

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ (TIP FAKÜLTESİ)**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**GLT-1 (GLUTAMAT TRANSPORTER-1) YIKIM**  
**YOLAĞININ GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE**  
**İNCELENMESİ**

**DÜRİYE NUR DAĞDELEN**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-19032 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2020**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji (Tıp Fakültesi) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Düriye Nur DAĞDELEN tarafından hazırlanan “GLT-1 (Glutamat Transporter-1) yıkım yolağının glioblastoma hücrelerinde incelenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/12/2020

Üye (T.D.) : Doç. Dr. Gizem Dönmez Yalçın Aydın Adnan Menderes  
Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Abdullah Yalçın Aydın Adnan Menderes  
Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Ü. Ayşegül Yıldız Muğla Sıtkı Koçman  
Üniversitesi

### ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ...../...../..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK  
Enstitü Müdürü V.

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans hayatım boyunca bilgi birikimi, deneyimi, yol göstericiliği ile bana yardımcı olan, sadece yapmış olduğumuz bu çalışma ile sınırlı kalmayıp hayatımda da çok güzel izler bırakan, güçlü, çalışkan, adaletli, benim için bir danışmandan daha değerli olan, her zaman benim için örnek olacak olan sevgili danışmanım Doç. Dr. Gizem Dönmez Yalçın'a,

Ders ve tez döneminde kendisinden teorik ve uygulama olarak birden fazla bilgi öğrendiğim, bilgi ve birikimiyle desteğini esirgemeyip bizlere ışık tutan, çok saygı duyduğum sevgili hocam Doç. Dr. Abdullah Yalçın'a,

Tez çalışmam boyunca ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yardımcı olan Arş. Gör. Umut Kerem Kolaç'a,

Bugünlere gelmemde, yetişmemde büyük emekleri olan, her zaman yanımda olup beni destekleyen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, eğitim konusunda beni her zaman destekleyip seven haklarını asla ödeyemeyeceğim babam Ramazan Dağdelen'e ve annem Zeynep Dağdelen'e,

Eğitimim süresince beni destekleyen, cesaretlendiren, ne zaman başım sıkışsa yardımcı olan Öğr. Gör. Duygu Sarı Yol'a ve Kader Çiçek'e,

Lisans zamanlarımda hayatıma giren hayatımın iyi ve kötü gününde her zaman yanımda olan, eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, cesaretlendiren dostluk kelimesinin anlamını birbirimizden yaşayarak öğrendiğimiz, Muazzez Kalay'a, Mete Ömür'e, Cennet Eren'e, Saliha Koraş'a, Kübra Damar'a, her zaman yanımda olaya çalışan Yasemin Coşkun 'a ve biraz geç de olsa hayatıma giren bildiği bilgileri gerek bana öğreten, tez çalışmam sırasında da her zaman yardımcı olmaya çalışan, hayatımın geri kalanında da yanımda olmasını istediğim Merve Çolak'a teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜRLER.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	15
2. GENEL BİLGİLER.....	17
2.1. Glioblastoma.....	17
2.2. Gliomaların Beyin İçerisindeki MR Görüntüsü.....	18
2.3. Eksitotoksisite.....	18
2.4. Glutamat.....	20
2.4.1. Glutamat Nörotransmisyonu (İletimi).....	21
2.4.2. Glutamat Reseptörleri.....	22
2.4.2.1. Metabotropik Reseptörler.....	23
2.4.2.2. İyonotropik Reseptörler.....	24
2.4.3. Glutamat Taşıyıcıları.....	25
2.4.3.1. GLAST (Glutamat-Aspartat Taşıyıcısı).....	26
2.4.3.2. GLT-1 (Glutamat Taşıyıcı-1).....	26
2.4.3.3. EAAT3 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı-3).....	28
2.4.3.4. EAAT4 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı-4).....	28
2.4.3.5. EAAT5 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı-5).....	28
2.5. Sirtuinler.....	29
2.5.1. Sirt4.....	33
2.6. Post-Translasyonel Modifikasyonlar.....	34
2.6.1. Ubiquitinasyon.....	35
2.6.1.1. GLT'in Ubiquitasyonu.....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Gereç.....	38

3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	38
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	38
3.2. Yöntem .....	39
3.2.1. Hücre Kültürü Uygulamaları .....	39
3.2.1.1. Medyum Hazırlama .....	39
3.2.1.2. Hücre Çözme .....	39
3.2.1.3. Hücre Pasajlama .....	40
3.2.1.4. Hücre Dondurma Besiyerinin Hazırlanması.....	41
3.2.1.5. Hücrelerin Dondurulması .....	41
3.2.1.6. Hücreden Protein Çıkarma .....	42
3.2.2. Bradford Assay .....	42
3.2.3. Western Blot.....	44
3.2.3.1. Tampon Çözeltiler .....	45
3.2.3.2. Örneklerin Hazırlanması, Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi .....	46
3.2.3.3. Jelden Membrana Transfer, Blotlama ve Görüntüleme.....	47
3.2.4. Glutamat Assay .....	48
4. BULGULAR .....	51
4.1. Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	51
4.1.1. Bradford Assay ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	51
4.1.2. GLT-1 ve Ubiquitin Protein İfadesinin Western Blot ile Tespiti .....	52
4.1.3. GLT-1 ve Ubiquitin Protein Bantlarının Image J Programı Kullanılarak Hesaplanması .....	52
4.1.4. PKC ve Sirt4 Protein İfadesinin Western Blot ile Tespiti .....	56
4.1.5. Sirt4 ve PKC Protein Bantlarının Image J Programı Kullanılarak Hesaplanması .....	57
4.2. IHA ve U87 Hücrelerinde Glutamat Assay Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	61
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	66
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	73

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ACC</b>	: Asetil-CoA
<b>ADP</b>	: Adenin difosfat
<b>AH</b>	: Alzheimer Hastalığı
<b>ALS</b>	: Amiyotrofik Lateral Skleroz
<b>AMP</b>	: Adenin monofosfat
<b>AMPA</b>	: $\alpha$ -Amino-3-Hidroksi-5-Metil-4-İzoksazol Propiyonik Asit
<b>AMPK</b>	: Adenin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
<b>ANT2</b>	: Adenin nükleotid translokator 2
<b>APS</b>	: Amonyum persülfat
<b>ATP</b>	: Adenin trifosfat
<b>BER</b>	: Baz eksizyon onarımı
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>CPS1</b>	: Karbamoil fosfat sentetaz 1
<b>CPT1</b>	: Karnitin palmitoiltransferaz 1
<b>CR</b>	: Kalori kısıtlaması
<b>DDR</b>	: DNA hasarı tepki mekanizması
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DUB</b>	: Deubikitin edici enzim
<b>EAAT</b>	: Eksitator amino asit taşıyıcı
<b>EAAT1</b>	: Eksitator amino asit taşıyıcı-1
<b>EAAT2</b>	: Eksitator amino asit taşıyıcı-2
<b>EAAT3</b>	: Eksitator amino asit taşıyıcı-3
<b>EAAT4</b>	: Eksitator amino asit taşıyıcı-4
<b>EAAT5</b>	: Eksitator amino asit taşıyıcı-5
<b>FAO</b>	: Yağ asidi oksidasyonu
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>FOXO</b>	: Forkhead transkripsiyon faktörlerinin bir alt sınıfı
<b>GBM</b>	: Glioblastoma multiform
<b>GDH</b>	: Glutamat dehidrojenaz
<b>GLT-1</b>	: Glutamat taşıyıcı-1
<b>Glu</b>	: Glutamat

<b>GS</b>	: Glutamat Sentetaz
<b>H</b>	: Hidrojen
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>HH</b>	: Huntington Hastalığı
<b>IHA</b>	: İmmortalized human astrocytes
<b>İBG</b>	: Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü
<b>iGluR</b>	: İyonotropik glutamat reseptörleri
<b>K</b>	: Potasyum
<b>KA</b>	: Kainik asit
<b>MCD</b>	: Malonil-CoA dekarboksilaz
<b>MCD</b>	: Melonil-CoA dekarboksilaz
<b>Mg</b>	: Magnezyum
<b>mGluR</b>	: Metabotropik glutamat reseptörleri
<b>MR</b>	: Manyetik rezonans görüntüleme
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>Na</b>	: Sodyum
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Nikotinamid adenin dinükleotidi
<b>NF- κB</b>	: Nükleer faktör-B
<b>NIH</b>	: Ulusal Sağlık Enstitüsü
<b>NMDA</b>	: N-metil-D-aspartik asit
<b>P/S</b>	: Penisilin Streptomisin
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Salin
<b>PGC1α</b>	: Peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatörü 1-alfa
<b>PH</b>	: Parkinson Hastalığı
<b>PKC</b>	: Protein Kinaz C
<b>PTM</b>	: Post-translasyonel Modifikasyon
<b>RIPA</b>	: Lizis ve ekstraksiyon tamponu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>Sirt</b>	: Sirtuin
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TCA</b>	: Trikarboksilik asit

<b>TEMED</b>	: Tetra metil etilen daimin
<b>Ub</b>	: Ubiquitin
<b>Ubp</b>	: Ubiquitin bağımlı proteaz
<b>UPS</b>	: Ubiquitin proteozom sistemi
<b>VGLUT</b>	: Veziküler Glutamat taşıyıcı



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Gliomaların beyin dokusunu içerisindeki görüntüsü .....	18
Şekil 2: Eksitotoksisite şeması .....	19
Şekil 3: Glutamatın yapısı .....	20
Şekil 4: Presinaptik nöronda VGLUT ile taşıma.....	21
Şekil 5: Glutamat-Glutamin döngüsü .....	22
Şekil 6: Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması .....	23
Şekil 7: NMDA reseptörünün yapısı .....	25
Şekil 8: GLT-1 tarafından glutamat taşınması ve iyon değişimi.....	27
Şekil 9: Sirtuinlerin deasetilasyon aktivitesi .....	30
Şekil 10: Sirtuinlerin ADP-ribozil transferaz aktivitesi .....	30
Şekil 11: Ubiquitin proteozom sistemi. ....	36
Şekil 12: Western blot için transfer sandviçinin hazırlanma sırası .....	47
Şekil 13: Glutamat assay çalışma prensibinin gösterimi. ....	48
Şekil 14: Glutamat assay testi için toplanan besiyerlerinin yükleme planı .....	50
Şekil 15: IHA ve U87 hücrelerinden elde edilen protein örneklerinin Bradford Assay sonuçları ile oluşturulan absorbans /standart grafiği. ....	51
Şekil 16: IHA ve U87 hücrelerinde, GLT-1 ve Ubiquitin protein ifadelerinin western blot ile görüntülenmesi .....	53
Şekil 17: Şekil 16A' daki western blot deneyi sonrası, GLT-1 ve GAPDH protein bantları için Image J programı ile tepe grafiğinin çizilmesi .....	53
Şekil 18: Şekil 16B' deki western blot deneyi sonrası, Ubiquitin ve GAPDH protein bantları için Image J programı ile tepe grafiğinin çizilmesi .....	54
Şekil 19: Şekil 16A'daki western blot deneyinde, IHA ve U87 hücreleri için rölatif GLT-1 ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği .....	55
Şekil 20: Şekil 16B'deki western blot deneyinde, IHA ve U87 hücreleri için rölatif Ubiquitin ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği .....	56
Şekil 21: IHA ve U87 hücrelerinde, Sirt4 ve PKC protein ifadelerinin western blot ile görüntülenmesi .....	57
Şekil 22: Şekil 21A'daki western blot deneyi sonrası, Sirt4 ve GAPDH protein bantları için Image J programı ile tepe grafiğinin çizilmesi .....	58

