklı gruba kıyasla saptanan yüksek ROS seviyelerinin, IF1-aracılı mitohormetik cevap oluşturulmaksızın, *HMOX1* dışında diğer antioksidan genlerinin aktivasyonunu sağlayarak başa çıkmaya çalıştığı düşünülmektedir. Bu çalışma, İVA hastalarında Nrf2/Keap1 yolağı aracılığıyla antioksidan cevabın araştırıldığı ilk çalışmadır.

PA, MİT ve MPS IV gruplarında sağlıklı gruba göre daha düşük ROS miktarı saptandı ve *NRF2*, *KEAP1* ve *p62* mRNA ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Gen ekspresyonlarının % değişimlerine ait ortalama değerler incelendiğinde, sağlıklı gruba göre en düşük ROS miktarına sahip olan PA grubunda *NRF2*'de % 3 artış saptanırken, *KEAP1*'de % 3 ve *p62*'de % 14 azalma tespit edildi. PA grubu kadar farklı olmasa da sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında daha düşük ROS miktarına sahip olan MİT

grubunda *NRF2*'de % 16 artış, *KEAP1*'de % 4 azalma ve *p62*'de % 10 azalma; MPS IV grubunda *NRF2*'de % 26 azalma, *KEAP1*'de % 6 artış ve *p62*'de % 17 azalma saptandı. PA, MİT ve MPS IV gruplarında Keap1 protein ekspresyon seviyelerinde görülen şiddetli azalma Nrf2/Keap1/p62 yolağının aktivasyonuna işaret etmektedir. PA grubunda p62 protein ekspresyonundaki sağlıklı gruba göre saptanan azalma, PA grubundaki *p62* mRNA ekspresyon seviyesi ile uyumludur. Ancak MİT ve MPS IV gruplarında sağlıklı gruba kıyasla daha düşük bulunan *p62* mRNA ekspresyonu, bu grubun p62 protein ekspresyonlarındaki artış ile uyumlu değildir. Keap1 ve p62'nin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde doğrudan bir ilişkinin olmaması ve saptanan farklılıkların; transkripsiyonel, translasyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde regülasyon ve bu genlerin mRNA ve protein ürünlerinin yarı ömürlerindeki farklılıklar sebebiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Oksidatif stresin Nrf2'nin yarı ömrünü uzattığına ilişkin çalışmalar bulunmakla birlikte, azaltıcı stresin etkisi hakkında bir çalışma bulunmamaktadır. Özellikle MPS IV grubunda sağlıklı gruba karşılaştırıldığında oldukça düşük olan *NRF2* mRNA ekspresyonunun, azaltıcı stres ve genellikle düşük mRNA seviyesiyle izlenen ER stresi nedeniyle oluşma olasılığı bulunmakla birlikte bunu destekleyici ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [264-268].

Sağlıklı gruba kıyasla PA, MİT ve MPS IV gruplarında *SOD1*, *HMOX1* ve *NQO1* mRNA ekspresyonları açısından sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bunun nedenleri arasında örneklem büyüklüğü ve her bir hasta grubunda yer alan hasta bireyler arasında görülen bireysel antioksidan cevaptaki farklılıkların olabileceği düşünülmektedir.

Çalıştığımız gen ekspresyonları % değişimlerinin ortalaması açısından incelendiğinde, sağlıklı gruba kıyasla en düşük ROS miktarına sahip olan PA grubunda *SOD1*'de % 9, *HMOX1*'de % 22 ve *NQO1*'de % 5 oranında artış tespit edildi. PA grubu kadar olmasa da sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında daha düşük ROS miktarına sahip olan MİT grubunda *HMOX1*'de % 24 artış, *SOD1*'de % 2 ve *NQO1*'de % 17 azalma; MPS IV grubunda *HMOX1*'de % 34 artış, *NQO1*'de % 10 azalma ve *SOD1*'de ise değişiklik olmadığı saptandı. Elde edilen bu veriler, sağlıklı gruba kıyasla daha düşük ROS miktarlarının tespit edildiği PA, MİT ve MPS IV gruplarında azaltıcı stresin etkili olduğunu doğrular niteliktedir. PA, MİT ve MPS IV gruplarında kronik antioksidan cevap sebebiyle ROS miktarında azalmanın görüldüğü düşünülmektedir. Kronik yüksek

antioksidan cevap ve hücre deneylerinde tespit edilen yüksek ATP miktarları; PA, MİT ve MPS IV gruplarında görülen düşük ROS miktarları ile başa çıkabilmek için hücrelerin daha fazla ROS üretme eğiliminde olduğuna işaret etmekle birlikte, hastaların ilerleyen kronik hastalık sürecinde daha şiddetli azaltıcı strese maruz kalmalarına neden olabilecektir. HO-1'in, MMA ve İVA hastalarında olduğu gibi PA, MİT ve MPS IV gruplarındaki hastalarda da PBMC'ler için temel detoksifikasyon enzimi olarak davrandığı görülmektedir. Yapılan bu çalışma, PA, MİT ve MPS IV hastalarında; Nrf2 ve Keap1 yolağı ile eş zamanlı olarak *SOD1*, *HMOX1* ve *NQO1* aracılığıyla antioksidan cevabın araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğindedir.

Bu çalışmada incelenen tüm KMH gruplarındaki hastalarda temel detoksifikasyon enzimi olarak karşımıza çıkan HO-1'in, sadece antioksidan cevapta değil, aynı zamanda otofajinin indüklenmesinde ve mitokondriyal kalite kontrol döngüsünün düzenlenmesinde rol oynadığını belirten çalışmalar bulunmaktadır [269-271]. Bu bulgularımız eşliğinde KMH'larda saptadığımız sağlıklı gruba kıyasla yüksek *HMOX1* gen ekspresyonunun, otofaji yolağının indüklenmesinde de rol oynadığı için temel detoksifikasyon enzimi olarak rolü olduğunu düşünmekteyiz.

Sağlıklı bireyler ve tüm KMH hasta gruplarında, otofaji belirteçleri olan *LC3B*, *p62*, *BECN1* ve *mTOR* aracılığıyla otofaji yolağı incelenmiştir. Sağlıklı grup ile MMA grubundaki hastalar, *LC3B* (p=0,043) gen ekspresyonu farkı açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte, *BECN1* ve *mTOR* genlerinin ekspresyonlarında istatistiksel anlamlılık saptanmadı. PA ve İVA gruplarında sağlıklı gruba kıyasla; *LC3B*, *BECN1* ve *mTOR* mRNA ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamaktadır. Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında MMA grubunda görülen *LC3B-II*'deki % 62, PA grubunda görülen *LC3B-II*'deki % 74, İVA grubunda görülen *LC3B-II*'deki % 68 artış; MMA, PA ve İVA gruplarında *LC3B-II* protein ekspresyonlarında da saptanmıştır. MMA, PA ve İVA gruplarında sağlıklı gruba kıyasla *LC3B*'de saptanan mRNA ve protein ekspresyonundaki bu artış, otofaji aktivasyonu ya da otofajik akışın baskılanmasıyla *LC3B*'nin otolizozomal degradasyonunu azaltması sonucu görülüyor olabilir. Otofajik akışın saptanması için *LC3B* ve *p62*'nin eş zamanlı değerlendirilmesi gereklidir [272]. MMA, PA ve İVA gruplarında sağlıklı gruba kıyasla artan *LC3B-II*'ye karşılık azalan *p62* protein ekspresyonlarının saptanması, *LC3B*'nin otolizozomal degradasyonunun azalmadığını göstermiştir. *LC3B-II*'deki artış ise, otofaji aktivasyonu

sebebiyle artan otofagozomların bir göstergesidir. p62 protein ekspresyonundaki azalmaya ek olarak, Keap1 protein ekspresyonundaki azalma Nrf2/Keap1/p62 yoluyla aracılığı ile otofaji yolunun aktivasyonunu ifade etmektedir.

mTOR ve Beclin1, otofaji indüksiyonunda belirteç olarak kullanılmaktadır [272]. Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında MMA grubunda *mTOR*'da % 4, *BECN1*'de % 7 azalma; PA grubunda *mTOR*'da % 5 artış, *BECN1*'de % 15 azalma; İVA grubunda *mTOR*'da % 15, *BECN1*'de % 11 artış saptanmıştır. Nrf2 ile benzer şekilde, mTOR'da yolun uyarımının yapıldığı proteindir. PBMC'lerde mTOR protein ekspresyonunun sınırlı olması ve yapılan çalışmanın PBMC'lerde bir uyarma basamağı yapmadan bazal seviyedeki otofaji yolunun incelenmesi sebebiyle gerek sağlıklı gerekse KMH gruplarında mTOR protein ekspresyonu saptanmamıştır. Otofaji yolunun aktivasyonunun LC3B ve p62 protein ekspresyonu aracılığıyla saptanması sebebiyle, mTOR ekspresyonunda görülen artışların protein düzeyinde regüle edilerek mTOR inaktivasyonunun sağlandığını düşündürmektedir. Bu durumun transkripsiyonel, translasyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde regülasyon ve mRNA ve proteinlerin yarı ömürlerindeki farklılıklar sebebiyle mi, yoksa mTOR bağımsız yolak ile otofaji aktivasyonunun sağlandığının tespit edilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında MMA, PA ve İVA gruplarında Beclin1 protein ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Normalde artışı saptanan LC3B-II sebebiyle indüklenen otofagozom oluşumuna karşılık, Beclin1 protein ekspresyonunda artış olması beklenir. Sağlıklı gruba kıyasla p62 ve Keap1'de tespit edilen azalma, lizozomal degradasyonun gerçekleştiğini göstermekle birlikte, LC3B-II'deki artışın Beclin1 protein ekspresyonu ile uyumsuzluğu lizozomal degradasyonun yetersizliğine işaret etmektedir. Beclin 1 protein ekspresyonunda tam inhibisyon görülmemektedir. Saptanan kısmi inhibisyonunun hücrenin ölüm yollarına yönlendirilmemek için geliştirdiği bir adaptasyon olduğu düşünülmektedir. Kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarında, kısmi azalan Beclin1 inhibisyonunun mitokondriyal biyogenez ve otofajik akışın düzenlenmesinde rol aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [273-275]. Bu çalışmada da literatürdeki çalışmalara benzer olarak kısmi azalan Beclin1 protein ekspresyonunun saptanmasının, hücrenin ölüm yollarından kaçmak için geliştirdiği adaptasyon olduğu düşünülmekle birlikte, ileri çalışmalarla bu durumun kanıtlanması hedeflenmektedir.

Schumann'ın MMA hastalarının tübüler/epitel hücreleri ve fare modeli ile yapmış olduğu tez çalışmasında oksidatif stres ile uyumlu olarak artan antioksidan yanıt ve mitokondriyal hasarı gözlemlemesi yanında, LC3B-II ve p62 birikimi ile uyumlu otofaji düzensizliğinin olduğunu da belirtmiştir. Bu sonuçlardan başka yapılan TEM incelemesinde aşırı otofajik vakuol oluşumu gözlemlediklerini ifade ederek, artan otofaji durumunun renal tübüler hasar modelinde koruyucu olduğunu gösterdiklerini ifade etmektedir [263].

Ruppert ve arkadaşlarının MMA hastalarının tübüler epitelyal hücreleri ile yapmış olduğu çalışmada, artan ROS oluşumu ile birlikte enerji metabolizması glikoliz, mitokondriyal solunum zinciri ve Krebs döngüsünde bozulma gösterildi. MMA hastalarında yüksek LC3B-II, p62 ve pIRE1 seviyeleri ile desteklenen artmış otofagozom üretimi ve endoplazmik retikulum stresinin olduğu bulunmuştur[276].

Luciani ve arkadaşları MMA hastalarının böbrek hücreleri ve hayvan modelleri ile yapmış olduğu oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon, antioksidan cevap ve otofaji ilişkisini araştıran çalışmada, mitokondriyal disfonksiyon ve artan oksidatif stres sonucunda sağlıklılara göre yüksek antioksidan cevabın geliştiğini bildirmiştir. Ayrıca LC3B işaretli otofaji vezikülleri ve p62 agregatlarının önemli ölçüde biriktiğini göstererek, artan otofajiyi göstermiştir [253].

MMA hastalarının böbrek hücreleri ve model organizmalar ile yapılan çalışmalar, LC3B-II ve p62 birikimi ile otolizozomal degradasyonda problem olduğuna işaret etmektedir. Bu tez çalışmamızda, MMA hastalarında p62 proteininde birikime rastlanmamasının sebebinin çalışmada kullanılan hücrelerin farklı olması, hastalık şiddeti ve tedavi farklılıkları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Literatürdeki çalışmalarda da bozulan otofaji yolağına rağmen, artan otofaji varlığından söz edilmektedir. Bu durum önermiş olduğumuz kısmi olarak azalan Beclin1 inhibisyonu hipotezimizi doğrular niteliktedir. İlâveten çalışmalarda oksidatif stresin gözlemlendiği MMA hastalarında tespit edilen ER stresi, bu çalışmada azaltıcı stres ve düşük mRNA seviyelerinin görüldüğü hastalarda ER stresinin araştırılmasının gerektiği yönündeki hipotezimizi de doğrulamaktadır. Bu çalışma MMA, PA ve İVA hastalarında PBMC'ler ile otofaji yolağının araştırıldığı ilk çalışmadır. Özellikle PA ve İVA hastaları için otofaji yolağı hakkında ilk veriler bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Sağlıklı grup ile MİT (p=0,007) ve MPS IV (p=0,048) gruplarındaki hastalar, *LC3B* gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla birlikte, *BECN1* ve *mTOR* genlerinin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında MİT grubunda görülen *LC3B-II*'deki % 56, MPS IV grubunda görülen *LC3B-II*'deki % 82 artış; MİT ve MPS IV gruplarında LC3B-II protein ekspresyonlarında da saptanmıştır. MİT ve MPS IV gruplarında sağlıklı gruba kıyasla LC3B'de saptanan mRNA ve protein ekspresyonundaki bu artış, artan p62 protein ekspresyon değerleri ile birlikte incelendiğinde Nrf2/Keap1/p62 yolağı aracılığı ile otofajik akışın bozulduğuna işaret etmektedir. Ancak MİT ve MPS IV gruplarında saptanan düşük Keap1 protein ekspresyonu otolizozomal degradasyonunun azalmasından ziyade oluşan yüksek miktardaki otofagozomun degradasyonundaki yetersizliği düşündürmektedir.

Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında MİT grubunda *mTOR*'da % 15 artış, *BECN1*'de % 12 azalma; MPS IV grubunda *BECN1*'de % 6 azalma, *mTOR*'da değişiklik görülmediği saptanmıştır. MMA, PA ve İVA gruplarındakine benzer şekilde sağlıklı, MİT ve MPS IV gruplarında da mTOR protein ekspresyonu görüntülenememiştir. LC3B ve p62 protein ekspresyonlarında tespit edilen otolizozomal degradasyondaki yetersizliğe rağmen, otofaji yolağının aktive edildiği aşikardır. MMA, PA ve İVA gruplarındakine benzer şekilde, mTOR ekspresyonunda saptanamayan otofaji yolağının indüklenmesi için gerekli olan anlamlı düşüklüğün, protein düzeyinde regüle edilerek mTOR inaktivasyonunun sağlandığını düşündürmektedir. MİT ve MPS IV grupları için de MMA, PA ve İVA gruplarında olduğu gibi transkripsiyonel, translasyonel ve post-transkripsiyonel seviyelerde regülasyonun, mRNA ve proteinlerin yarı ömürlerindeki farklılıkların ve mTOR bağımsız yolak ile otofaji aktivasyonunun araştırılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında MMA, PA ve İVA gruplarında tespit edilen Beclin1 protein ekspresyonunda azalma MİT ve MPS IV grupları için de saptanmıştır. Artan LC3B-II ve p62 protein ekspresyonlarıyla tespit edilen otolizozomal degradasyondaki yetersizliğin, kısmi Beclin1 protein ekspresyonu ile otofaji yolağının regülasyonunu sağlayarak hücrenin ölüm yollarına yönlendirilmesinin önüne geçilmeye çalışıldığı hipotezini güçlendirmektedir. Ancak MMA, PA ve İVA gruplarında olduğu gibi MİT ve

MPS IV gruplarında da kısmi Beclin1 protein ekspresyon hipotezimizin doğrulanması gerekmektedir.

Alméciga-Diaz ve arkadaşları, 4 MPS IV ve 3 kontrol fibroblastı ile yapmış olduğu çalışmada, MPS IV hastalarında bozulan otofaji ve şaperonların etkisini araştırdı. Bu çalışmanın MPS IV hastalarında otofaji belirteçlerinin bakıldığı ve otofaji bozukluğunun tespit edildiği ilk çalışma olduğunu belirterek, MPS IV hastalarında LC3B-II ve p62 protein ekspresyonlarında artışın tespit edildiğini ve şaperon tedavisinin enzim replasman tedavi ile birlikte etkili olduğunu önermişlerdir [277].

Bu çalışma ile uyumlu olarak LC3B-II ve p62 protein ekspresyonlarında artış görülmekle birlikte, yapılan bu tez çalışmasında kısmi azalan Beclin1 ekspresyonu ve azalan Keap1 ekspresyonu hakkında bilgi sahibi olunması sağlanmıştır. Bu sebeple mevcut çalışmadan farklı olarak, MPS IV hastalarında arttırılan otofaji yolağı ile karşılaşıldığını düşünmekteyiz. Dolayısıyla bu çalışma gerek Nrf2/Keap1/p62 yolağı aracılığıyla otofaji yolağının araştırılması, gerekse yapılan hücre deneyleriyle MPS IV hastalarında ROS, ATP ve MMP hakkında bilgi sahibi olunmasıyla hücresel stres, antioksidan cevap ve otofaji yolağının MPS IV hastalarında araştırıldığı ilk çalışmadır. MİT hastalarında da bugüne kadar bu çalışma kapsamı ve çok sayıda faktörün bir arada bütüncül olarak değerlendirildiği yayınlanmış bir araştırma bulunmamaktadır.

MMA, PA ve İVA hasta gruplarında aktivasyonu, MİT ve MPS IV hasta gruplarında aktivasyonla birlikte yetersizliğinin tespit edildiği Nrf2/Keap1/p62 yolağı aracılığıyla otofajinin, her bir grup içerisindeki bireylerde farklılık gösterdiği de mRNA ve protein ekspresyon analizleriyle gösterilmiştir. Saptanan bu gruplar içindeki bireyler arasında gözlenen farklılıkların; hastalara uygulanan tedaviler ve tedavi süreleri, beslenme farklılıkları ve hastalık şiddeti sebebiyle görüldüğü düşünülmektedir. Dolayısıyla serum ve hücre deneylerinde olduğu gibi otofaji yolağının araştırılmasının KMH hastalarında bireysel olarak gerçekleştirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Metabolik hastalıklarda farklı hücre doku ve organlarda farklı hasarlar ve mekanizmalar ile kronik bir patofizyolojik süreç söz konusudur. Dolayısıyla bu hasta gruplarında farklı doku ve organlar etkileneceği için PBMC hücreleri yanında farklı hücre ve organlara ait biyolojik örneklerin bu açıdan analiz edilmesi önerilmektedir.

KMH' larda klinik açıdan;

- Yenidoğan döneminde ve erken bebeklik döneminde akut belirtiler,
- Koma, ataksi, kusma, asidoz, egzersiz intoleransı, kardiyak, böbrek, karaciğer veya diğer organ yetmezliği gibi geç başlangıçlı akut ve tekrarlayan ataklar,
- Gelişimsel gecikme, zeka geriliği, epilepsi, nörolojik bozulma ve psikiyatrik belirtiler gibi kronik ve ilerleyici nörolojik semptomlar,
- Kardiyoloji, nöroloji, dermatoloji, endokrinoloji, gastroenteroloji, hematoloji gibi tüm tıbbi uzmanlıkları ilgilendirebilecek spesifik ve kalıcı organ/sistem semptomları olmak üzere dört farklı durumla karşılaşılabılır.

KMH'larda görülen her atak, yoğun bakım ünitesindeki destekleyici önlemlere rağmen kendiliğinden düzelme veya açıklanamayan ölümle biten hızlı bir seyir izleyebilir. Ataklar arasında hasta normal görünebilir. Akut hastalığın başlangıcı, bir arada görülen başka bir hastalık tarafından tetiklenebilir veya açık bir neden olmadan ortaya çıkabilir. Aşırı protein alımı, uzun süreli açlık, uzun süreli egzersiz ve protein katabolizmasını arttıran tüm koşullar bu atakları şiddetlendirebilir [5, 278-280].

KMH'lar ile yapılan fonksiyonel çalışmalarda, hastaların akut ve kronik metabolik atak dönemleri ya da aktif atak dönemi öncesi/sonrası olup olmadığı, hastanın beslenmesi ve fiziksel aktiviteleri, anabolik/katabolik döneme dair bilgilerin ulaşılabilir olması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada aynı KMH grubundaki bireylerde görülen farklılıkların temelinde hastalığın klinik seyrindeki farklılıkların yattığı düşünülmektedir. Dolayısıyla hasta anemnezlerinin ayrıntılı bir şekilde alınması, klinik muayene ve laboratuvar bulgularının hasta izlem sürecinde detaylı olarak kayıt altına alınması ile yapılan fonksiyonel analizlerin daha sağlıklı ve etkili bir şekilde yorumlanması sağlanabilecektir.