Şekil 23: Şekil 21B'deki western blot deneyi sonrası, PKC ve GAPDH protein bantları için Image J programı ile tepe grafiğinin çizilmesi .....	58
Şekil 24: Şekil 21A'daki western blot deneyinde, IHA ve U87 hücreleri için rölatif Sirt4 protein ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği .....	60
Şekil 25: Şekil 21B'deki western blot deneyinde, IHA ve U87 hücreleri için rölatif PKC protein ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği .....	60
Şekil 26: IHA ve U87 hücrelerindeki glutamat assay sonuçlarının değerlendirilmesi .....	61

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütüne Göre Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması .....	17
Tablo 2: Metabotropik glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması .....	23
Tablo 3: Bilinen glutamat taşıyıcı alt tipleri ve ekspresyon yerleri.....	26
Tablo 4: Farklı sirtuinlerin enzim aktivitesi, substrat/hedefleri ve fonksiyonları .....	32
Tablo 5: Bradford assay standartlar tablosu .....	43
Tablo 6: Bradford assay örnekler tablosu.....	43
Tablo 7: Bradford yükleme planı.....	44
Tablo 8: Glutamat assay kitinde yer alan bileşenler ve glutamat tespit reaktifi hazırlamak için kuyucuk başına bileşen kullanım miktarları.....	49
Tablo 9: GLT-1 ve GAPDH protein bantları için oluşturulan tepe grafiklerinin altındaki alanın hesaplanması ile bantlara karşılık gelen değerler .....	54
Tablo 10: Ubiquitin ve GAPDH protein bantları için oluşturulan tepe grafiklerinin altındaki alanın hesaplanması ile bantlara karşılık gelen değerler .....	55
Tablo 11: Sirt4 ve GAPDH protein bantları için oluşturulan tepe grafiklerinin altındaki alanın hesaplanması ile bantlara karşılık gelen değerler .....	59
Tablo 12: PKC ve GAPDH protein bantları için oluşturulan tepe grafiklerinin altındaki alanın hesaplanması ile bantlara karşılık gelen değerler .....	59

## ÖZET

### GLT-1 (GLUTAMAT TRANSPORTER-1) YIKIM YOLAĞININ GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

**Dağdelen D.N. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji (Tıp Fakültesi) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020.**

Glioblastoma multiform, glia hücrelerinden türeyen primer beyin tümörüdür. Tümörün büyümesi, glioma hücrelerini çevreleyen nöronların eksitotoksosite yolu ile ölmesiyle gerçekleşir. Eksitotoksosite, sinaptik boşlukta aşırı glutamat birikimi ile oluşur ve epilepsi, felç ve nörodejeneratif hastalıklar gibi beyin hastalıkları ile glioblastoma gibi beyin tümörlerinde görülür. Glutamat, merkezi sinir sisteminde birçok nörolojik işleve sahip olan bir nörotransmitterdir ve beyinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Sinir hücrelerinin uyarılması ile presinaptik nörondan sinaptik boşluğa glutamat salınır ve postsinaptik nörondaki glutamat reseptörleri uyarılır. Glial hücrelerde ve nöronlarda da bulunan glutamat taşıyıcılarının sinaptik boşluktan glutamayı toplaması ile iletim sonlanır. Sinaptik boşluktaki glutamatın büyük çoğunluğu Glutamat Transporter 1 (GLT-1) tarafından toplanmaktadır. Glutamat taşınım yolağında, Protein Kinaz C (PKC), Nedd4-2 ubiquitin ligazı fosforile ederek aktive etmekte, Nedd4-2, GLT-1'i ubiquitine etmekte ve GLT-1 degrade olmaktadır. Bu proses, GLT-1'in hücre yüzeyi ekspresyonunun, dinamik olarak değişimini ve kontrol edilmesini sağlamaktadır. Sinaptik boşlukta glutamat birikimi olmadığı durumda, GLT-1 ubiquitinasyona uğrar, yıkılır ve dolayısıyla yüzey ifadesi azalır. Sinaptik boşlukta glutamat biriktiğinde ise, GLT-1 yüzey ifadesi artar. Bu dinamik prosesdeki bozukluklar, hücreler arasındaki düşük glutamat seviyesini artırarak, beyin hastalıklarında görülen eksitotoksositeye neden olur. Sirtuinler, hücre içindeki çeşitli proteinleri posttranslasyonel modifikasyonlar için hedef alan protein deasetilaz enzim sınıfıdır. Yalnızca deasetilasyon değil, ADP-ribozilasyonu gibi posttranslasyonel modifikasyonları da gerçekleştirirler. Sirtuinlerin, nörodejeneratif hastalıklarda rollerinin bulunduğu bilinmektedir. Sirt4'ün, glioma hücrelerinde, glutamat metabolizmasını modüle ederek eksitotoksositeyi engellediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca, Sirt4'ün yokluğunda, GLT-1'e bağlı glutamat alınımının azaldığı bulunmuştur. Bu çalışmada amacımız, Sirt4'ün, glutamat metabolizmasını ve GLT-1'in

işleyişini nasıl kontrol ettiğini araştırmak ve glia ve glioblastoma hücrelerinde karşılaştırmalı olarak incelemektir. Bu nedenle, IHA (immortalized human astrocytes-glia) ve U87 (glioblastoma) hücre hatlarında Sirt4 ve GLT-1 protein ifade seviyeleri incelenmiştir. GLT-1 yıkım yolağında görev alan Ubiquitin ve Protein Kinaz C (PKC) proteinlerinin ekspresyon seviyeleri, western blot tekniği ile incelenmiştir. Ayrıca, glia ve glioblastoma hücrelerinde, medyunda birikmiş olan glutamatın seviyesi, glutamat assay ile ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, glioblastoma hücrelerinde ubikitinasyonun istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaldığı ve GLT-1'in arttığı görülmüştür. GLT-1 seviyesini kontrol ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan Sirt4 ise beklenen şekilde artmıştır. PKC protein seviyesi ise, glioblastoma hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalmıştır. Glutamat assayde, glioblastoma hücrelerinde salınmış glutamat seviyesi, glia hücrelerine göre azalmış olarak gözlenmiştir. Bunun nedeninin, glia hücrelerine oran ile büyük bir hızla çoğalan U87 hücrelerinin, hiç medyum değiştirilmeden yapılan bu assayde, yüksek oranda ölüm gösterdikleri için total glutamat salınımının daha az olması olabileceği düşünüldü. Ayrıca, Sirt4 ve GLT-1, glioblastomada artış gösterdiği için, birikmiş glutamatın toplanarak azalmış olması, beklenen bir sonuçtur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, glioblastomada, eksitotoksisitenin GLT-1 yıkım ya da aktivasyon yolağının modüle edilerek engellenebileceğini, dolayısıyla, yeni ilaç ve tedavi geliştirme alanları oluşabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Eksitotoksisite, GLT-1, Glutamat, Glioblastoma, Sirt4.

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE GLT-1 (GLUTAMATE TRANSPORTER-1) DEGRADATION PATHWAY IN GLIOBLASTOMA CELLS**

**Dağdelen D.N. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute of Medicine  
Biology (Faculty of Medicine) Program, Master's Thesis, Aydın, 2020.**

Glioblastoma multiforme is a primary brain tumor derived from glial cells. The tumor growth occurs via death of neurons surrounding glioma cells dying due to excitotoxicity. Excitotoxicity is caused by the excessive accumulation of glutamate in the synaptic cleft and observed in brain diseases such as epilepsy, stroke, and neurodegenerative diseases, as well as brain tumors such as glioblastoma. Glutamate is a neurotransmitter that has many neurological functions in the central nervous system and is found in high concentrations in the brain. After the stimulation of the nerve cells, glutamate is released from the presynaptic neuron into the synaptic cavity resulting in the induction of the glutamate receptors on the postsynaptic neuron. Glutamate neurotransmission is terminated in the synaptic cleft after the clearance of glutamate via glutamate transporters, which are also present in glial cells and neurons. The vast majority of glutamate in the synaptic cavity is collected by glutamate transporter 1 (GLT-1). In the glutamate degradation pathway, Protein Kinase C (PKC) phosphorylates Nedd4-2 ubiquitin ligase, activated Nedd4-2 ubiquitin ligase ubiquitinates and GLT-1 is degraded. This process allows for the control of the dynamic cell surface expression of GLT-1. When there is no glutamate accumulated in the synaptic cleft, GLT-1 undergoes ubiquitination and breaks down, and hence its surface expression is reduced. When glutamate accumulates in the synaptic cavity, the surface expression of GLT-1 increases. Dysfunction of this dynamic process leads to the low level of glutamate in the synaptic cleft causing excitotoxicity and brain diseases. Sirtuins are a class of protein deacetylase enzymes that target various proteins within the cell for posttranslational modifications. They perform not only deacetylation but also posttranslational modifications such as ADP-ribosylation. Sirtuins are known to have roles in neurodegenerative diseases. Sirt4 has been shown in previous studies to inhibit excitotoxicity in glioma cells by modulating glutamate metabolism.

Furthermore, in the absence of Sirt4, GLT-1-linked glutamate uptake was found to be reduced. Our aim in this study is to investigate how Sirt4 controls glutamate metabolism and the functioning of GLT-1 and also to examine and compare it in glia and glioblastoma cells. Therefore, Sirt4 and GLT-1 protein expression levels were studied in IHA (immunized human astrocytes-glia) and U87 (glioblastoma) cell lines. Expression levels of Ubiquitin and Protein kinase C (PKC) proteins involved in the GLT-1 degradation pathway have been demonstrated by the western blot technique. Also, in glia and glioblastoma cells, the level of glutamate accumulated in the medium was measured with the glutamate assay. As a result of the study, ubiquitination was reduced in glioblastoma cells although not statistically significantly and GLT-1 was increased. Sirt4, which has been shown in previous studies to control the level of GLT-1, was found to be increased as expected. The protein level of the PKC protein, on the other hand, was decreased in glioblastoma cells although not statistically significant. Glutamate assay showed that the levels of accumulated glutamate in the medium in glioblastoma cells were reduced compared to glial cells. The reason for this may be that U87 cells, which multiply much more rapidly compared to glia cells, have reduced levels of glutamate released, as they show a higher rate of death in this assay which was conducted without changing the medium. Additionally, since Sirt4 and GLT-1 protein levels were increased in glioblastoma cell line, the accumulated glutamate may have been reduced by the clearance from the medium by GLT-1. The results obtained in this study show that excitotoxicity in glioblastoma can be prevented by modulating the GLT-1 degradation or activation pathway, thus creating new areas of drug and treatment development.