İlerleyen yaşlarda endojen antioksidan sistemlerinin verimliliğindeki düşüş nedeniyle oksidatif strese duyarlı hale gelmektedir. İleri yaşın oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon ile doğru orantılı bir şekilde arttığı çalışmalarda gözlenmektedir [281, 282]. Dolayısıyla KMH'larda yapılan fonksiyonel çalışmalarda yaş faktörünün etkilerinin göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Oksidatif strese maruziyette artışın, antioksidan sistemlerin verimliliğindeki azalmanın ve mitokondriyal disfonksiyondaki artışın, ileri

yaşlarda KMH'larda daha şiddetli klinik tabloların izlenmesindeki temel sebeplerden biri olduğunu düşünmekteyiz.

5. YORUM

- KMH gruplarının antioksidan ve oksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için serum örneklerinin tek başına kullanılmasının hastalıkların gerçek klinik tablosunu yansıtmada yeterli olmayacağı sonucuna varılmıştır. Farklı kalıtsal metabolik hastalıkların patofizyolojisi, dokuya özgü olarak farklılık göstermektedir. Bu sebeple sistemik etkinin, etkilenen doku ve organlardaki etkileri incelemeden bu hastaların kliniğini değerlendirmek için yetersiz kaldığını düşünmekteyiz.
- Hücre içi ROS, ATP ve MMP verilerinin “eş zamanlı” analizlerinin yapılması, hücrenin stres durumunu değerlendirmede çalışmanın bakış açısını genişletmeye ve farklı parametrelerin bir arada değerlendirilmesine önemli katkısı vardır.
- MMA ve İVA hasta gruplarında saptanan yüksek ROS miktarlarına karşılık, PA hastalık grubunda görülen düşük ROS miktarları, organik asidemi grubunda yer alan bu üç hastalığı bile değerlendirirken farklı hücresel stres durumları ile karşılaşılabileceğini göstermektedir.
- PA, MİT ve MPS IV hasta gruplarında saptanan düşük ROS miktarları, hastaların tedavi planlamaları öncesinde hücresel stres durumunu tespit etmenin önemini göstermektedir. ROS seviyesi belirlenmeden hastalarda tedavi amaçlı olarak antioksidan ya da buna yönelik koruyucu tedavilerin uygulanmasının, hücredeki hassas oksidan-antioksidan dengeyi bozarak klinik tabloyu daha çok bozma potansiyelini doğurabilir.
- KMH hastalarına uygulanan tedavilerin, tedavi sürelerinin hücresel strese olan etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada da PA, MİT ve MPS IV gruplarında tespit edilen düşük ROS seviyelerinin, hastalık ya da tedavi ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir. Dolayısıyla KMH'larda geçici iyilik dönemi sonrası ilerleyen dönemde daha yıkıcı bir klinik tabloya neden olmamak için tedavi öncesi,

tedavi sırası ve sonrasında hücrel stres ve mitokondriyal biyogenezin kontrol edilmesi gerektiği düşünölmektedir.

- Hasta anemnezlerinin ayrıntılı bir şekilde alınması, klinik muayene ve laboratuvar bulgularının hasta izlem sürecinde detaylı olarak kayıt altına alınması büyük önem taşımaktadır. Hastaların akut ve kronik metabolik atak dönemleri ya da aktif atak dönemi öncesi/sonrası olup olmadığına dair bilgilerin ulaşılabilir olması, yapılan laboratuvar ve fonksiyonel çalışmaların daha sağlıklı ve etkili bir şekilde yorumlanmasına büyük katkı sağlayacaktır.
- Hastaların anabolik ya da katabolik dönemde olduğunun belirlenmesi, KMH'larda yapılan fonksiyonel çalışmaların yorumlanmasında etkili olabilir.
- MMP miktarlarındaki çok düşük değışimlerin bile hücrenin ROS ve ATP miktarlarında önemli değışikliklere neden olması KMH'larda mitokondriyal fonksiyonun değerlendirilmesinde göz ardı edilmemesi gereken bir parametre olduğunun göstergesidir.
- MMA hastalarında saptanan oksidatif stresin yanında, mitokondriyal fonksiyon değışimlerini saptamak için bu çalışmada önerilen IF1-aracılı mitohormetik cevabın ileri çalışmalarla doğrulanması planlanmaktadır.
- İVA hasta grubunda saptanan yüksek ROS miktarı, MMA grubunda olduğu gibi oksidatif stres ile uyumludur. Ancak MMA grubunda saptadığımız hücrel stres ve antioksidan cevap göz önüne alındığında İVA grubunda hastalığın hücrel etkilerinin daha düşük olduğu düşünölmektedir.
- Bugüne kadar KMH'larda azaltıcı stres ve mitohormesis ile ilgili bir çalışma bulunmaması sebebiyle, çalışmanın sonuçları doğrultusunda önerilen bu hipotezin KMH grubunda doğrulanması için farklı hastalarda ileri çalışmalar planlanmalıdır.
- Mitokondriyal biyogenez ve mitofajinin KMH'larda değerlendirilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

- Nrf2 ve mTOR ifadelerinin saptanması için hücresel bir stres indükleyici ile ileri hücre deneylerinin yapılması gerekmektedir. Bu deney planı ile çalışmada saptanan hücresel stresin daha çarpıcı ve büyük farklarla gözlemlenebileceği düşünülmektedir.
- KMH'larda mTOR ve mTOR-bağımsız yolak ile otofaji aktivasyonu konusu ileri çalışmalarla araştırılmalıdır.
- Bu çalışmada sonuçları doğrultusunda önerilen kısmi azalmış Beclin1 hipotezinin doğrulanması için ileri çalışmalar planlanmalıdır.
- Antioksidan yanıt ve otofaji belirteçlerinde mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde gözlenen farklılıkların; transkripsiyonel, translasyonel, post-transkripsiyonel regülasyon ve mRNA/protein yarı ömürleri ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir.
- KMH'larda oksidatif stres ve azaltıcı stresin patofizyolojik etkilerinin araştırılmasında ER stresinin göz ardı edilmemesi gereken önemli bir hücresel mekanizma olduğu düşünülmektedir.
- Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen serum, hücre, RNA ve protein deneylerinde elde edilen sonuçlarda tespit edildiği üzere, KMH'larda grup davranışı tam olarak gözlemlenmemektedir. Bu nedenle KMH'larda bireysel tanı ve tedaviler büyük bir önem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

[1] A.W. El-Hattab, Inborn errors of metabolism, Clinics in Perinatology, 42 (2015) 413-439.

[2] A. Tebani, L. Abily-Donval, C. Afonso, S. Marret, S. Bekri, Clinical metabolomics: the new metabolic window for inborn errors of metabolism investigations in the post-genomic era, International Journal of Molecular Sciences, 17 (2016) 1167.

- [3] K. Wertheim-Tysarowska, M. Gos, J. Sykut-Cegielska, J. Bal, Genetic analysis in inherited metabolic disorders from diagnosis to treatment. own experience, current state of knowledge and perspectives, *Developmental Period Medicine*, 19 (2015) 413-431.
- [4] F. Ezgu, Chapter Seven-Inborn errors of metabolism. *Advances In Clinical Chemistry*, G.S. Makowski (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 195-250, 2016.
- [5] J.M. Saudubray, M.R. Baumgartner, J.H. Walter, *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg, 2016.
- [6] M. Yurdakök, T. Çoşkun, *Yenidoğanda Kalıtsal Metabolik Hastalıklar*, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2014.
- [7] R.K.J. Olsen, N. Cornelius, N. Gregersen, Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38 (2015) 703-719.
- [8] E. Richard, L. Gallego-Villar, A. Rivera-Barahona, A. Oyarzábal, B. Pérez, P. Rodríguez-Pombo, L.R. Desviat, Altered redox homeostasis in branched-chain amino acid disorders, organic acidurias, and homocystinuria, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2018 (2018) 17.
- [9] P.J. Mc Guire, A. Parikh, G.A. Diaz, Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism, *Molecular Genetics Metabolism*, 98 (2009) 173-180.
- [10] K.M. Stepien, R. Heaton, S. Rankin, A. Murphy, J. Bentley, D. Sexton, I.P. Hargreaves, Evidence of oxidative stress and secondary mitochondrial dysfunction in metabolic and non-metabolic disorders, *Journal of Clinical Medicine*, 6 (2017) 71.
- [11] V.I. Lushchak, Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions, *Journal of Amino Acids*, 2012 (2012) 26.
- [12] E. Peris, P. Micallef, A. Paul, V. Palsdottir, A. Enejder, M. Bauzá-Thorbrügge, C.S. Olofsson, I.W. Asterholm, Antioxidant treatment induces reductive stress associated with mitochondrial dysfunction in adipocytes, *Journal of Biological Chemistry*, 294 (2019) 2340-2352.
- [13] W. Xiao, J. Loscalzo, Metabolic responses to reductive stress, *Antioxidants Redox Signaling*, (2019) 1-52.
- [14] I. Pérez-Torres, V. Guarner-Lans, M.E. Rubio-Ruiz, Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2017) 2098.
- [15] M. Dodson, M. Redmann, N.S. Rajasekaran, V. Darley-USmar, J. Zhang, Keap1–Nrf2 signalling and autophagy in protection against oxidative and reductive proteotoxicity, *Biochemical Journal*, 469 (2015) 347-355.
- [16] F. Singh, A.L. Charles, A.I. Schlagowski, J. Bouitbir, A. Bonifacio, F. Piquard, S. Krähenbühl, B. Geny, J. Zoll, Reductive stress impairs myoblasts mitochondrial function and triggers mitochondrial hormesis, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1853 (2015) 1574-1585.

- [17] M.L. Pall, S. Levine, Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors, *Acta Physiologica Sinica*, 67 (2015) 1-18.
- [18] M. Dodson, M.R. De La Vega, A.B. Cholanians, C.J. Schmidlin, E. Chapman, D.D. Zhang, Modulating NRF2 in disease: timing is everything, *Annual Review of Pharmacology Toxicology*, 59 (2019) 555-575.
- [19] K.M. Holmström, R.V. Kostov, A.T. Dinkova-Kostova, The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function, *Current Opinion in Toxicology*, 1 (2016) 80-91.
- [20] C. Tonelli, I.I.C. Chio, D.A. Tuveson, Transcriptional regulation by Nrf2, *Antioxidants Redox Signaling*, 29 (2018) 1727-1745.
- [21] P. Sánchez-Martín, M. Komatsu, p62/SQSTM1—steering the cell through health and disease, *Journal of Cell Science*, 131 (2018) jcs222836.
- [22] L. Knuppertz, H.D. Osiewacz, Orchestrating the network of molecular pathways affecting aging: role of nonselective autophagy and mitophagy, *Mechanisms of Ageing Development*, 153 (2016) 30-40.
- [23] M. Moloudizargari, M.H. Asghari, E. Ghobadi, M. Fallah, S. Rasouli, M. Abdollahi, Autophagy, its mechanisms and regulation: implications in neurodegenerative diseases, *Ageing Research Reviews*, 40 (2017) 64-74.
- [24] S. Kongara, V. Karantza, The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis, *Frontiers in Oncology*, 2 (2012) 13.
- [25] D.J. Wible, S.B. Bratton, Reciprocity in ROS and autophagic signaling, *Current Opinion in Toxicology*, 7 (2018) 28-36.
- [26] L. Li, J. Tan, Y. Miao, P. Lei, Q. Zhang, ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms, *Cellular Molecular Neurobiology*, 35 (2015) 615-621.
- [27] R. Scherz-Shouval, Z. Elazar, Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology, *Trends in Biochemical Sciences*, 36 (2011) 30-38.
- [28] L. Matalonga, L. Gort, A. Ribes, Small molecules as therapeutic agents for inborn errors of metabolism, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 40 (2017) 177-193.
- [29] J. Teinert, R. Behne, M. Wimmer, D. Ebrahimi- Fakhari, Novel insights into the clinical and molecular spectrum of congenital disorders of autophagy, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43 (2019) 51–62.
- [30] C.M. Mak, H.C.H. Lee, A.Y.W. Chan, C.W. Lam, Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 50 (2013) 142-162.
- [31] V.M. Ginocchio, N. Brunetti-Pierri, Progress toward improved therapies for inborn errors of metabolism, *Human Molecular Genetics*, 25 (2015) R27-R35.
- [32] W.W. Yue, S. Mackinnon, G.A. Bezerra, Substrate reduction therapy for inborn errors of metabolism, *Emerging Topics in Life Sciences*, 3 (2019) 63-73.

- [33] J.M. Saudubray, À. Garcia Cazorla, Inborn errors of metabolism overview: pathophysiology, manifestations, evaluation, and management, *Pediatric Clinics*, 65 (2018) 179-208.
- [34] J.M. Kwon, Testing for inborn errors of metabolism, *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 24 (2018) 37-56.
- [35] N. Fatima, S. Tripathi, R. Alam, M.H. Siddiqui, A.A. Mahdi, G.K. Sonkar, Diagnostic advancement in evaluating inborn errors of metabolism: past, present and future: a systematic review, *International Journal of Human Health Sciences*, 3 (2019) 58-63.
- [36] K.A. Chapman, G. Gramer, S. Viall, M.L. Summar, Incidence of maple syrup urine disease, propionic acidemia, and methylmalonic aciduria from newborn screening data, *Molecular Genetics Metabolism Reports*, 15 (2018) 106-109.
- [37] M. Messina, C. Meli, F. Raudino, A. Pittalá, A. Arena, R. Barone, F. Giuffrida, R. Iacobacci, V. Muccilli, G. Sorge, Expanded newborn screening using tandem mass spectrometry: seven years of experience in eastern sicily, *International Journal of Neonatal Screening*, 4 (2018) 12.
- [38] J.G. Villoria, S. Pajares, R.M. López, J.L. Marin, A. Ribes, Neonatal screening for inherited metabolic diseases in 2016, *Seminars in Pediatric Neurology*, 23 (2016) 257-272.
- [39] N. Shibata, Y. Hasegawa, K. Yamada, H. Kobayashi, J. Purevsuren, Y. Yang, V.C. Dung, N.N. Khanh, I.C. Verma, S. Bijarnia-Mahay, Diversity in the incidence and spectrum of organic acidemias, fatty acid oxidation disorders, and amino acid disorders in Asian countries: selective screening vs. expanded newborn screening, *Molecular Genetics Metabolism Reports*, 16 (2018) 5-10.
- [40] S. Tomatsu, T. Fujii, M. Fukushi, T. Oguma, T. Shimada, M. Maeda, K. Kida, Y. Shibata, H. Futatsumori, A.M. Montano, Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses, *Molecular Genetics Metabolism*, 110 (2013) 42-53.
- [41] L. Erdim, S. İnal, Yenidoğan tarama testlerinde örnek alınması ve gönderilmesinde hemşirelerin sorumlulukları/taking samples and sending in newborn screening tests and responsibilities of nurses, *Sağlık Bilimleri ve Meslekleri Dergisi*, 5 (2018) 102-106.
- [42] M.A. Cleary, R. Skeath, Phenylketonuria, *Paediatrics Child Health*, 29 (2019) 111-115.
- [43] A. Durukan, B. Donat, The importance, contribution and problems of parents with phenylketonuria (pku)-an association in istanbul, *Uluslararası Kültürel ve Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 3 (2017) 65-76.
- [44] A. El-Metwally, L. Yousef Al-Ahaidib, A. Ayman Sunqurah, K. Al-Surimi, M. Househ, A. Alshehri, O.B. Da'ar, H. Abdul Razzak, A.N. AlOdaib, The prevalence of phenylketonuria in Arab countries, Turkey, and Iran: a systematic review, *BioMed Research International*, 2018 (2018).

- [45] N. Al Hafid, J. Christodoulou, Phenylketonuria: a review of current and future treatments, *Translational Pediatrics*, 4 (2015) 304.
- [46] L. Mei, P. Song, N. Kokudo, L. Xu, W. Tang, Current situation and prospects of newborn screening and treatment for phenylketonuria in China—compared with the current situation in the United States, UK and Japan, *Intractable Rare Diseases Research*, 2 (2013) 106-114.
- [47] M. Kamboj, Clinical approach to the diagnoses of inborn errors of metabolism, *Pediatric Clinics of North America*, 55 (2008) 1113-1127.
- [48] J.T. Clarke, *A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases*, 3. edition, Cambridge University Press, United Kingdom, 2006.
- [49] W.J. Marshall, M. Lapsley, A. Day, R. Ayling, *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects: With Expert Consult Access*, 3 edition, Churchill Livingstone, London, 2014.
- [50] B.G. Ng, P. Sosicka, S. Agadi, M. Almannai, C.A. Bacino, R. Barone, L.D. Botto, J.E. Burton, C. Carlston, B.H.Y. Chung, SLC35A2- CDG: functional characterization, expanded molecular, clinical, and biochemical phenotypes of 30 unreported individuals, *Human Mutation*, (2019) 1–18.
- [51] I.V. Schwartz, C.F. Souza, R. Giugliani, Treatment of inborn errors of metabolism, *Jornal de Pediatria*, 84 (2008) 8-19.
- [52] M. Alfadhel, A. Babiker, Inborn errors of metabolism associated with hyperglycaemic ketoacidosis and diabetes mellitus: narrative review, *Sudanese Journal of Paediatrics*, 18 (2018) 10.
- [53] M.P. Pruchniak, M. Arażna, U. Demkow, *Biochemistry of oxidative stress. Advances in Clinical Science*, M. Pokorski (Eds.), Springer, Cham, Switzerland, 2015.
- [54] V.I. Lushchak, H.M. Semchyshyn, *Oxidative Stress: Molecular Mechanisms and Biological Effects*, IntechOpen, London, 376, 2012.
- [55] V.I. Lushchak, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and its classification, *Chemico-Biological Interactions*, 224 (2014) 164–175.
- [56] L.A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4 (2008) 89.
- [57] A. Phaniendra, D.B. Jestadi, L. Periyasamy, Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30 (2015) 11-26.
- [58] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fifth edition, Oxford University Press, United Kingdom, 2015.
- [59] A.H. Bhat, K.B. Dar, S. Anees, M.A. Zargar, A. Masood, M.A. Sofi, S.A. Ganie, Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight, *Biomedicine Pharmacotherapy*, 74 (2015) 101-110.

- [60] K.F. Cooper, Till death do us part: the marriage of autophagy and apoptosis, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2018 **(2018)** 13.
- [61] R. Li, Z. Jia, M.A. Trush, Defining ROS in biology and medicine, *Reactive Oxygen Species*, 1 **(2016)** 9.
- [62] S. Di Meo, T.T. Reed, P. Venditti, V.M. Victor, Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2016 **(2016)** 44.
- [63] L. Zuo, T. Zhou, B.K. Pannell, A.C. Ziegler, T.M. Best, Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly, *Acta Physiologica*, 214 **(2015)** 329-348.
- [64] B.W.L. Lee, P. Ghode, D.S.T. Ong, Redox Regulation of cell state and fate, *Redox Biology*, **(2018)**.
- [65] Z.Z. Xie, Y. Liu, J.S. Bian, Hydrogen sulfide and cellular redox homeostasis, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2016 **(2016)** 12.
- [66] G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, Oxidative stress: harms and benefits for human health, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2017 **(2017)** 13.
- [67] N. Ghosh, A. Das, S. Chaffee, S. Roy, C.K. Sen, Reactive oxygen species, oxidative damage and cell death. *Immunity and Inflammation in Health and Disease*, S. Chatterjee, W. Jungraithmayr, D. Bagch (Eds.), Academic Press, ABD, **2017**.
- [68] E. Panieri, M.M. Santoro, ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells, *Cell Death Disease*, 7 **(2016)** e2253.
- [69] S. Tripathy, P.K. Mohanty, Reactive oxygen species (ROS) are boon or bane, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research*, 8 **(2017)** 1-16.
- [70] H. Kong, N.S. Chandel, Regulation of redox balance in cancer and T cells, *Journal of Biological Chemistry*, 293 **(2018)** 7499-7507.
- [71] I. Mirończuk-Chodakowska, A.M. Witkowska, M.E. Zujko, Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body, *Advances in Medical Sciences*, 63 **(2018)** 68-78.
- [72] S.B. Nimse, D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *Rsc Advances*, 5 **(2015)** 27986-28006.
- [73] A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review, *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 97 **(2015)** 55-74.
- [74] S. Pooja, Antioxidants and its role in periodontitis—a short review, *Journal of Pharmaceutical Sciences Research*, 8 **(2016)** 759-763.
- [75] S.J.S. Flora, Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2 **(2009)** 191-206.