**Keywords:** Excitotoxicity, GLT-1, Glutamate, Glioblastoma, Sirt4

# 1. GİRİŞ

Glioblastoma multiform (GBM), glia hücrelerinden türeyen primer beyin tümörlerinden en sık görülendir. Tümörün büyümesi, glioma hücrelerini çevreleyen nöronların eksitotoksikite yolu ile ölmesiyle gerçekleşir. Eksitotoksikite, sinaptik boşlukta aşırı glutamat birikimi ile oluşur ve epilepsi, felç ve nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer Hastalığı (AH), Parkinson Hastalığı (PH), Huntington Hastalığı (HH), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS)) gibi beyin hastalıkları ile glioblastoma gibi beyin tümörlerinde görülür (Sontheimer, 2008). Glutamat, glutaminden sentezlenen, memeli merkezi sinir sisteminde fazla miktarda bulunan, aminoasit yapısındaki baskın nörotransmitterdir. Hücrede sinaptik nörotransmisyonunda görev alır (Sheldon ve ark, 2008). Kendisini tanıyan reseptörler ile etkileşip onları uyararak memeli beyninde öğrenme, hafıza, hareket ve sinaptik bağlantıların plastisitesinin sağlanması gibi birçok nörolojik fonksiyonda rol oynadığı için hücredeki glutamat seviyesi önemlidir. Hücredeki glutamat seviyesinin önemli olmasının yanında hücre dışı alanda fazla miktarda glutamat bulunması, glutamat aracılı eksitotoksikite ve nöronal hücre ölümüne neden olur. Eksitotoksikite, presinaptik nöronlardan sinaptik boşluğa aşırı glutamat salınımı, glutamat taşıyıcılarının glutamata toplayamaması ve glutamat reseptörlerinin özellikle de NMDA reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonu gibi nedenlere bağlı olarak ortaya çıkar (Küçükaya, 1997; Kurul, 2007; Aydın, 2006; Sontheimer, 2008). Normal bir döngüde glutamaterjik nörondaki glutamin, glutaminaz enzimi yardımı ile glutamata çevrilir. Nöron uyarıldığı zaman ekstraselüler boşluğa glutamat salınımı gerçekleşir. Sinaptik boşluktan glutamatın geri alınımı eksitator amino asit taşıyıcıları (EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4, EAAT5) ile gerçekleşmektedir. Glutamatın büyük çoğunluğu EAAT2 ya da diğer adıyla glutamat transporter-1 (GLT-1) tarafından toplanarak astrositlere alınır. Astrositlere toplanan glutamatın bir kısmı glutamin sentetaz (GS) tarafından glutamine dönüştürülürken, bir kısmı da glutamat dehidrogenaz (GDH) tarafından  $\alpha$ -ketoglutarata çevrilerek TCA döngüsüne katılır ve ATP elde edilir. Glutamin ise glutamin taşıyıcıları yardımı ile glutamaterjik nöronlara gönderilerek döngü sağlanır (Karaca ve ark, 2011). GLT-1'in hücre yüzeyi ve içindeki dinamik ifadesi, GLT-1'in fonksiyonu için oldukça önemlidir. Sinaptik boşlukta glutamat miktarı fazla iken, glutamata toplamak için, GLT-1'in yüzey ifadesi artmakta; sinaptik boşlukta glutamat miktarı azalınca ise GLT-1 hücre içine alınarak degrade edilmekte ve yüzey ekspresyonu azaltılmaktadır. Bu mekanizma ise şu şekildedir; Protein Kinaz C,



Nedd4-2 ligazı fosforile ederek aktive eder. Bu aktivasyon sonucu, Nedd4-2 ligazı yardımı ile GLT-1 ubiquitine olmakta ve daha sonra proteozomlarda degrade olmaktadır (Sheldon ve ark, 2008).

Sirtüinler, deasetilasyon ve ADP-ribozilasyon gibi post translasyonel modifikasyonlar yaparak proteinlerin aktivitesini düzenleyen enzimlerdir (Dang, 2014). SIRT4; memeli hücrelerinde, özellikle mitokondride lokalize olan ve ADP-ribozil transferaz etkinliği gösteren bir sirtuindir (José ve ark, 2012). SIRT4, pankreas beta hücrelerinde insülin sekresyonunun baskılanması, mitokondriyal adenzin trifosfat (ATP) homeostazının ayarlanması, apoptozun, translasyon sonrası modifikasyonların ve redoks tepkimesinin düzenlenmesi olmak üzere çok çeşitli mitokondriyal metabolizma yollarında görev almaktadır (Han ve ark, 2019). Pankreas hücrelerinde, Sirt4'ün ADP-ribozil transferaz aktivitesi ile GDH'nin enzimatik aktivitesi inhibe edilir ve glutamat-glutamin metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynar (Han ve ark, 2019; Haigis ve ark, 2006). Yapılan çalışmalarda, diğer dokulara kıyasla Sirt4'ün, beyin ve karaciğerde yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir (Haigis ve ark, 2006). Ayrıca, önceki çalışmalar, Sirt4'ün yokluğunun glutamat alımını azalttığını (Shih ve ark, 2014), ve Sirt4'ün, glioma hücrelerinde, glutamat metabolizmasını modüle ederek eksitotoksisiteyi engellediğini göstermiştir (Dönmez Yalçın ve Çolak, 2020).

Bu çalışmada amacımız, Sirt4'ün, glutamat metabolizmasını ve GLT-1'in işleyişini nasıl kontrol ettiğini, glia ve glioblastoma hücrelerinde karşılaştırmalı olarak incelemektir. Bu nedenle, IHA (immortalized human astrocytes-glia) ve U87 (glioblastoma) hücre hatlarında SIRT4 ve GLT-1 protein ifade seviyeleri incelenecektir. GLT-1 yıkım yolağında görev alan Ubiquitin ve Protein Kinaz C (PKC) proteinlerinin ekspresyon seviyeleri, western blot tekniği ile araştırılacaktır. Ayrıca, glia ve glioblastoma hücrelerinde, medyumda birikmiş olan glutamat seviyesi glutamat assay ile ölçülecektir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler ile glioblastoma hücrelerindeki eksitotoksitenin moleküler mekanizması ve Sirt4'ün glioblastomadaki rolü aydınlatılmış olacaktır. Ayrıca, bu sonuçlar, glioblastomada eksitotoksitenin, GLT-1 yıkım ya da aktivasyon yolağının modüle edilerek engellenebileceğini, dolayısıyla, yeni ilaç ve tedavi geliştirme alanları oluşabileceğini gösterecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Glioblastoma

Glioblastoma (GBM), glia hücrelerinden türeyen ve primer beyin tümörleri arasında en sık görülen agresif bir malign kanser türüdür (Alagöz, 2018). GBM astrositik tümörler arasında yer almaktadır (Tablo 1). Primer beyin tümörlerinin %20-30'unu oluşturmaktadırlar. Genellikle 45-70 yaş aralığında gözlenmektedir (Mamati, 2006).

**Tablo 1:** Dünya Sağlık Örgütüne Göre Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması. Chandana ve ark, 2008'den adapte edilmiştir.

#### Nöroepitelyal tümörler

##### Astrositik tümörler

- Pilositik astrositoma (Evre I)
- Subependimal büyük hücreli astrositoma (Evre I)
- Diffüz astrositoma (Evre II)
- Pleomorphic xanthoastrositoma (Evre II)
- Anaplastik astrositoma (Evre III)
- Glioblastoma (Evre IV)

##### Oligodendrogial tümörler

- Oligodendroglioma (Evre II)
- Anaplastik oligodendroglioma (Evre III)

##### Oligoastrositik tümörler

- Oligoastrositoma (Evre II)
- Anaplastik oligoastrositoma (Evre III)

##### Ependimal tümörler (Evre I-III)

##### Choroid plexus tümörler (Evre I-III)

##### Diğer nöroepitelyal tümörler

- Anjiogenik glioma (Evre I)
- Üçüncü ventrikülün choroid glioması (Evre II)

#### Nöronal ve miks nöronal-gliyal tümörler (Evre I-III)

- Pineal tümörler (Evre I-IV)
- Embriyonal tümörler (Evre IV)

#### Kranial ve paraspinal sinir tümörleri

- Schwannoma (Evre I)
- Nörofibroma (Evre I)
- Perineuroma (Evre I-III)
- Periferik sinir kılıfı tümörleri (Evre II-IV)

#### Meninks tümörleri

- Menenjioma (Evre I)
- Atipik menenjioma (Evre II)
- Anaplastik menenjioma (Evre III)

#### Lenfoma ve hematopoietik tümörler

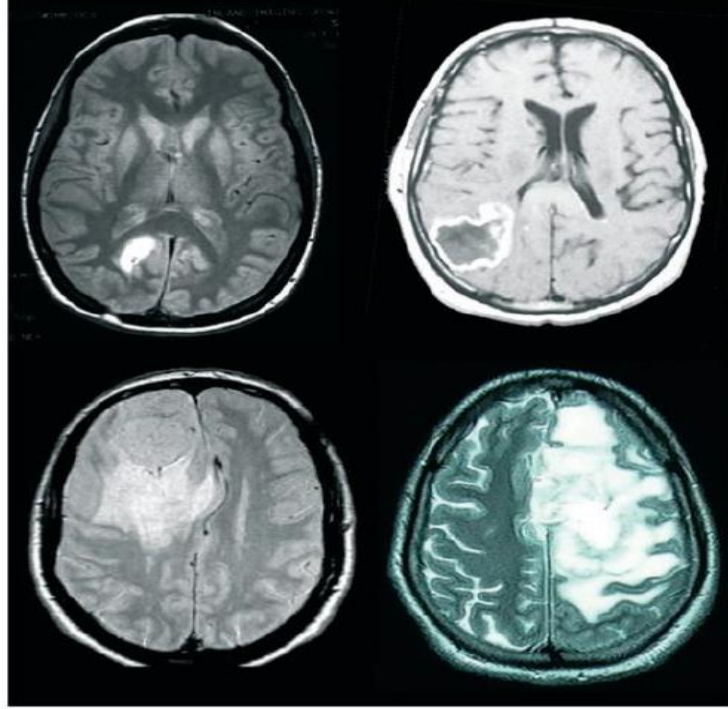
- Malign lenfoma (Düşük ve yüksek evre)
- Plasmacytoma
- Granülocytik sarcoma

#### Diğer tümörler

- Germ hücre tümörleri
- Sella bölgesi tümörleri (Evre I)

## 2.2. Gliomaların Beyin İçerisindeki MR Görüntüsü

Glioma hücrelerini çevreleyen nöronlar, biriken glutamat sonucu oluşan eksitotoksisite nedeni ile hücre ölümüne uğramakta ve tümörün büyümesi için yer açmaktadır (Sontheimer, 2008). Tümör genişledikçe nöronları tahrip etmekte ve karşı loba da geçmektedir. Buna kelebek gliomu adı verilmektedir (Mamati, 2006).



**Şekil 1:** Gliomaların beyin dokusu içerisindeki görüntüsü. Sontheimer, 2008'den adapte edilmiştir.

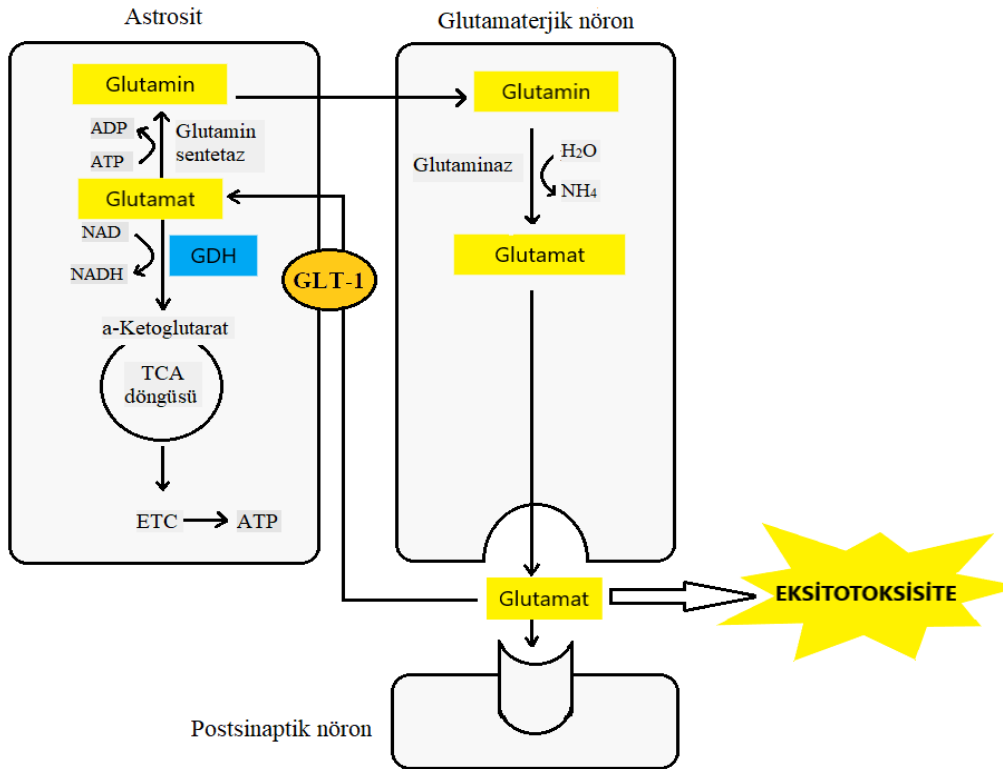
Şekil 1'de dört farklı hastada görülen beyin tümörü, MR (manyetik rezonans görüntüleme) görüntüsü ile gösterilmiştir. Tümörün büyüme sınırlarında, glioma hücreleri, nörotransmitter glutamati beyin dokusuna salgılar ve tümörün genişlemesine neden olur.

## 2.3. Eksitotoksisite

Eksitator amino asitlerin (EAA) ilk ortaya çıkışı, 1957 yılında Lucas ve Newton isimli araştırmacıların rastlantısal gözlemlerine dayanır. Retinal distrofiyi iyileştirmek için, fare retinası üzerinde çeşitli maddeler denerlerken, glutamatın sistemik enjeksiyonunun retinanın

iç sinir katmanlarını zedelediğini gözlemlemişlerdir (Görgülü, 2005; Purves, 2001). 1969 yılında, Olney, bu durumu ‘eksitotoksisite’ olarak adlandırmış ve bu etkinin yalnızca glutamat ve retinal nöronlar ile sınırlı olmadığını, EAA’lerin santral nöronlar üzerinde genel bir etki gösterdiklerini belirtmiştir.

L-Glutamat, merkezi sinir sisteminde (MSS) bulunan başlıca eksitator amino asitlerdendir. Normal koşullar altında, glutamat beyinde; öğrenme, kavrama, hafıza ve hareket gibi farklı işlevlerin yerine getirilmesinden sorumlu olup bu işleri reseptörler ile etkileşerek yapar (Yüksel, 2001). Sinaptik aralığa fazla miktarda glutamat salınması veya glutamat taşıyıcılarının fazla glutamatu toplayamaması sonucu glutamatın birikmesi ile eksitotoksisite gerçekleşir (Soni ve ark, 2014).



**Şekil 2:** Eksitotoksisite şeması. Karaca ve ark, 2011’den modifiye edilmiştir.

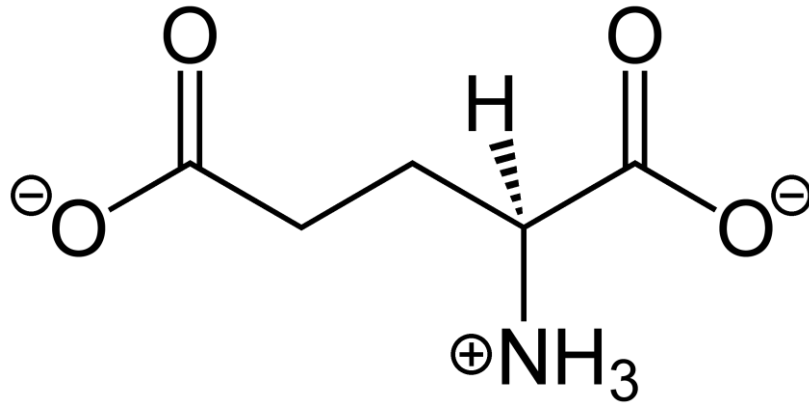
Glutamaterjik nörondaki glutamin, glutaminaz enzimi yardımı ile glutamata çevrilir. Nöronlar uyarıldığı zaman dışarıya glutamat salınımı gerçekleşir. Fazla miktarda glutamat salınımı sonucu, glutamat reseptörlerinin özellikle de NMDA reseptörlerinin uzun süreli aktivasyonuna bağlı olarak, glutamat konsantrasyonundaki aşırı artış eksitotoksisiteye neden olur (Küçükkaya, 1997; Kurul, 2007; Aydın, 2006; Sontheimer, 2008). Sinaptaki glutamat konsantrasyonu, sinaptik aralıktan glutamatu toplayan EAAT’ler ve glutamin sentetaz (GS)

tarafından korunur (Soni ve ark, 2014). Glutamat döngüsünde, GLT-1 tarafından toplanarak astrositlere gönderilen glutamatın bir kısmı, glutamat dehidrogenaz (GDH) ile  $\alpha$ -ketoglutarata çevrilir ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katılarak ATP elde edilir. Ayrıca, bir miktar glutamat ise glutamin sentetaz enzimi yardımı ile glutamine çevrilir, glutamin taşıyıcıları yardımı ile glutamaterjik nöronlara gönderilir ve tekrar döngü sağlanır (Şekil 2) (Karaca, 2011; Görgülü, 2005).

Eksitotoksisite, Alzheimer Hastalığı (AH), Epilepsi, İnme, Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Huntington Hastalığı (HH), Parkinson Hastalığı (PH) gibi nörodejeneratif hastalıklarda görülmektedir (Soni ve ark, 2014).

## 2.4. Glutamat

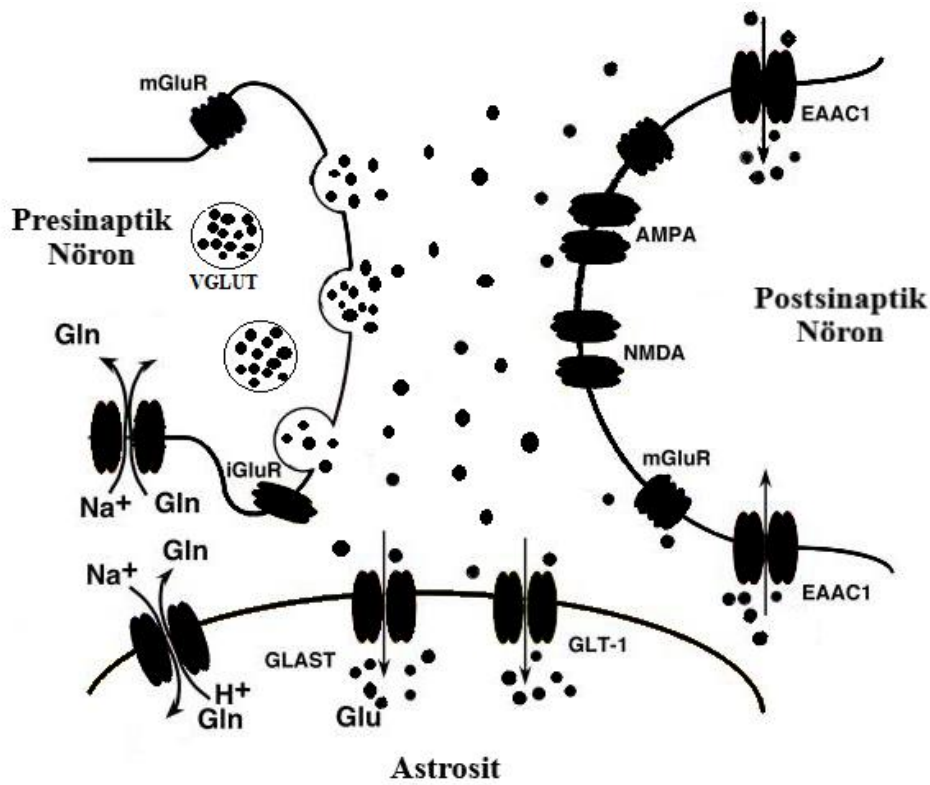
Glutamat, merkezi sinir sistemindeki ana uyarıcı eksitator nörotransmitterdir. Glutamat, esansiyal olmayan bir amino asittir ve glutaminden sentezlenir. Şekil 3’de yapısı gösterilen glutamat; nöronal göçte, hafıza, öğrenme, bilişsel beceri ve etkinlikler gibi fonksiyonlarda rol oynayan ve birçok farklı reaksiyonda hem substrat hem de ürün olarak işlev gören önemli bir nörotransmitterdir (Özdemir, 2016). Sinir terminallerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutamat, çok dinamik ve hassas bir denge içinde bulunmak zorundadır. Glutamat, sürekli olarak presinaptik nöronlardan salınmakta, postsinaptik nöronlar ve astrositler tarafından toplanmaktadır. Eğer ekstraselüler sıvıda, glutamat düşük konsantrasyonlarda olmaz ise glutamatın toksik etkisi ile birlikte aşırı reseptör uyarımı gerçekleşecek, nöronal bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkacaktır (Soni ve ark, 2014).



Şekil 3: Glutamatın yapısı.

### 2.4.1. Glutamat Nörotransmisyonu (İletimi)

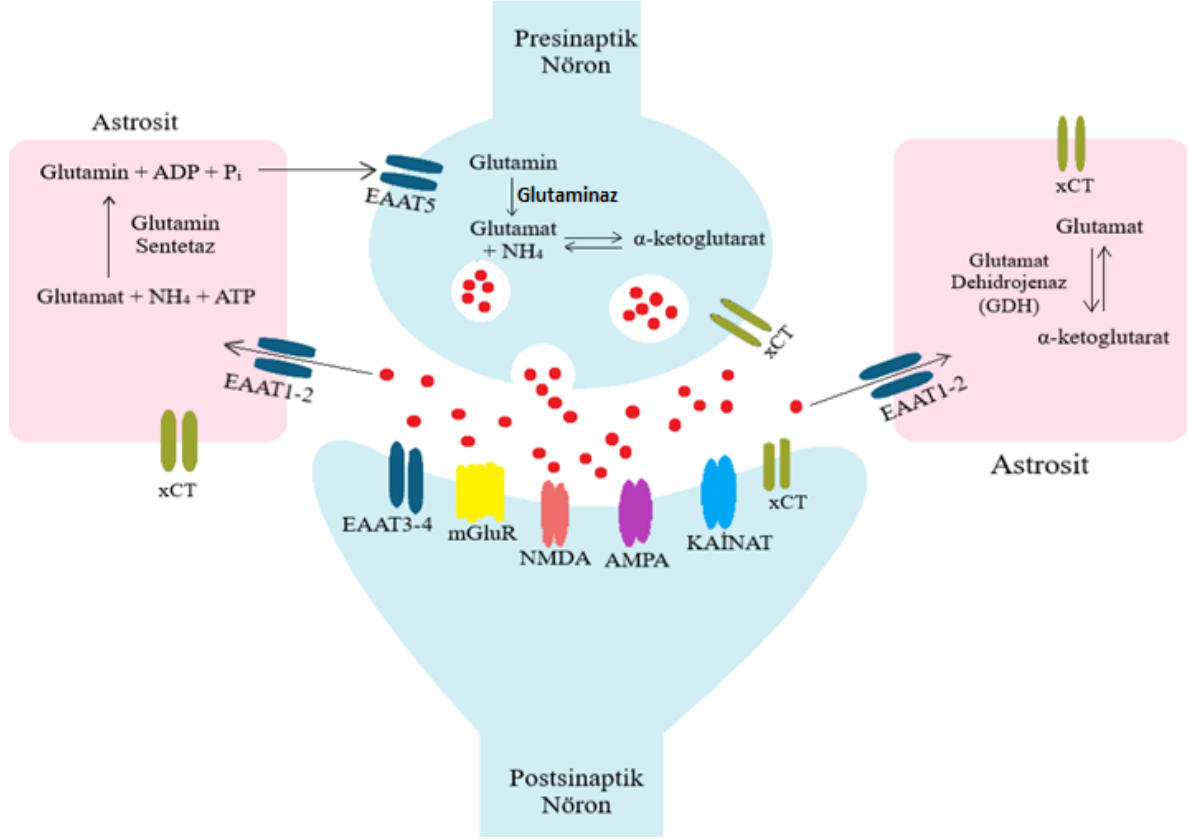
Glutamat, presinaptik nöron terminallerinde, kan beyin bariyerinden geçebilir ve beyin omurilik sıvısında yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Glutamat, presinaptik nöronda bulunan glutaminden glutaminaz enzimi aracılığı ile sentezlenir. Sentezlenen glutamat, vesiküler glutamat taşıyıcı ailesi (VGLUT1-3) tarafından veziküller içerisine alınarak sinaptik aralığa taşınmaktadır (Şekil 4). Glutamat yüklü veziküller, presinaptik membranın yüzeyine bağlanarak vezikül içerisindeki glutamatu sinaptik boşluğa bırakırlar.