- [76] A.M. Maskoen, N.I. Sumantri, L. Reniarti, Enzymatic antioxidants activity in beta thalassemia major, *International Journal of ChemTech Research*, 10 (2017) 129-134.
- [77] L.A. Da Costa, B. García Bailo, A. Badawi, A. El-Sohemy, Genetic determinants of dietary antioxidant status. *Progress in Molecular Biology And Translational Science*, D. Teplow (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 179-200, 2012.
- [78] J. Yin, W.K. Ren, X.S. Wu, G. Yang, J. Wang, T.J. Li, J.N. Ding, L.C. Cai, D.D. Su, Oxidative stress-mediated signaling pathways: a review, *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11 (2013) 132-139.
- [79] C.L. Bigarella, R. Liang, S. Ghaffari, Stem cells and the impact of ROS signaling, *Development*, 141 (2014) 4206-4218.
- [80] J. Roy, J.M. Galano, T. Durand, J.Y. Le Guennec, J.C.Y. Lee, Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses, *The FASEB Journal*, 31 (2017) 3729-3745.
- [81] H. Yaribeygi, S.L. Atkin, A. Sahebkar, A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia- induced free radical generation leading to oxidative stress, *Journal of Cellular Physiology*, 234 (2019) 1300-1312.
- [82] A.A. Alfadda, R.M. Sallam, Reactive oxygen species in health and disease, *BioMed Research International*, 2012 (2012) 14.
- [83] D. Pesta, M. Roden, The Janus head of oxidative stress in metabolic diseases and during physical exercise, *Current Diabetes Reports*, 17 (2017) 41.
- [84] J. Finaud, G. Lac, E. Filaire, Oxidative stress, *Sports Medicine*, 36 (2006) 327-358.
- [85] J. Lee, S. Giordano, J. Zhang, Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling, *Biochemical Journal*, 441 (2012) 523-540.
- [86] A.H. Bhat, K.B. Dar, S. Anees, M.A. Zargar, A. Masood, M.A. Sofi, S.A. Ganie, Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight, *Biomedicine Pharmacotherapy*, 74 (2015) 101-110.
- [87] S. Demine, N. Reddy, P. Renard, M. Raes, T. Arnould, Unraveling biochemical pathways affected by mitochondrial dysfunctions using metabolomic approaches, *Metabolites*, 4 (2014) 831-878.
- [88] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochemical Journal*, 435 (2011) 297-312.
- [89] D. Soiferman, O. Ayalon, S. Weissman, A. Saada, The effect of small molecules on nuclear-encoded translation diseases, *Biochimie*, 100 (2014) 184-191.
- [90] L.D. Zorova, V.A. Popkov, E.Y. Plotnikov, D.N. Silachev, I.B. Pevzner, S.S. Jankauskas, V.A. Babenko, S.D. Zorov, A.V. Balakireva, M. Juhaszova, Mitochondrial membrane potential, *Analytical Biochemistry*, 552 (2018) 50-59.
- [91] G. Bagkos, K. Koufopoulos, C. Piperi, A new model for mitochondrial membrane potential production and storage, *Medical Hypotheses*, 83 (2014) 175-181.

- [92] L. Tilokani, S. Nagashima, V. Paupe, J. Prudent, Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms, *Essays in Biochemistry*, 62 (2018) 341-360.
- [93] I.N. Shokolenko, G.L. Wilson, M.F. Alexeyev, Aging: A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update, *World Journal of Experimental Medicine*, 4 (2014) 46.
- [94] M. Mancuso, D. Orsucci, F. Coppede, C. Nesti, A. Choub, G. Siciliano, Diagnostic approach to mitochondrial disorders: the need for a reliable biomarker, *Current Molecular Medicine*, 9 (2009) 1095-1107.
- [95] K. Filler, D. Lyon, J. Bennett, N. McCain, R. Elswick, N. Lukkahatai, L.N. Saligan, Association of mitochondrial dysfunction and fatigue: a review of the literature, *BBA Clinical*, 1 (2014) 12-23.
- [96] D.M. Niyazov, S.G. Kahler, R.E. Frye, Primary mitochondrial disease and secondary mitochondrial dysfunction: importance of distinction for diagnosis and treatment, *Molecular Syndromology*, 7 (2016) 122-137.
- [97] I. Ryoo, M.K. Kwak, Regulatory crosstalk between the oxidative stress-related transcription factor Nfe2l2/Nrf2 and mitochondria, *Toxicology Applied Pharmacology*, 359 (2018) 24-33.
- [98] K. Itoh, P. Ye, T. Matsumiya, K. Tanji, T. Ozaki, Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria, *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition*, 56 (2015) 91-97.
- [99] C.A. Silva-Islas, P.D. Maldonado, Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation, *Pharmacological Research*, 134 (2018) 92-99.
- [100] A. Cuadrado, G. Manda, A. Hassan, M.J. Alcaraz, C. Barbas, A. Daiber, P. Ghezzi, R. León, M.G. López, B. Oliva, Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach, *Pharmacological Reviews*, 70 (2018) 348-383.
- [101] A. Cuadrado, NRF2 in neurodegenerative diseases, *Current Opinion in Toxicology*, 1 (2016) 46-53.
- [102] Y. Huang, W. Li, Z. Su, A.N.T. Kong, The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response, *The Journal of nutritional Biochemistry*, 26 (2015) 1401-1413.
- [103] J. Chen, Z. Zhang, L. Cai, Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status, *Diabetes Metabolism Journal*, 38 (2014) 337-345.
- [104] X. Bai, Y. Chen, X. Hou, M. Huang, J. Jin, Emerging role of NRF2 in chemoresistance by regulating drug-metabolizing enzymes and efflux transporters, *Drug Metabolism Reviews*, 48 (2016) 541-567.
- [105] G. Bendavit, T. Aboukassim, K. Hilmi, S. Shah, G. Batist, Nrf2 transcription factor can directly regulate mTOR linking cytoprotective gene expression to a major metabolic regulator that generates redox activity, *Journal of Biological Chemistry*, 291 (2016) 25476-25488.

- [106] S. Vomund, A. Schäfer, M. Parnham, B. Brüne, A. von Knethen, Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2017) 2772.
- [107] H. Zhang, M. Yin, L. Huang, J. Wang, L. Gong, J. Liu, B. Sun, Evaluation of the cellular and animal models for the study of antioxidant activity: a review, *Journal of Food Science*, 82 (2017) 278-288.
- [108] A.T. Dinkova-Kostova, A.Y. Abramov, The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function, *Free Radical Biology Medicine*, 88 (2015) 179-188.
- [109] I. Bellezza, I. Giambanco, A. Minelli, R. Donato, Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress, *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research*, 1865 (2018) 721-733.
- [110] J.J. Qin, X.D. Cheng, J. Zhang, W.D. Zhang, Dual roles and therapeutic potential of Keap1-Nrf2 pathway in pancreatic cancer: a systematic review, *Cell Communication Signaling*, 17 (2019) 1-15.
- [111] B.K. Ooi, K.G. Chan, B.H. Goh, W.H. Yap, The role of natural products in targeting cardiovascular diseases via Nrf2 pathway: novel molecular mechanisms and therapeutic approaches, *Frontiers in Pharmacology*, 9 (2018) 1308.
- [112] Y.H. Tong, B. Zhang, Y. Fan, N.M. Lin, Keap1–Nrf2 pathway: A promising target towards lung cancer prevention and therapeutics, *Chronic diseases Translational Medicine*, 1 (2015) 175-186.
- [113] H.K. Bryan, A. Olayanju, C.E. Goldring, B.K. Park, The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and-independent mechanisms of regulation, *Biochemical Pharmacology*, 85 (2013) 705-717.
- [114] D.A. Abed, M. Goldstein, H. Albanyan, H. Jin, L. Hu, Discovery of direct inhibitors of Keap1–Nrf2 protein–protein interaction as potential therapeutic and preventive agents, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5 (2015) 285-299.
- [115] S.T. Mathew, O. Hammarsten, Multiple modes of Nrf2 regulation and transcriptional response. The Transcription Factor Nrf2, J. A. Morales-Gonzalez (Eds.), IntechOpen, London, 978-1198, 2016.
- [116] E.E. Vomhof-DeKrey, M.J. Picklo Sr, The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23 (2012) 1201-1206.
- [117] F. Katsuoka, M. Yamamoto, Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): history, structure and function, *Gene*, 586 (2016) 197-205.
- [118] M.M. Simile, G. Latte, R.M. Pascale, MAF proteins: a family of regulating and regulated molecules, *Digestive Medicine Research*, 1 (2018) 1-5.
- [119] A. Raghunath, K. Sundarraj, R. Nagarajan, F. Arfuso, J. Bian, A.P. Kumar, G. Sethi, E. Perumal, Antioxidant response elements: discovery, classes, regulation and potential applications, *Redox Biology*, 17 (2018) 297-314.

- [120] S.E. Lacher, M. Slattery, Gene regulatory effects of disease-associated variation in the NRF2 network, *Current Opinion in Toxicology*, 1 (2016) 71-79.
- [121] B.G. Richardson, A.D. Jain, H.R. Potteti, P.R. Lazzara, B.P. David, C.R. Tamatam, E. Choma, K. Skowron, K. Dye, Z. Siddiqui, Replacement of a naphthalene scaffold in kelch-like ech-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 61 (2018) 8029-8047.
- [122] J. Kim, Y.S. Keum, NRF2, a key regulator of antioxidants with two faces towards cancer, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2016 (2016) 7.
- [123] P. Deshmukh, S. Unni, G. Krishnappa, B. Padmanabhan, The Keap1–Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases, *Biophysical Reviews*, 9 (2017) 41-56.
- [124] J.D. Hayes, A.T. Dinkova-Kostova, The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism, *Trends in Biochemical Sciences*, 39 (2014) 199-218.
- [125] M. Barancik, L. Gresova, M. Barteková, I. Dovinová, Nrf2 as a key player of redox regulation in cardiovascular diseases, *Physiological Research*, 65 (2016) 1-10.
- [126] M.T. Malloy, D.J. McIntosh, T.S. Walters, A. Flores, J.S. Goodwin, I.J. Arinze, Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies implications for degradation of NRF2 in the nucleus, *Journal of Biological Chemistry*, 288 (2013) 14569-14583.
- [127] I. Livneh, V. Cohen-Kaplan, C. Cohen-Rosenzweig, N. Avni, A. Ciechanover, The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death, *Cell Research*, 26 (2016) 869-885.
- [128] Z. Zhou, J. Xu, X. Bao, J. Shi, B. Liu, Y. Chen, J. Li, Nuclear Nrf2 activity in laryngeal carcinoma is regulated by SENP3 after cisplatin-induced reactive oxygen species stress, *Journal of Cancer*, 10 (2019) 3427-3434.
- [129] Y. Guo, S. Yu, C. Zhang, A.N.T. Kong, Epigenetic regulation of Keap1-Nrf2 signaling, *Free Radical Biology Medicine*, 88 (2015) 337-349.
- [130] D. Cheng, R. Wu, Y. Guo, A.N.T. Kong, Regulation of Keap1–Nrf2 signaling: the role of epigenetics, *Current Opinion in Toxicology*, 1 (2016) 134-138.
- [131] P. Hennig, M. Garstkiewicz, S. Grossi, M. Di Filippo, L.E. French, H.D. Beer, The crosstalk between Nrf2 and inflammasomes, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2018) 562.
- [132] J.R. Liddell, Are astrocytes the predominant cell type for activation of Nrf2 in aging and neurodegeneration?, *Antioxidants*, 6 (2017) 65.
- [133] Y. Katsuragi, Y. Ichimura, M. Komatsu, Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1, *Current Opinion in Toxicology*, 1 (2016) 54-61.