**Şekil 4:** Presinaptik nöronda glutamatın VGLUT ile taşınması. Sheldon ve Robinson, 2007'den modifiye edilmiştir.

Sinaptik aralıkta bulunan glutamat, postsinaptik nörondaki ve astrositlerdeki reseptörleri (AMPA ve NMDA) uyarır. Glutamatın etkisi sinaptik aralıkta sonlandığında, postsinaptik nöronlarda, presinaptik nöronlarda ve astrositlerde yerleşmiş olarak bulunan eksitatör aminoasit taşıyıcıları (EAAT) tarafından glutamat toplanır. Glial hücre olan astrositlerce geri alınan glutamat, glutamin ya da  $\alpha$ -ketoglutarat'a dönüştürülür. Glutamine dönüşüm, ATP'ye bağlı ve gliaya özgü enzim olan glutamin sentetaz ile gerçekleştirilir (Gözen, 2008). Glial

glutamin, presinaptik nöronun içine  $\text{Na}^+$  bağımlı glutamin taşıyıcıları ile alınır. Presinaptik nöron içerisine alınan glutamin, glutaminaz enzimi ile glutamata dönüştürülülerek veziküller içerisine paketlenir ve nöronların uyarılması ile sinaptik aralığa salgılanır (Şekil 5).



Şekil 5: Glutamat-Glutamin döngüsü. Kritis ve ark, 2015'den modifiye edilmiştir.

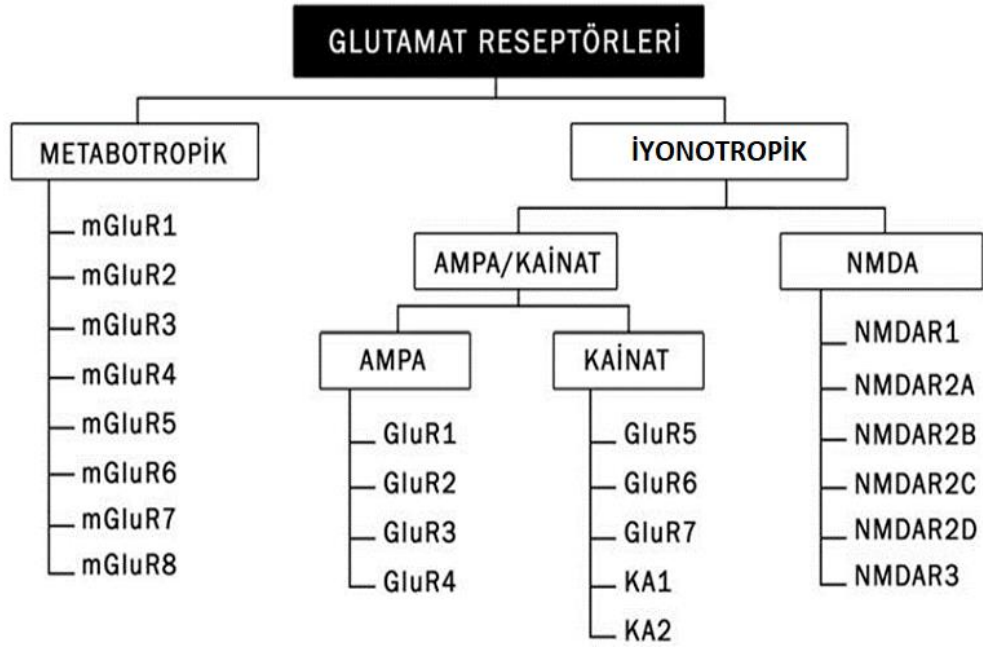
## 2.4.2. Glutamat Reseptörleri

Glutamat reseptörleri, moleküler yapıları, elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerine göre metabotropik ve iyonotropik reseptörler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 6) (Görgülü ve Kırış, 2005).

1) Metabotropik (G protein eşlikli) reseptörler

2) İyonotropik (Ligant kapılı iyon) reseptörler

- a) AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asit)/ kainat reseptörleri
- b) NMDA reseptörleri (N-Metil-D-Aspartat)'dir.



**Şekil 6:** Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması. Gözen, 2009'dan adapte edilmiştir.

#### 2.4.2.1. Metabotropik Reseptörler

Metabotropik reseptörler, bir diğer adı ile mGluRler, G-proteinine bağlı olan reseptör ailesidir. Presinaptik ve postsinaptik membran üzerine yerleşik olarak bulunurlar ve G-proteinler yardımı ile sinyal iletimini sağlarlar. Tablo 2'de gösterildiği gibi metabotropik glutamat reseptörleri; reseptöre bağlanmaları, farmakolojik özellikleri ve amino asit dizilişlerine göre üç farklı gruba ayrılan sekiz farklı mGluR (mGluR1-8) vardır (Çetin, 2014).

**Tablo 2:** Metabotropik glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması. Çetin, 2014'den modifiye edilmiştir.

<b>Grup 1 (Postsinaptik nöronda)</b>	mGlu1	mGlu5		
<b>Grup 2 (Presinaptik nöronda)</b>	mGlu2	mGlu3		
<b>Grup 3 (Postsinaptik ve presinaptik nöronda)</b>	mGlu4	mGlu6	mGlu7	mGlu8

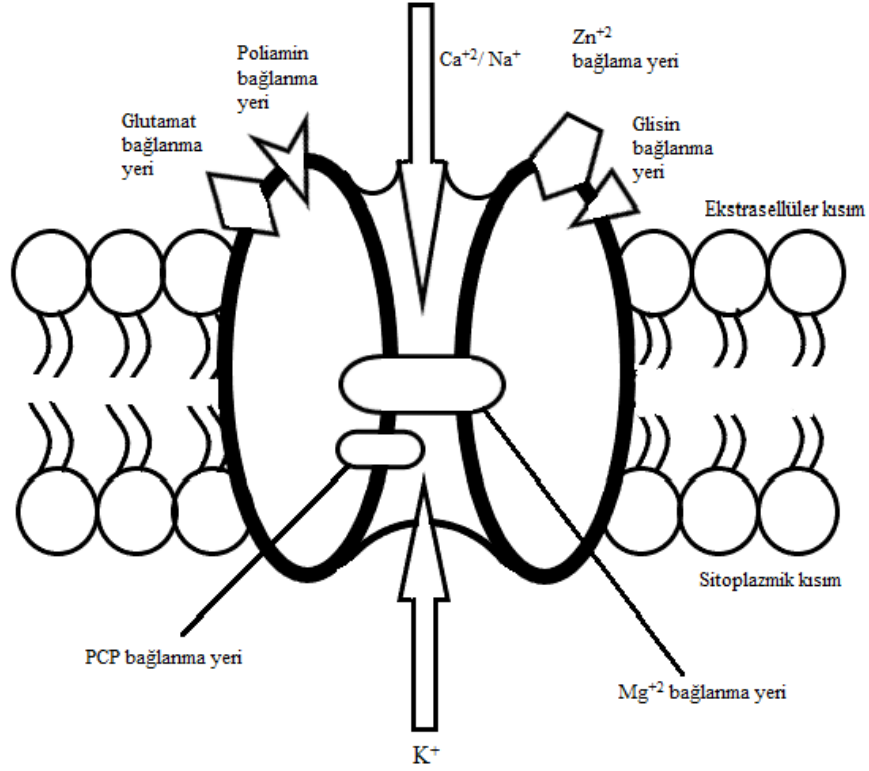


### 2.4.2.2. İyonotropik Reseptörler

İyonotropik reseptörler, AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropiyonik asit)/Kainat ve NMDA reseptörleri olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Bu reseptörler postsinaptik membran üzerinde yerleşik olarak bulunurlar.  $Ca^{+}$ ,  $Na^{+}$  iyonlarının intraselüler ve ekstraselüler sıvılar arasındaki geçişi ile glutamat taşınımına aracılık etmektedirler.

AMPA/Kainat reseptörleri, GluR1-7, KA1-2 alt üniteleri içerirler. Postsinaptik nöronun, glutamat ile uyarılmasını takiben  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+}$  iyonlarının intraselüler ve ekstraselüler sıvılar arasındaki geçişi ile glutamat taşınımına izin verirler (Aydın ve ark, 2006; Görgülü ve Kırış, 2005). Bu reseptörler beyinde; amigdala, bazal ganglionlar, entorhinal korteks ve serebellumda farklı ifade seviyeleri göstermekte ama hipokampusta yüksek oranda ifade edilmektedir (Görgülü ve Kırış, 2005). AMPA reseptörlerinin, glutamata karşı afinitesi düşüktür. Glutamat ile uyarıldıkları zaman reseptörler hızlı bir şekilde açılıp kapanırlar. NMDA reseptörlerinin ise AMPA/Kainat reseptörlerine oran ile glutamata karşı afiniteleri daha yüksektir ve inaktivasyonları daha yavaştır (Gözen, 2008).

NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörleri, merkezi sinir sistemi (MSS)'nde glutamat ile uyarılan ligand kapılı iyon kanalıdır. Şekil 7'de gösterildiği gibi NMDA reseptörleri üzerinde; glisin, glutamat,  $Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  ve poliamin gibi agonistlere özel bağlanma bölgeleri bulundurulur (Kritis ve ark, 2015). Bu bağlanma bölgelerine spesifik maddeler bağlanır,  $Mg^{+2}$  iyonu uzaklaştırılır, NMDA reseptörleri aktif duruma gelir, hücre içi ve dışı arasındaki  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  iyonlarının değişimleri gerçekleştirilerek glutamat hücre içerisine alınır. NMDA reseptörleri;  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  iyonlarına oran ile daha fazla  $Ca^{+2}$  iyonu geçirgenliği olan kanallardır (Tüfekçi ve Tunalı, 2012; Görgülü ve Kırış, 2005). Glutamat taşınması için NMDA reseptörü, bir kalsiyum iyon kanalı kullanırken, AMPA reseptörü bir sodyum iyon kanalı kullanır.



Şekil 7: NMDA reseptörünün yapısı. Atila ve Alagöz, 2010'den modifiye edilmiştir.

### 2.4.3. Glutamat Taşıyıcıları

Beyin hücreleri, glutamati taşıma özelliğine sahip olan proteinler eksprese etmektedirler. Eksprese edilen, glutamat taşıyıcılarının bazıları nöronlar üzerinde bulunurken, bazıları ise glia üzerinde bulunur. Glutamat taşıyıcıları, fazla glutamati sinaptik boşluktan temizleyerek sitrik asit döngüsüne ve tekrar sinaptik boşluğa salınmak üzere ilgili metabolik yolağa aktarırlar. Döngüye katılan glutamat, glutamine ve ATP'ye dönüştürülür (Karaca ve ark, 2011). Glutamin, presinaptik nöronlar tarafından glutamat formuna dönüştürülür ve sinaptik boşluğa salınır. Glutamat taşıyıcıları bu durumdan dolayı nöronlardaki sinaptik terminallerde daha fazla bulunmaktadır.