- [134] Y. Katsuragi, Y. Ichimura, M. Komatsu, p62/SQSTM 1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor, *The FEBS Journal*, 282 (2015) 4672-4678.
- [135] M. Pajares, A. Cuadrado, A.I. Rojo, Modulation of proteostasis by transcription factor NRF2 and impact in neurodegenerative diseases, *Redox Biology*, 11 (2017) 543-553.
- [136] R. Khandia, M. Dadar, A. Munjal, K. Dhama, K. Karthik, R. Tiwari, M. Yattoo, H. Iqbal, K.P. Singh, S.K. Joshi, A Comprehensive Review of autophagy and its various roles in infectious, non-infectious, and lifestyle diseases: current knowledge and prospects for disease prevention, novel drug design, and therapy, *Cells*, 8 (2019) 674.
- [137] L. Wang, X. Ye, T. Zhao, The physiological roles of autophagy in the mammalian life cycle, *Biological Reviews*, 94 (2019) 503-516.
- [138] A.C. Jacomin, L. Gul, P. Sudhakar, T. Korcsmaros, I.P. Nezis, What we learned from big data for autophagy research, *Frontiers in Cell Developmental Biology*, 6 (2018).
- [139] Z. Yin, C. Pascual, D. Klionsky, Autophagy: machinery and regulation, *Microbial Cell*, 3 (2016) 588.
- [140] S.S. Singh, S. Vats, A.Y.Q. Chia, T.Z. Tan, S. Deng, M.S. Ong, F. Arfuso, C.T. Yap, B.C. Goh, G. Sethi, Dual role of autophagy in hallmarks of cancer, *Oncogene*, 37 (2018) 1142.
- [141] J. Doherty, E.H. Baehrecke, Life, death and autophagy, *Nature Cell Biology*, 20 (2018) 1110-1117.
- [142] S. Bialik, S.K. Dasari, A. Kimchi, Autophagy-dependent cell death—where, how and why a cell eats itself to death, *Journal of Cell Science* 131 (2018) jcs215152.
- [143] S.W. Ryter, K. Mizumura, A.M.K. Choi, The impact of autophagy on cell death modalities, *International Journal of Cell Biology*, 2014 (2014).
- [144] B.E. Fitzwalter, A. Thorburn, Recent insights into cell death and autophagy, *The FEBS Journal*, 282 (2015) 4279-4288.
- [145] Q. Chen, J. Kang, C. Fu, The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis, *Signal Transduction Targeted Therapy*, 3 (2018) 18.
- [146] J. Navarro-Yepes, M. Burns, A. Anandhan, O. Khalimonchuk, L.M. Del Razo, B. Quintanilla-Vega, A. Pappa, M.I. Panayiotidis, R. Franco, Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival, *Antioxidants Redox Signaling*, 21 (2014) 66-85.
- [147] M. Badadani, Autophagy mechanism, regulation, functions, and disorders, *International Scholarly Research Notices: Cell Biology*, 2012 (2012) 11.
- [148] V. Lahiri, W.D. Hawkins, D.J. Klionsky, Watch what you (self-) eat: autophagic mechanisms that modulate metabolism, *Cell Metabolism*, 29 (2019) 803-826.

- [149] A. Scervo, M. Bourdenx, O. Pampliega, A.M. Cuervo, Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders, *The Lancet Neurology*, 17 (2018) 802-815.
- [150] N. Mizushima, M. Komatsu, Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell*, 147 (2011) 728-741.
- [151] M. Lippai, Z. Szatmári, Autophagy-from molecular mechanisms to clinical relevance, *Cell Biology Toxicology*, 33 (2017) 145-168.
- [152] N. Fujikake, M. Shin, S. Shimizu, Association between autophagy and neurodegenerative diseases, *Frontiers in Neuroscience*, 12 (2018) 255.
- [153] S.A. Tooze, T. Yoshimori, The origin of the autophagosomal membrane, *Nature Cell Biology*, 12 (2010) 831.
- [154] Z. Yang, D.J. Klionsky, Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation, *Current Opinion in Cell Biology*, 22 (2010) 124-131.
- [155] S. Jawhari, M.H. Ratinaud, M. Verdier, Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'ménage-à-trois', *Cell Death Disease*, 7 (2016) e2434.
- [156] B. Bingol, Autophagy and lysosomal pathways in nervous system disorders, *Molecular Cellular Neuroscience*, 91 (2018) 167-208.
- [157] B.W. Kim, H.K.S. Do Hoon Kwon, Structure biology of selective autophagy receptors, *BMB Reports*, 49 (2016) 73-80.
- [158] T. Lamark, S. Svenning, T. Johansen, Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm, *Essays in Biochemistry*, 61 (2017) 609-624.
- [159] L. Galluzzi, E.H. Baehrecke, A. Ballabio, P. Boya, J.M. Bravo- San Pedro, F. Cecconi, A.M. Choi, C.T. Chu, P. Codogno, M.I. Colombo, Molecular definitions of autophagy and related processes, *The EMBO Journal*, 36 (2017) 1811-1836.
- [160] R. Ghosh, J.S. Pattison, Macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in heart failure: the known and the unknown, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2018 (2018) 22.
- [161] S. Kaushik, A.M. Cuervo, The coming of age of chaperone-mediated autophagy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19 (2018) 365-381.
- [162] Y. Tang, X.W. Wang, Z.H. Liu, Y.M. Sun, Y.X. Tang, D.H. Zhou, Chaperone-mediated autophagy substrate proteins in cancer, *Oncotarget*, 8 (2017) 51970–51985.
- [163] A.M. Cuervo, E. Wong, Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging, *Cell Research*, 24 (2014) 92-104.
- [164] M. Oku, Y. Sakai, Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries, *Bioessays*, 40 (2018) 1800008.
- [165] S.R. Yoshii, N. Mizushima, Monitoring and measuring autophagy, *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2017) 1865.

- [166] D. Mijaljica, M. Prescott, R.J. Devenish, Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum, *Autophagy*, 7 (2011) 673-682.
- [167] K. Zheng, Z. He, K. Kitazato, Y. Wang, Selective autophagy regulates cell cycle in cancer therapy, *Theranostics*, 9 (2019) 104-125.
- [168] K.R. Parzych, D.J. Klionsky, An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation, *Antioxidants Redox Signaling*, 20 (2014) 460-473.
- [169] K. Tekirdag, A.M. Cuervo, Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: jointed by a chaperone, *Journal of Biological Chemistry*, 293 (2018) 5414-5424.
- [170] A.R. Ariosa, D.J. Klionsky, Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons, *Journal of Molecular Medicine*, 94 (2016) 1217-1227.
- [171] I. Dikic, Z. Elazar, Mechanism and medical implications of mammalian autophagy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19 (2018) 349-364.
- [172] M. Hansen, D.C. Rubinsztein, D.W. Walker, Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19 (2018) 579-593.
- [173] V. Roca-Agujetas, C. de Dios, L. Lestón, M. Marí, A. Morales, A. Colell, Recent insights into the mitochondrial role in autophagy and its regulation by oxidative stress, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2019 (2019) 16.
- [174] D.H. Grasso, F.J. Renna, M.I. Vaccaro, Initial steps in mammalian autophagosome biogenesis, *Frontiers in Cell Developmental Biology*, 6 (2018) 146.
- [175] A.S. Dossou, A. Basu, The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy, *Cancers*, 11 (2019) 1422.
- [176] Y.C. Kim, K.L. Guan, mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation, *The Journal of Clinical Investigation*, 125 (2015) 25-32.
- [177] K. Maiese, *Molecules to Medicine with mTOR: Translating Critical Pathways into Novel Therapeutic Strategies*, Elsevier Science, Cambridge, ABD, 2016.
- [178] Y. Rabanal-Ruiz, E.G. Otten, V.I. Korolchuk, mTORC1 as the main gateway to autophagy, *Essays in Biochemistry*, 61 (2017) 565-584.
- [179] S. Sciarretta, P. Zhai, D. Shao, Y. Maejima, J. Robbins, M. Volpe, G. Condorelli, J. Sadoshima, Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome, *Circulation*, 125 (2012) 1134-1146.
- [180] S. Herzig, R.J. Shaw, AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19 (2018) 121-135.
- [181] I. Tamargo-Gómez, G. Mariño, AMPK: regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy, *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2018) 3812.

- [182] N.N. Noda, Y. Fujioka, Atg1 family kinases in autophagy initiation, *Cellular Molecular Life Sciences*, 72 (2015) 3083-3096.
- [183] M. Mehrpour, J. Botti, P. Codogno, Mechanisms and regulation of autophagy in mammalian cells, *Atlas of Genetics Cytogenetics in Oncology Haematology*, 16 (2012) 165-182.
- [184] C. Burman, N.T. Ktistakis, Autophagosome formation in mammalian cells, *Seminars in Immunopathology*, Springer, 32 (2010) 397-413.
- [185] T.J. Mercer, A. Gubas, S.A. Tooze, A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis, *Journal of Biological Chemistry*, 293 (2018) 5386-5395.
- [186] W.L. Sun, Ambra1 in autophagy and apoptosis: implications for cell survival and chemotherapy resistance, *Oncology Letters*, 12 (2016) 367-374.
- [187] G. Stjepanovic, S. Baskaran, M.G. Lin, J.H. Hurley, Unveiling the role of VPS34 kinase domain dynamics in regulation of the autophagic PI3K complex, *Molecular cellular Oncology*, 4 (2017) e1367873.
- [188] R.C. Russell, Y. Tian, H. Yuan, H.W. Park, Y.Y. Chang, J. Kim, H. Kim, T.P. Neufeld, A. Dillin, K.L. Guan, ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase, *Nature Cell Biology*, 15 (2013) 741-750.
- [189] A.C. Nascimbeni, P. Codogno, E. Morel, Phosphatidylinositol- 3- phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics, *The FEBS Journal*, 284 (2017) 1267-1278.
- [190] V. Cianfanelli, F. Nazio, F. Cecconi, Connecting autophagy: AMBRA1 and its network of regulation, *Molecular Cellular Oncology*, 2 (2015) e970059.
- [191] M. Antonioli, F. Albiero, G.M. Fimia, M. Piacentini, AMBRA1-regulated autophagy in vertebrate development, *International Journal of Developmental Biology*, 59 (2015) 109-117.
- [192] A.F.C. Velazquez, W.T. Jackson, So many roads: the multifaceted regulation of autophagy induction, *Molecular Cellular Biology*, 38 (2018) e00303-00318.
- [193] A.J. Müller, T. Proikas-Cezanne, Function of human WIPI proteins in autophagosomal rejuvenation of endomembranes?, *FEBS Letters*, 589 (2015) 1546-1551.
- [194] L. Staiano, F. Zappa, Hijacking intracellular membranes to feed autophagosomal growth, *FEBS Letters*, 593 (2019) 3120-3134.
- [195] M. Grimm, C. Backhaus, T. Proikas-Cezanne, WIPI-mediated autophagy and longevity, *Cells*, 4 (2015) 202-217.
- [196] T. Proikas-Cezanne, Z. Takacs, P. Dönnies, O. Kohlbacher, WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome, *Journal of Cell Science*, 128 (2015) 207-217.
- [197] S. Randall-Demllo, M. Chieppa, R.D. Eri, Intestinal epithelium and autophagy: partners in gut homeostasis, *Frontiers in Immunology*, 4 (2013) 301.

- [198] Y. Chun, J. Kim, Autophagy: an essential degradation program for cellular homeostasis and life, *Cells*, 7 (2018) 278.
- [199] Y. Wei, M. Liu, X. Li, J. Liu, H. Li, Origin of the autophagosome membrane in mammals, *BioMed Research International*, 2018 (2018) 9.
- [200] C.F. Bento, M. Renna, G. Ghislat, C. Puri, A. Ashkenazi, M. Vicinanza, F.M. Menzies, D.C.J.A.r.o.b. Rubinsztein, Mammalian autophagy: how does it work?, *Annual Review of Biochemistry*, 85 (2016) 685-713.
- [201] K. Søreng, T.P. Neufeld, A. Simonsen, Membrane trafficking in autophagy. *International Review of Cell and Molecular Biology*, L. Galluzzi (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2018.
- [202] T. Johansen, T. Lamark, Selective autophagy: atg8 family proteins, LIR motifs and cargo receptors, *Journal of Molecular Biology*, 432 (2019) 80-103.
- [203] S. Nakamura, T. Yoshimori, New insights into autophagosome–lysosome fusion, *Journal of Cell Science*, 130 (2017) 1209-1216.
- [204] Y.K. Lee, J.A. Lee, Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy, *BMB Reports*, 49 (2016) 424.
- [205] Y.G. Zhao, H. Zhang, Autophagosome maturation: an epic journey from the ER to lysosomes, *Journal of Cell Biology*, 218 (2018) 757-770.
- [206] L. Yu, Y. Chen, S.A. Tooze, Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms, *Autophagy*, 14 (2018) 207-215.
- [207] H. Hikita, S. Sakane, T. Takehara, Mechanisms of the autophagosome-lysosome fusion step and its relation to nonalcoholic fatty liver disease, *Liver Research*, 2 (2018) 120-124.
- [208] C. Fang, L. Gu, D. Smerin, S. Mao, X. Xiong, The interrelation between reactive oxygen species and autophagy in neurological disorders, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2017 (2017) 16.
- [209] S. Yoshida, S. Hong, T. Suzuki, S. Nada, A.M. Mannan, J. Wang, M. Okada, K.L. Guan, K. Inoki, Redox regulates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity by modulating the TSC1/TSC2-Rheb GTPase pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 32651-32660.
- [210] L. Qu, C. Chen, Y.Y. Chen, Y. Li, F. Tang, H. Huang, W. He, R. Zhang, L. Shen, High-mobility group box 1 (HMGB1) and autophagy in acute lung injury (ALI): a review, *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental Clinical Research*, 25 (2019) 1828–1837.
- [211] T. Xu, L. Jiang, Z. Wang, The progression of HMGB1-induced autophagy in cancer biology, *OncoTargets Therapy*, 12 (2019) 365–377.

- [212] J. Huang, G.Y. Lam, J.H. Brumell, Autophagy signaling through reactive oxygen species, *Antioxidants Redox Signaling*, 14 (2011) 2215-2231.
- [213] E.E. Essick, F. Sam, Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer, *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 3 (2010) 168-177.
- [214] Y. Zhao, T. Qu, P. Wang, X. Li, J. Qiang, Z. Xia, H. Duan, J. Huang, L. Zhu, Unravelling the relationship between macroautophagy and mitochondrial ROS in cancer therapy, *Apoptosis*, 21 (2016) 517-531.
- [215] S.Z.A. Shah, D. Zhao, T. Hussain, N. Sabir, M.H. Mangi, L. Yang, p62-Keap1-NRF2-ARE pathway: a contentious player for selective targeting of autophagy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in prion diseases, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11 (2018) 310.
- [216] R. Wei, M. Enaka, Y. Muragaki, Activation of KEAP1/NRF2/P62 signaling alleviates high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing reactive oxygen species production, *Scientific Reports*, 9 (2019) 1-13.
- [217] T. Jiang, B. Harder, M.R. De La Vega, P.K. Wong, E. Chapman, D.D. Zhang, p62 links autophagy and Nrf2 signaling, *Free Radical Biology Medicine*, 88 (2015) 199-204.
- [218] S. Kageyama, T. Saito, M. Obata, R. Koide, Y. Ichimura, M. Komatsu, Negative regulation of the Keap1-Nrf2 pathway by a p62/Sqstm1 splicing variant, *Molecular Cellular Biology*, 38 (2018) e00642-00617.
- [219] H. Kobayashi, Recent trends in mucopolysaccharidosis research, *Journal of Human Genetics*, 64 (2019) 127-137.
- [220] B.L. Farah, P.M. Yen, D.D. Koeberl, Links between autophagy and disorders of glycogen metabolism—perspectives on pathogenesis and possible treatments, *Molecular Genetics Metabolism*, 129 (2019) 3-12.
- [221] C. Ward, N. Martinez-Lopez, E.G. Otten, B. Carroll, D. Maetzel, R. Singh, S. Sarkar, V.I. Korolchuk, Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Biology of Lipids*, 1861 (2016) 269-284.
- [222] T.M. Cox, M.B. Cachón- González, The cellular pathology of lysosomal diseases, *The Journal of Pathology*, 226 (2012) 241-254.
- [223] J. Häberle, A. Chakrapani, N.A. Mew, N. Longo, Hyperammonaemia in classic organic acidaemias: a review of the literature and two case histories, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13 (2018) 219.
- [224] G.R.D. Villani, G. Gallo, E. Scolamiero, F. Salvatore, M. Ruoppolo, “Classical organic acidurias”: diagnosis and pathogenesis, *Clinical Experimental Medicine*, 17 (2017) 305-323.
- [225] I. Manoli, C.P. Venditti, Disorders of branched chain amino acid metabolism, *Translational Science of Rare Diseases*, 1 (2016) 91-110.

- [226] M. Wajner, Neurological manifestations of organic acidurias, *Nature Reviews Neurology*, 15 (2019) 253-271.
- [227] L.R. Soria, N. Brunetti- Pierrri, Ammonia and autophagy: an emerging relationship with implications for disorders with hyperammonemia, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42 (2019) 1097-1104.
- [228] L.R. Soria, N. Brunetti-Pierrri, Targeting autophagy for therapy of hyperammonemia, *Autophagy*, 14 (2018) 1273-1275.
- [229] G. Filomeni, D. De Zio, F. Cecconi, Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs, *Cell Death & Differentiation*, 22 (2015) 377-388.
- [230] M. Villanueva Paz, D. Cotán, J. Garrido-Maraver, M.D. Cordero, M. Oropesa-Ávila, M. de La Mata, A. Delgado Pavón, I. de Laverá, E. Alcocer-Gómez, J.A. Sánchez-Alcázar, Targeting autophagy and mitophagy for mitochondrial diseases treatment, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20 (2016) 487-500.
- [231] M. Villanueva Paz, D. Cotán, M.D. Cordero, J. Garrido-Maraver, M. Oropesa-Ávila, M. Mata, A. Delgado Pavón, E. Alcocer-Gómez, I. Laverá, J.A. Sánchez-Alcázar, The role of autophagy and mitophagy in mitochondrial diseases. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, M. A. Hayat (Eds.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, 155-172, 2016.
- [232] D. Ebrahimi-Fakhari, A. Saffari, L. Wahlster, J. Lu, S. Byrne, G.F. Hoffmann, H. Jungbluth, M. Sahin, Congenital disorders of autophagy: an emerging novel class of inborn errors of neuro-metabolism, *Brain*, 139 (2016) 317-337.
- [233] D. Ebrahimi-Fakhari, Congenital disorders of autophagy: what a pediatric neurologist should know, *Neuropediatrics*, 49 (2018) 018-025.
- [234] O. Erel, A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clinical Biochemistry*, 37 (2004) 277-285.
- [235] O. Erel, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry*, 38 (2005) 1103-1111.
- [236] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239 (1988) 487-491.
- [237] H.E. Dekter, F.P. Romijn, W.P.M. Temmink, J. van Pelt, J.W. de Fijter, N.P.M. Smit, A spectrophotometric assay for routine measurement of mammalian target of rapamycin activity in cell lysates, *Analytical Biochemistry*, 403 (2010) 79-87.
- [238] U. Garbin, A.F. Pasini, C. Stranieri, M. Cominacini, A. Pasini, S. Manfro, F. Lugoboni, C. Mozzini, G.C. Guidi, G. Faccini, Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation, *PLoS One*, 4 (2009) e8225.

- [239] S.A. Rushworth, S. Shah, D.J. MacEwan, TNF mediates the sustained activation of Nrf2 in human monocytes, *The Journal of Immunology*, 187 (2011) 702-707.
- [240] R.P. Wu, T. Hayashi, H.B. Cottam, G. Jin, S. Yao, C.C.N. Wu, M.D. Rosenbach, M. Corr, R.B. Schwab, D.A. Carson, Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (2010) 7479-7484.
- [241] I. Knerr, N. Weinhold, J. Vockley, K.M. Gibson, Advances and challenges in the treatment of branched-chain amino/keto acid metabolic defects, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35 (2012) 29-40.
- [242] I. Peluso, A. Raguzzini, Salivary and urinary total antioxidant capacity as biomarkers of oxidative stress in humans, *Pathology Research International*, 2016 (2016) 14.
- [243] G.S. Ribas, G.B. Biancini, C. Mescka, C.Y. Wayhs, A. Sitta, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L-carnitine supplementation, *Cellular Molecular Neurobiology*, 32 (2012) 77-82.
- [244] K.A. Victor, Evaluation of Mitochondrial Dysfunction in Biofluids from Individuals with Methylmalonic Acidemia (MMA) and Propionic Acidemia (PA) and Development of Hek-293 MMA and PA Knockout Cell Lines for Further Investigation, The Degree of Master of Science, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, 2016.
- [245] C. Ialongo, Preanalytic of total antioxidant capacity assays performed in serum, plasma, urine and saliva, *Clinical Biochemistry*, 50 (2017) 356-363.
- [246] S. Kilic, Etki büyüklüğü, *Journal of Mood Disorders*, 4 (2014) 44-46.
- [247] N. Demirel, S. Gürler, Klinik çalışmalarda örneklem genişliğinin belirlenmesine pratik yaklaşımlar, *Kafkas Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi*, 15 (2010) 205-211.
- [248] M.D. Forrest, Why cancer cells have a more hyperpolarised mitochondrial membrane potential and emergent prospects for therapy, *bioRxiv*, (2015) 1-42.
- [249] A. Cammarata, Quantification of Mitochondrial Membrane Potential in the Isolated Rat Lung Using R6G, the Degree of Master of Science, Marquette University Biomedical Engineering, Milwaukee, Wisconsin, 2019.
- [250] P.B. Esparza-Moltó, C. Nuevo-Tapióles, J.M. Cuezva, Regulation of the H⁺-ATP synthase by IF1: a role in mitohormesis, *Cellular Molecular Life Sciences*, 74 (2017) 2151-2166.
- [251] A. García-Aguilar, J.M. Cuezva, A review of the inhibition of the mitochondrial ATP synthase by IF1 in vivo: reprogramming energy metabolism and inducing mitohormesis, *Frontiers in Physiology*, 9 (2018) 1322.
- [252] S. Brasil, E. Richard, A. Jorge- Finnigan, F. Leal, B. Merinero, R. Banerjee, L.R. Desviat, M. Ugarte, B. Pérez, Methylmalonic aciduria cblB type: characterization of two

novel mutations and mitochondrial dysfunction studies, *Clinical Genetics*, 87 (2015) 576-581.