Şimdiye kadar; EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC-1), EAAT4 ve EAAT5 olmak üzere toplam 5 adet  $\text{Na}^+$  bağımlı ve yüksek afiniteli glutamat taşıyıcısı sınıflandırılmıştır (Tablo 3). Glutamat taşıyıcıları; üç  $\text{Na}^+$  ve bir  $\text{H}^+$  iyonu yanında bir tane glutamati hücre içerisine taşıırken, bir  $\text{K}^+$  iyonu hücre dışına vermektedir (Çetin, 2014).

**Tablo 3:** Bilinen glutamat taşıyıcı alt tipleri ve ekspresyon yerleri. Gözen, 2008'den modifiye edilmiştir.

Glutamat Taşıyıcı	İnsan Homoloğu	Hücre İfade	Anatomik Yeri
GLAST	EAAT1	Astrositlerde	Serebellum, Korteks
GLT-1	EAAT2	Astrositlerde, Nöronlarda	Tüm beyin
EAAC1	EAAT3	Astrositlerde de ifade edilen post-sinaptik nöronal terminaller	Serebellum, Hipokampus,
EAAT4	EAAT4	Astrositlerde de ifade edilen post-sinaptik nöronal terminaller, Purkinje hücre nöronları	Serebellum, Hipokampus, Neokorteks
EAAT5	EAAT5	Fotoreseptörler, Bipolar hücreler	Retina

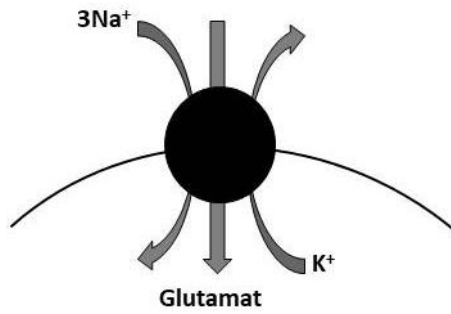
#### 2.4.3.1. GLAST (Glutamat-Aspartat Taşıyıcısı)

GLAST; EAAT1 veya SLC1A3 olarak da adlandırılan astrositlerde bulunan bir glutamat taşıyıcısıdır. İnsanlarda, SLC1A3 (Solute carrier ailesi 1 üye 3) geni tarafından kodlanmakta ve 5. kromozomun kısa kolunun 11-12 ve 13 (5p11-12-13) bölgelerinde lokalize olan bir proteindir. Merkezi sinir sistemi astrositlerinde bulunmaktadır. Anatomik olarak serebellum (beyincik) ve retinadaki başlıca glutamat taşıyıcısıdır (Mitrovic, 1998; Görgülü, 2009; Çetin, 2014).

#### 2.4.3.2. GLT-1 (Glutamat Taşıyıcısı-1)

EAAT2 (eksitator amino asit taşıyıcısı 2), SLC1A2 (Solute carrier ailesi 1 üye 2) geni olarak da bilinen GLT-1, EAAT (eksitator amino asit taşıyıcısı) ailesindedir. 11. kromozomun kısa kolunda (11p12-13) lokalize olarak bulunan SLC1A2 geni tarafından kodlanmaktadır (Robinson ve Jackson, 2016).

Presinaptik nöronun, veziküller aracılığıyla sinaptik boşluğa glutamat salgılanır ve sinaptik boşlukta konsantrasyonu artan glutamat, postsinaptik nöronun bulunan glutamat reseptörlerini uyarır ve nöron içerisine alınır. Sinaptik boşluktaki fazla glutamat GLT-1 (EAAT2) tarafından astrositlere gönderilir ve tekrar glutamat-glutamin döngüsüne katılır. GLT-1 tarafından hücre içerisine glutamat (Glu) taşınması sırasında; üç  $\text{Na}^+$  (sodyum) ve bir  $\text{H}^+$  (hidrojen) iyonunu glutamat ile birlikte hücre içine alır ve bir  $\text{K}^+$  (potasyum) iyonunu hücre dışına verir (Şekil 7) (Sontheimer, 2008; Kanai ve Hediger, 2003). GLT-1 merkezi sinir sistemindeki sinapslarda, uyarıcı nörotransmitter glutamatı, hücre dışı alandan temizleyen ana taşıyıcıdır (Gözen, 2009). Ön beyin glutamat alımının %90'ından GLT-1 sorumludur ve GLT-1 seviyesinin azalmasından ilk olarak hipokampusun CA1 bölgesi etkilenmektedir (Sheldon, 2008). Beyindeki toplam proteinin %1'ini temsil etmektedir (Lehre ve Danbolt, 1998; Rimmele ve Rosenberg, 2016).



**Şekil 8:** GLT-1 tarafından glutamat taşınması ve iyon değişimi. Kanai ve Hediger, 2003'den adapte edilmiştir.

Beyinde, EAAT2 ekspresyonuna bakıldığında homojen bir dağılım söz konusudur ve belli bir beyin bölgesinde lokalize değildir (Kim ve ark, 2011). Özellikle beynin glia hücrelerinde, GLT-1 ekspresyonu beynin diğer hücrelerine göre daha yüksektir (Robinson ve Jackson, 2016). Glutamat taşınımının gerçekleştirildiği yolakta, Protein Kinaz C'nin kendini fosforile ederek aktive eder. Aktive olan PKC, Nedd4-2 ligazı fosforile ederek aktive eder ve aktif hale gelen Nedd4-2 ligazı, GLT-1'i ubiquitinasyona götürür (Sheldon ve ark, 2008; Tardón ve ark, 2012). GLT-1'in disfonksiyonu veya azalmış ekspresyonu sonucu glutamat geri alınımı bozulur ve hücreler arası boşlukta glutamat seviyesi artar. Sinaptik boşlukta glutamat seviyesinin artması, nöronal ölüme neden olur.

İnme, epilepsi gibi durumlarda akut glutamat yükselmesi nöronal yaralanmalara/ölüme neden olurken; kronik hafif glutamat yükselmeleri ise AH, ALS, HH ve PH hastalıklarında

olduğu gibi kronik nöronal hasara neden olmaktadır (Lin ve ark, 2012; Kim ve ark, 2011; Beart ve O'Shea, 2006).  $\beta$ -laktam sınıfı antibiyotik ile tedavi edilen hayvanların beynindeki EAAT2 ekspresyonunda ve glutamat taşıma aktivitesinde artış görülmüştür (Kim ve ark, 2011). Hayvan hastalık modellerinde yapılan bir çalışma, GLT-1 ekspresyonunun nöronal koruma sağladığını göstermiştir (Lin ve ark, 2012).

GLT-1 üzerinde çok sayıda araştırma bulunmaktadır, bunun nedeni ekstraselüler matriksten intraselüler matrikse glutamat taşınımını en fazla gerçekleştiren taşıyıcı olmasıdır (Lin ve ark, 2012; Shih ve ark, 2014).

#### **2.4.3.3. EAAT3 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı-3)**

EAAT3, EAAC1 veya SLC1A1 olarak da adlandırılmaktadır. İnsanlarda 9. kromozomun kısa kolunun 24.2 (9p24.2) konumuna lokalize olarak bulunan, SLC1A1 (Solute carrier ailesi 1 üye 1) geni tarafından kodlanan 64 kDa ağırlığında bir proteindir (Nieoullon ve ark, 2006). Anatomik olarak serebellum ve hipokampusta bulunur (Gözen, 2008). EAAC1'in (EAAT3) rolü tam olarak bilinmemekte birlikte nöronal metabolizmada rol oynadığı hipotezini destekleyen veriler vardır (Holmseth ve ark, 2012; Nieoullon ve ark, 2006).

#### **2.4.3.4. EAAT4 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı-4)**

EAAT4, SLC1A6 olarak da adlandırılmaktadır. İnsanlarda 19. kromozomun üzerine lokalize olarak bulunan ve SLC1A6 (Solute carrier ailesi 1 üye 6) geni tarafından kodlanan bir proteindir. EAAT4 merkezi sinir sisteminde; hipokampus, neokorteks ve ağırlıklı olarak serebellumda eksprese edilir (Kim ve ark, 2011). Glutamat uyarıcı amino asitler için yüksek afiniteye sahiptir (Kim ve ark, 2011).

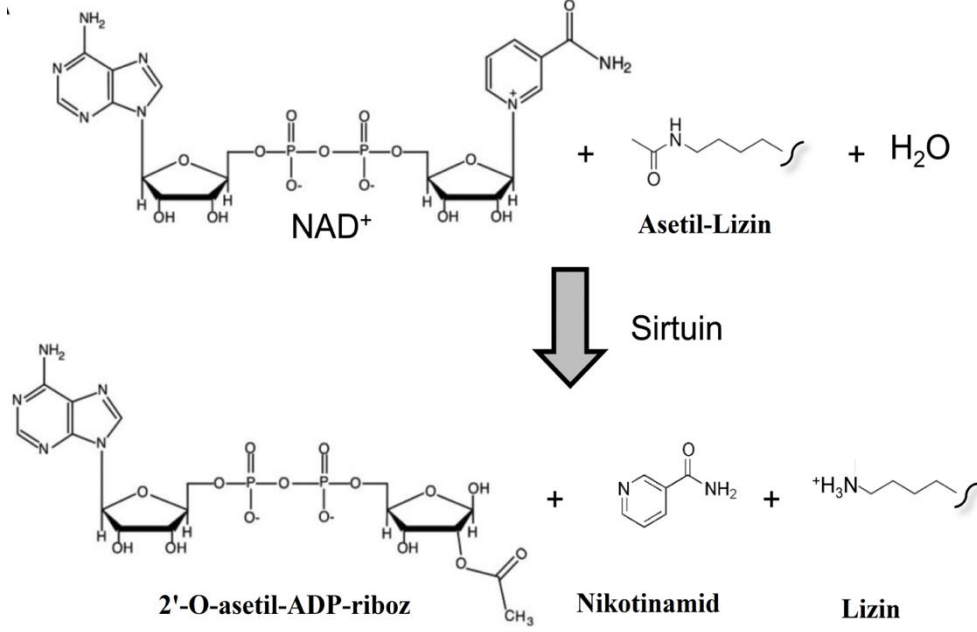
#### **2.4.3.5. EAAT5 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı-5)**

EAAT5, SLC1A7 olarak da bilinmektedir. İnsanlarda 1. kromozom üzerinde lokalize olarak bulunan ve SLC1A7 geni tarafından kodlanan bir proteindir. EAAT5, merkezi sinir sisteminde ağırlıklı olarak retinada eksprese edilmektedir. Fotoreseptör ve bipolar hücrelerde

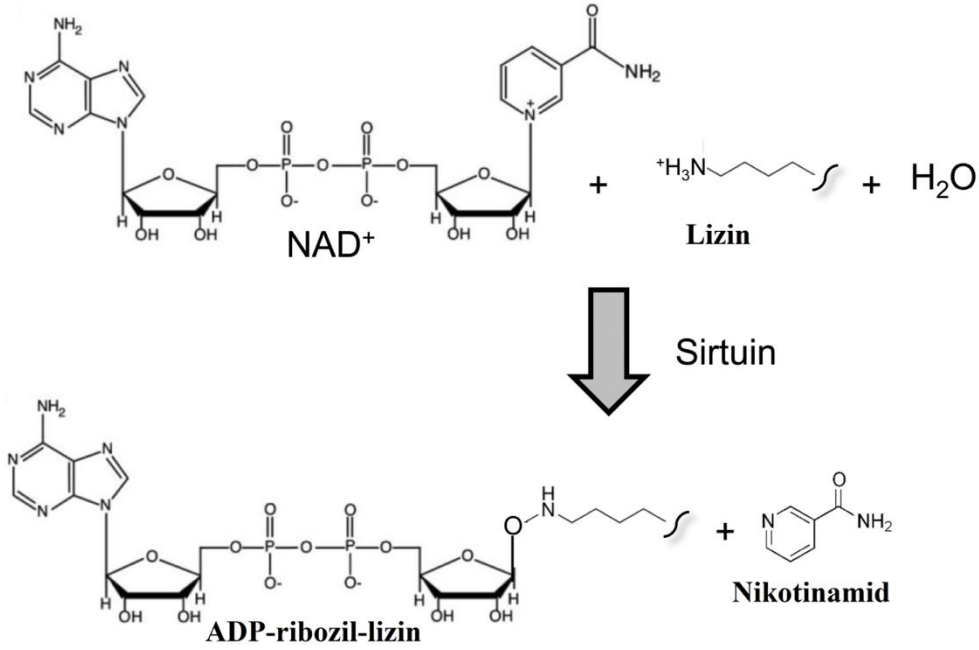
bulunmaktadır (Çetin, 2014; Gözen, 2008). Yüksek Cl iletkenliğine sahiptir (Kim ve ark, 2011).