[253] A. Luciani, A. Schumann, M. Berquez, Z. Chen, D. Nieri, M. Failli, H. Debaix, B.P. Festa, N. Tokonami, A. Raimondi, Impaired mitophagy links mitochondrial disease to epithelial stress in methylmalonyl-CoA mutase deficiency, *Nature Communications*, 11 (2020) 1-21.

[254] E. Richard, A. Alvarez- Barrientos, B. Perez, L.R. Desviat, M. Ugarte, Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain Ireland*, 213 (2007) 453-461.

[255] D.R. Melo, A.J. Kowaltowski, M. Wajner, R.F. Castilho, Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia, *Journal of Bioenergetics Biomembranes*, 43 (2011) 39-46.

[256] L. Gallego-Villar, C. Pérez-Cerdá, B. Pérez, D. Abia, M. Ugarte, E. Richard, L.R. Desviat, Functional characterization of novel genotypes and cellular oxidative stress studies in propionic acidemia, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36 (2013) 731-740.

[257] L. Gallego-Villar, B. Pérez, M. Ugarte, L.R. Desviat, E. Richard, Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 452 (2014) 457-461.

[258] Y. de Keyzer, V. Valayannopoulos, J.F. Benoist, F. Batteux, F. Lacaille, L. Hubert, D. Chrétien, B. Chadeaux-Vekemans, P. Niaudet, G. Touati, Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria, *Pediatric Research*, 66 (2009) 91-95.

[259] B. Donida, D.P. Marchetti, G.B. Biancini, M. Deon, P.R. Manini, H.T. da Rosa, D.J. Moura, J. Saffi, F. Bender, M.G. Burin, Oxidative stress and inflammation in mucopolysaccharidosis type IVA patients treated with enzyme replacement therapy, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1852 (2015) 1012-1019.

[260] B. Donida, D.P. Marchetti, C.E.D. Jacques, G. Ribas, M. Deon, P. Manini, H.T. da Rosa, D.J. Moura, J. Saffi, R. Giugliani, Oxidative profile exhibited by Mucopolysaccharidosis type IVA patients at diagnosis: increased keratan urinary levels, *Molecular Genetics Metabolism Reports*, 11 (2017) 46-53.

[261] A. Koussounadis, S.P. Langdon, I.H. Um, D.J. Harrison, V.A. Smith, Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system, *Scientific Reports*, 5 (2015) 10775.

[262] C.G. Fernandes, C.G. Borges, B. Seminotti, A.U. Amaral, L.A. Knebel, P. Eichler, A.B. de Oliveira, G. Leipnitz, M. Wajner, Experimental evidence that methylmalonic acid provokes oxidative damage and compromises antioxidant defenses in nerve terminal and striatum of young rats, *Cellular Molecular Neurobiology*, 31 (2011) 775-785.

- [263] A. Schumann, Novel Insights into the Pathophysiology of Kidney Disease in Methylmalonic Aciduria, PhD Thesis, University of Zurich Faculty of Medicine, Zurich, 2017.
- [264] K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, T. O'Connor, M. Yamamoto, Keap1 regulates both cytoplasmic- nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles, *Genes to Cells*, 8 (2003) 379-391.
- [265] D. Volonte, Z.H. Liu, P.M. Musille, E. Stoppani, N. Wakabayashi, Y.P. Di, M.P. Lisanti, T.W. Kensler, F. Galbiati, Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence, *Molecular Biology of The Cell*, 24 (2013) 1852-1862.
- [266] P. Paramasivan, I.H. Kankia, S.P. Langdon, Y.Y. Deeni, Emerging role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in the mechanism of action and resistance to anticancer therapies, *Cancer Drug Resistance*, 2 (2019) 490-515.
- [267] J. Rendleman, Z. Cheng, S. Maity, N. Kastelic, M. Munschauer, K. Allgoewer, G. Teo, Y.B.M. Zhang, A. Lei, B. Parker, New insights into the cellular temporal response to proteostatic stress, *eLife*, 7 (2018) e39054.
- [268] J. Rendleman, Z. Cheng, S. Maity, N. Kastelic, M. Munschauer, K. Allgoewer, G. Teo, Y.B. Zhang, A. Lei, B. Parker, Quantifying multi-layered expression regulation in response to stress of the endoplasmic reticulum, *bioRxiv*, (2018) 308379.
- [269] H.B. Suliman, J.E. Keenan, C.A.J.J.i. Piantadosi, Mitochondrial quality-control dysregulation in conditional HO-1^{-/-}-mice, *JCI Insight*, 2 (2017) 1-18.
- [270] L.R. Vasconcellos, M.S. Siqueira, R. Moraes, L.A. Carneiro, M.T. Bozza, L.H. Travassos, Heme oxygenase-1 and autophagy linked for cytoprotection, *Current Pharmaceutical Design*, 24 (2018) 2311-2316.
- [271] J.H. Kim, K.M. Kim, J.U. Jeong, J.H. Shin, J.M. Shin, K.T. Bang, Nrf2-Heme oxygenase-1 modulates autophagy and inhibits apoptosis triggered by elevated glucose levels in renal tubule cells, *Kidney Research Clinical Practice*, 38 (2019) 318-325.
- [272] N. Mizushima, T. Yoshimori, B. Levine, Methods in mammalian autophagy research, *Cell*, 140 (2010) 313-326.
- [273] X. Ma, H. Liu, S.R. Foyil, R.J. Godar, C.J. Weinheimer, J.A. Hill, A. Diwan, Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury, *Circulation*, 125 (2012) 3170-3181.
- [274] X. Ma, H. Liu, J.T. Murphy, S.R. Foyil, R.J. Godar, H. Abuirqeba, C.J. Weinheimer, P.M. Barger, A. Diwan, Regulation of the transcription factor EB-PGC1 α axis by beclin-1 controls mitochondrial quality and cardiomyocyte death under stress, *Molecular cellular Biology*, 35 (2015) 956-976.
- [275] X. Wang, D. Sun, Y. Hu, X. Xu, W. Jiang, H. Shang, D. Cui, The roles of oxidative stress and Beclin-1 in the autophagosome clearance impairment triggered by cardiac arrest, *Free Radical Biology Medicine*, 136 (2019) 87-95.

- [276] T. Ruppert, A. Schumann, H.J. Gröne, J.G. Okun, S. Kölker, M.A. Morath, S.W. Sauer, Molecular and biochemical alterations in tubular epithelial cells of patients with isolated methylmalonic aciduria, *Human Molecular Genetics*, 24 (2015) 7049-7059.
- [277] C.J. Almeciga-Diaz, O.A. Hidalgo, S. Olarte-Avellaneda, A. Rodriguez-Lopez, E. Guzman, R. Garzón, L.N. Pimentel-Vera, M.A. Puentes-Tellez, A.F. Rojas-Rodriguez, K. Gorshkov, Identification of ezetimibe and pranlukast as pharmacological chaperones for the treatment of the rare disease mucopolysaccharidosis type IVA, *Journal of Medicinal Chemistry*, 62 (2019) 6175-6189.
- [278] G.F. Hoffmann, J. Zschocke, W.L. Nyhan, *Inherited Metabolic Diseases: A Clinical Approach*, 2. edition, Springer, Berlin Heidelberg, 2016.
- [279] V. Vassili, P.T.B. Tien, Diagnostic work-up in acute conditions of inborn errors of metabolism and storage diseases. *Handbook of Clinical Neurology*, O. Dulac, M. Lassonde, H.B.Sarnat (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1553-1562, 2013.
- [280] M. Agana, J. Frueh, M. Kamboj, D.R. Patel, S. Kanungo, Common metabolic disorder (inborn errors of metabolism) concerns in primary care practice, *Annals of translational Medicine*, 6 (2018) 469.
- [281] H. Cui, Y. Kong, H. Zhang, Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging, *Journal of Signal Transduction*, 2012 (2012) 646354.
- [282] B.L. Tan, M.E. Norhaizan, W.P.P. Liew, H. Sulaiman Rahman, Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases, *Frontiers in Pharmacology*, 9 (2018) 1162.

EKLER

EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi



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

Sayı : 16969557-1238

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 06 TEMMUZ 2018 CUMA
Toplantı No : 2018/17
Proje No : GO 18/640 (Değerlendirme Tarihi: 06.07.2018)
Karar No : GO 18/640-34

Üniversitemiz Çocuk Sağlığı Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL'ün sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. E. Sibel SÜMER, Prof. Dr. Ali DURSUN ile birlikte çalışacakları ve Neşe Vardar ACAR'ın doktora tezi olan, GO 18/640 kayıt numaralı, "*Kalıtımsal Metabolik Hastalıklarda Antioksidan Yanıt ve Otofajinin p62/Nrf2/Keap1 Yolağı Aracılığıyla Araştırılması*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Eylül 2018 – 31 Mart 2020 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)	10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)
İZİNLİ	
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Üye)	11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)
İZİNLİ	İZİNLİ
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)	12. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)	13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)
İZİNLİ	
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ (Üye)
KATILMADI	
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)	15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR (Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye)
8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)	17. Av. Meltem ONURLU (Üye)
9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)	

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

Ayrıntılı Bilgi için:

EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 14/05/2020

Tez Başlığı / Konusu: Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Antioksidan Yanıt Ve Otofajinin P62/Nrf2/Keap1 Yolağı Aracılığıyla Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 183 sayfalık kısmına ilişkin, 14/05/2020 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

14.05.2020

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Neşe Vardar Acar

Öğrenci No: N13241600

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Biyoloji (Moleküler Biyoloji)-Doktora

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. E. Sibel Sümer

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Neşe VARDAR ACAR
Doğum yeri : BURSA
Doğum tarihi : 10/01/1987
Medeni hali : Evli
Yazışma adresi : Reşat Nuri Cad. Genç Apart. 90/A No: 8 Ayrancı/Ankara
Telefon : 0555 475 53 35
Elektronik posta adresi : nesevardar@yahoo.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Yandal Eğitimi

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü,
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Moleküler
Biyoloji Anabilim Dalı

İş Tecrübesi:

2014-2016; ICK Biyoteknoloji; Arge Uzmanı

2017-2017; Atlas Biyoteknoloji; Arge Uzmanı

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi:

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.(Proje No: THD-2019-17639). Proje Bütçesi: 29.998,62 TL' dir.