## 2.5. Sirtuinler

Sirtuinler, sessiz bilgi regülatörü olarak bilinmekte ve hücrenel birçok süreçte rol oynamaktadırlar. Sirtuin (Sirt) ailesi, histon deasetilasyonunu kodlayan Sir2'nin memelilerdeki homologudur (Huang ve Zhu, 2018). İlk keşfedilen sir protein ailesinden Sir2, 1984 yılında *S. Cerevisiae*'de keşfedilmiş ve yapılan çalışmada Sir2 ile yaşam süresi arasında bir bağlantı olduğunu düşünülmüştür (Kaeberlein ve ark, 1999). Sir2 ile ilgili *C. Elegans* ve *D. Melanogaster* üzerinde çalışmalar yapılmış ve yaşam süresindeki artış *C. Elegans*'ta gözlenirken, *D. Melanogaster*'da ise kalori kısıtlaması (CR) ile korele bir şekilde gözlenmiştir (Yalçın, 2018). Bu durum, Sir2'nin *C. Elegans*'ta yaşam süresini uzattığını göstermiş, *D. Melanogaster*'daki rolünü ise tartışmalı hale getirmiştir (Yalçın, 2018). SIRT'ler, hücredeki translasyon sonrasında çeşitli proteinleri çoğunlukla deasetilasyon olmak üzere, ADP-ribozilasyon, malonilasyon, süksinilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar için hedefleyen enzimlerdir (Hirschey ve Zhao, 2015). Hücrenin sitozolünde, çekirdeğinde veya mitokondrisinde bulunan, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD<sup>+</sup>) bağımlı deasetilaz sınıfıdır (Li ve ark, 2018; Shih ve ark, 2014). Sirtuinler, proteinlerin deasetilasyonu sırasında NAD<sup>+</sup>'ı bir kofaktör olarak kullanırlar (Landry ve ark, 2000). Şekil 9'da gösterildiği gibi, sirtuinler, proteinlerin asetil grubunu, ADP-riboz grubuna aktarır ve sonuç olarak proteinler deasetile edilir. Bu reaksiyon sonucunda, nikotinamid ve 2'-O-asetil-ADP-riboz ortaya çıkar. Şekil 10'da gösterildiği gibi, sirtuinlerden bazıları ise ADP-ribozil grubunu lizine ekleyerek, ADP-ribozil transferazlar olarak işlev gösterirler ve bu aktivite sırasında da nikotinamid salınımı gözlenmektedir (Dang, 2014). Sirtuinler ile ilgili yapılan çalışmalarda; yaşam süresini düzenlediği, genomik stabiliteyi koruduğu ve yaşa bağlı hastalıkları etkilediği de gösterilmiştir (Dönmez ve ark, 2010; Kaeberlein ve ark, 1999).



**Şekil 9:** Sirtuinlerin deasetilasyon aktivitesi. Dang 2014'den adapte edilmiştir.



**Şekil 10:** Sirtuinlerin ADP-ribozil transferaz aktivitesi. Dang, 2014'den adapte edilmiştir.

Memelilerde, hücrelerinde farklı lokalizasyonları ve görevleri bulunan yedi tane Sir2 homologu bulunmaktadır (Sirt1-7) (Tablo 4) (Yalçın, 2018). Sirt1 genel olarak nükleus içerisinde yer almasına rağmen sitoplazmada da bulunmaktadır (Lee ve ark, 2019). Sirt6 ve Sirt7'ye nükleusta rastlanır. Sirt2 sitoplazmada yer almasına rağmen bazen nükleusta da

görülmektedir (José ve ark, 2012). Sirt3, Sirt4 ve Sirt5 ise mitokondriyal sirtuinlerdir (Bayram ve ark, 2013).

Sirtuinlerin doku ekspresyonları, hücre lokalizasyonları, hedefleri ve fonksiyonları farklılık göstermektedir (Tablo 4). Sir2 proteinleri içerisinde, Sirt1 üzerinde en fazla araştırma yapılan memeli sirtuinidir. Ayrıca, hipokampus, beyincik ve hipotalamusta ifadesi yüksektir. Sirt1, p53, p73, E2F ve Ku70 gibi proteinleri hedefleyerek apoptozda rol oynar. Sirt1, p53'ü lizin amino asitlerinden deasetilize ederek transkripsiyonel etkinliğini azaltır, oksidatif strese ve DNA hasarına karşı apoptozu baskılar (Bayram ve ark, 2013). FOXO transkripsiyon faktörleri, Sirt1 asetilasyonu ile düzenlenmektedir. Sirt1, ayrıca, p53, FOXO ve NF-κB gibi çoklu transkripsiyonel regülatörleri hedeflediği için mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesinde de önemlidir ve nörodejeneratif hastalıklar (AH, PH, HH, ALS) üzerinde koruyucu etkiye sahiptir (Yalçın, 2018).

Sirt2, tubulini, FOXO1 ve FOXO3'ü deasetile eden ve genellikle sitoplazmada lokalize olan bir proteindir. Sirt2, FOXO transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek, hücre döngüsünü kontrol eder. İnsan meme kanseri ve hepatosellüler karsinom dokularında, Sirt2 eksikliğine bağlı tümör gelişir. Sirt2'nin, glioma olarak adlandırılan beyin tümörlerini baskıladığı düşünülmektedir (José ve ark, 2012).

Sirt3, enerji üretimi ve metabolizmadan sorumlu organel olan mitokondriye lokalize olarak bulunur. Güçlü bir deasetilaz aktivitesine sahiptir. Sirt3'ün azalması veya tükenmesi sonucunda, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesinde artış gözlenirken, SOD seviyesinde azalma gözlenir ve tümör oluşumu gerçekleşir (Ansari ve ark, 2017). Sirt3, metabolizmayı korumak için FOXO3 ile etkileşime girerek ROS seviyesini azalttığı için yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar (AH, ALS, HH) ve stres direncinde de görev almaktadır. Sirt3, Asetil-CoA dehidrogenazın deasetile edilmesini sağladığı için yağ asidi oksidasyonunda da rol oynamaktadır. (Kincaid ve Wetzal, 2013)

Sirt5, mitokondri üzerinde lokalize olan, zayıf bir deasetilaz aktivitesine sahip proteindir. Sitokrom c'yi deasetile etmekte ve apoptozun yapısına katılabilmektedir (José ve ark, 2012). Ayrıca, üre döngüsünde görev alan karbamoil fosfat sentetaz (CPS1)'i deasetile etmek için hedef alır (Verdin ve ark, 2010). CPS1'in malonil veya süksinil gruplarını çıkararak aktive eder (Dang, 2014).

Sirt6, nukleusa lokalize olarak bulunmaktadır. Genom stabilitesinin korunması için histon H3'ü deasetilasyona uğratır. DNA tamirinde ve oksidatif strese cevapta genomik stabilitenin korunmasında önemli bir rol oynar (José ve ark, 2012). Sirt6'nın susturulmuş



olduğu fare modellerinde, Base Excision Repair (BER) mekanizmasında bozulma gözlemlenmiştir (Mostoslavsky ve ark, 2006).

Sirt7, nukleusta bulunur ve rRNA genleri ile ilişkilidir. RNA polimeraz I ve II'ye bağlı transkripsiyonel işlemlerde çeşitli faktörlerle etkileşime girerek rRNA transkripsiyonunu düzenler (José ve ark, 2012). Sirt7, p53'ü aktive ederek tümör oluşumunu da engellemiş olur (Bayram ve ark, 2013).

**Tablo 4:** Farklı sirtuinlerin enzim aktivitesi, substrat/hedefleri ve fonksiyonları. José ve ark, 2012'den modifiye edilmiştir.

Sirtuin	Hücre Lokalizasyonu	Enzim Aktivitesi	Substratlar/Hedefler	Fonksiyon
<b>SIRT1</b>	Sitoplazma Nukleus	NAD <sup>+</sup> bağımlı deasetilaz	H1, H3, H4, E2F, p53, p73, FOXO ailesi, Ku70, p300, NF-κB, PGC-1α, PPAR- γ, UCP2 Asetil-CoA sentetaz 1	Hücre sağkalımı, yaşam boyu regülasyon, inflamasyon, metabolizma regülasyonu, oksidatif stres yanıtı
<b>SIRT2</b>	Sitoplazma Nukleus	NAD <sup>+</sup> bağımlı deasetilaz	α-tubulin, FOXO	Hücre döngüsü kontrolü
<b>SIRT3</b>	Mitokondri	NAD <sup>+</sup> bağımlı deasetilaz	Asetil-CoA sentetaz 2 İzositrat dehidrojenaz 2 Ku70, FOXO3a, Mitokondriyal ribozomal protein L10	Mitokondriyal proteinlerin deasetilasyonu ve yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesi
<b>SIRT4</b>	Mitokondri	ADP-Ribozil transferaz	Glutamat dehidrojenaz (GDH)	Mitokondriyal metabolizmanın düzenlenmesi
<b>SIRT5</b>	Mitokondri	NAD <sup>+</sup> bağımlı deasetilaz	Sitokrom c Karbamoil fosfat Sentetaz I	Apoptoz
<b>SIRT6</b>	Nukleus	NAD <sup>+</sup> bağımlı deasetilaz, ADP-Ribozil transferaz	Histon H3 TNF-α PARR1	Genom stabilitesi, DNA onarımı
<b>SIRT7</b>	Nukleus	NAD <sup>+</sup> bağımlı deasetilaz	RNA polimeraz I P53	rRNA transkripsiyonun düzenlenmesi

### 2.5.1. Sirt4

Sirt4, memeli hücrelerinde mitokondri üzerinde lokalize olan ve ADP-Ribozil transferaz etkinliği gösteren bir sirtuindir (José ve ark, 2012). Sirt4 ile yapılan çalışmalarda diğer dokulara kıyasla beyin ve karaciğerde yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir (Haigis ve ark, 2006). Sirt4, pankreas beta hücrelerinde insülin sekresyonunun baskılanması, mitokondriyal adenozin trifosfat (ATP) homeostazının ayarlanması, apoptozun düzenlenmesi, translasyon sonrası modifikasyonların gerçekleşmesi ve redoks tepkimesinin düzenlenmesi gibi süreçlerde rol oynamaktadır (Han ve ark, 2019).

Sirt4'ün ilk olarak keşfedilen substratı glutamat dehidrojenaz (GDH)'dır. GDH, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde, glutamata  $\alpha$ -ketoglutamata dönüştürür ve döngü sonucunda ATP seviyesindeki artış insülin sekresyonunu destekleyerek  $K^+$  kanallarının kapanmasına,  $Ca^{+2}$  kanallarının ise açılmasına yol açar. Bu yolaktaki GDH'nin enzimatik aktivitesi, Sirt4'ün ADP-ribosilasyonu ile inhibe edilebilir. Sirt4, pankreastaki GDH'ı inhibe ederek glutamat metabolizmasının kontrolünde görev alır ve ADP-ribosilaz aktivitesi ile insülin sekresyonunu düzenler (Han ve ark, 2019; Haigis ve ark, 2006). Yakın bir zamanda, A172 glioblastoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada, Sirt4'ün, GLT-1 ile GDH ekspresyonlarını artırırken GS'yi inhibe ettiği ve eksitotoksisteye engel olarak glutamat metabolizmasını düzenlediği gösterilmiştir (Dönmez Yalçın ve Çolak, 2020). Sirt4 ile ilgili fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, Sirt4 kaybının beyinde glutamat taşıyıcı ekspresyon ve işlevinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Shih ve ark, 2014).

Hücrede görülen DNA hasarına karşılık olarak hücre döngüsü durdurulur ve genomik bütünlüğün sağlanması için DNA hasarı tepki mekanizması (DDR) aktive edilir. DDR'deki bozukluklar hücrede, DNA hasarı birikmesine ve hücre ölümüne teşvik edebilmektedir. Hücredeki DNA hasarı sonrasında, Sirt4 indüklenir ve glutamin metabolizması inhibe edilir (Jeong ve ark, 2013). Sirt4, DNA hasarı ve glutamin metabolizmasındaki rolü nedeni ile tümör hücrelerinde de kritik bir öneme sahiptir. Kanser hücresi, glikoz yokluğunda, yaşamını devam ettirebilmek için, mitokondri içerisinde glutamin katabolizması ile TCA döngüsünü devam ettirerek enerji üretir. Sirt4'ün aşırı ekspresyonu, tümör oluşumunu ve hücrelerinin proliferasyonunu baskılamaktadır (Jeong ve ark, 2013; Min ve ark, 2019). Mide kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada, Sirt4'ün aşırı ekspresyonu, bu hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmiştir (Hu ve ark, 2019). Mide, mesane, meme, küçük hücreli akciğer kanseri ve lösemi gibi insan kanserlerinde de Sirt4 mRNA (mesajcı RNA) seviyelerinde azalma görülmesi, Sirt4'ün insan kanserleri üzerinde tümör baskılayıcı rolünün olma olasılığını

göstermiştir. Ayrıca Sirt4 eksikliği olan fareler kendiliğinden akciğer, meme, karaciğer kanseri geliştirirken, Sirt4 kaybı ile yaşa bağlı tümör insidansında artış görülmektedir (Jeong ve ark, 2013; Huang ve ark, 2018).

Sirt4, lipit homeostazının düzenlenmesinde yağ asidi oksidasyonu (FAO) ve yağ asidi sentezini düzenleyerek görev almaktadır. Malonil-CoA, yağ asidi sentezinde yağ asitlerinin bağlanma birimi olarak görev aldığı için yağ oksidasyonu ve yağ sentezi dengesinin düzenlenmesinde önemlidir. Bu düzenleme için Sirt4; malonil-CoA'yı, malonil-CoA dekarboksilaz (MCD) enzimi ile deasetile ederek asetil-CoA'ya çevirir ve asetil-CoA karboksilaz (ACC) enzimi ise asetil-CoA'yı malonil-CoA'ya çevirerek yağ asidi sentezi ve oksidasyonunda görev alır. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar, Sirt4'ün, yağ asidi oksidasyonunu bastırdığını, lipogenezi teşvik ettiğini ve lipit homeostazının düzenlenmesinde görev aldığını göstermiştir (Laurent ve ark, 2013). Malonil-CoA seviyesi organizmanın beslenme durumu ile bağlantılıdır. Açlık durumunda malonil-CoA seviyesi azalır, yağ asitleri oksidasyona uğrattır. Beslenme bolluğunda ise malonil-CoA seviyesi artar, yağ asitlerinin oksidasyonu azalır. Sirt4, MCD'yi baskılar ve lipit homeostazını düzenler (Laurent ve ark, 2013; Ho ve ark, 2013).

Sirt4; hücrede mitokondriyal ATP homeostazının düzenlenmesini, Sirt4-ANT2 (adenin nükleotid translokator 2) etkileşimi ile sağlar. Sirt4-ANT2 etkileşimi sonucunda, ATP seviyesi artar, mitokondriden sitoplazmaya doğru bir geçiş olur. Hücresel enerji kaynağı olarak görev yapan AMPK (adenin monofosfat ile aktive olan protein kinaz), AMP (adenin monofosfat) ile aktive edilir. Aktive olan AMPK, ACC'nin fosforile olmasını sağlayarak malonil-CoA seviyesinin düşmesine neden olmaktadır. Buna bağlı olarak malonil-CoA'nın inhibe ettiği, karnitin palmitoiltransferaz 1 (CPT1) enzimi yardımı ile yağ asitleri mitokondride oksidasyona uğrar. Ayrıca, Sirt4 ekspresyonuna bağlı ATP artışı, AMPK aktivitesini düşürür, nükleus içerisinde peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (PGC1 $\alpha$ ) genlerinin ekspresyonunu düzenler (Ho ve ark, 2013). Prosese bağlı olarak, Sirt4 ekspresyon seviyesi ile ATP seviyesi korelasyon gösterir.

## **2.6. Post-Translasyonel Modifikasyonlar**

Translasyondan sonra eksprese edilen proteinler, post-translasyonel modifikasyona (PTM) uğrayarak aktivitesi ve hücresel lokalizasyonu düzenlenir. Proteinler, PTM sırasında kimyasal olarak değişikliğe uğrarlar, yeni özellikler ve metabolizmada yeni işlevler kazanırlar

(Peterson ve ark, 2019; Yalçın, 2012.) Bu değişikler; fonksiyonel grup eklenen değişiklikler, başka protein ya da peptitlerin eklendiği değişiklikler, amino asitlerin kimyasal yapısının değişiklikleri, yapısal değişikliklerdir.

Fonksiyonel grup eklenen değişikler; proteinin enzimatik aktivitesini, hücre içi lokalizasyonunu, diğer proteinler ile olan bağlantısını etkileyerek proteinlerin fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu grup içerisinde yer alan en önemli değişiklikler fosforilasyon, asetilasyon, glikozilasyon, prenilasyon ve açilasyondur (Yalçın, 2012).

GLT-1’de olan değişiklikler, başka protein ya da peptitlerin eklendiği değişiklikler grubuna girmektedir. Bu grup kendi içerisinde dörde ayrılır. Bunlar; ISG15 (Interferon-stimulated gene 15) proteininin kovalent bağlanması], Sumolasyon [SUMO (Small Ubiquitin Related MOdifier) proteininin kovalent bağlanması], Ubikitinasyon [Ubiquitin proteininin kovalent bağlanması] ve Neddyasyon [NEDD8 ubiquitin benzeri proteinin eklenmesi]’dur.

Amino asitlerin kimyasal yapısının değişimleri; arjinin gruplarının sitruline dönüşümü sonucu gerçekleşen sitrulinleşme ve glutaminin glutamik asite veya asparjinin aspartik asite dönüşümü sonucu gerçekleşen deaminasyondur.

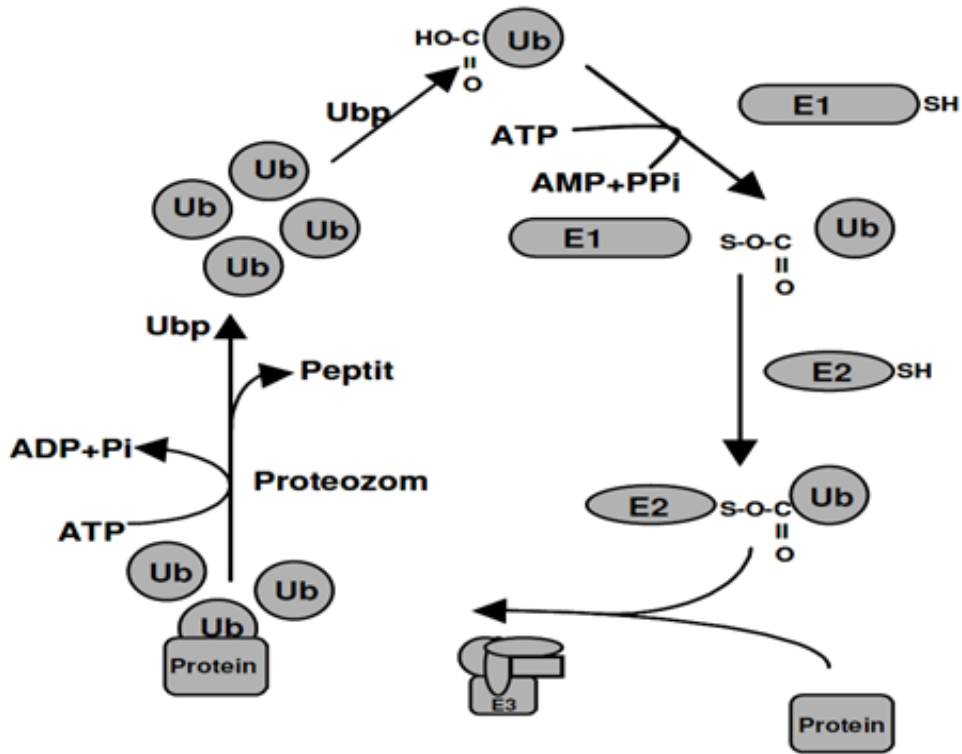
Yapısal değişimler; iki sistein amino asitinin birbirine kovalent bağlanması sonucu oluşan disülfür köprüleri ve proteinin bir peptit bağından kesilmesi sonucu oluşan proteolitik kesmedir.

Bizim bu proje kapsamında araştırmış olduğumuz GLT-1 (EAAT2), post-translasyonel modifikasyonlardan ubikitinasyona uğramakta, hücrenel aktivitesi ve lokalizasyonu düzenlenmektedir (Peterson ve ark, 2019).

### **2.6.1. Ubikitinasyon**

Ubikitinasyon posttranslasyonel bir modifikasyondur. Ubikitinasyon iki aşamalı bir sistem olup ubiquitin proteozom sistemi (UPS) olarak adlandırılır. İlk sistem; hedef proteinin lizin amino asidinin Ubiquitin (Ub) ile işaretlendiği ve degradasyona götürüldüğü ubiquitinasyon sistemidir (Şen ve ark, 2017). Ubiquitin, hedef proteini işaretleterek degradasyona götüren 76 amino asitlik regülatör peptittir. İkinci sistem; işaretli olarak iletilen hedef proteinin proteozom kompleksinde degradasyona uğradığı sistemdir. Şekil 11’deki UPS sisteminde görüldüğü gibi, Ubiquitin’in hedef proteine bağlanması üç aşamalı bir

reaksiyondur. Bu reaksiyonda; Ubiquitin aktive edici enzim (E1), Ubiquitin bağlayıcı enzim (E2) ve Ubiquitin ligaz enzimi (E3) görev almaktadır (Varshavsky, 2006). İlk olarak Ubiquitin'in C-terminalinde bulunan lizin amino asiti, E1 enzimi tarafından uyarılır ve bir ATP harcanarak AMP + PPI ortaya çıkar. Lizin amino asiti, sistein amino asitine bağlanır. Daha sonra aktif hale gelen ubiquitin, E2 enziminin sistein amino asitine transfer olur. Son basamakta, substrata özgü E3 enzimi, hedef proteinin lizin amino asidine transfer işlemini gerçekleştirir. Proteozoma aktarılan hedef proteinin yıkımının düzenlenmesinde, Ubiquitin peptitlerini çıkararak ubiquitinasyonu tersine çevirebilen deubiquitin edici enzimler (DUB) görev alır (Jansen ve ark, 2014). DUB'lar mevcut zincirin düzenlenmesinde ve Ubiquitin zincirinin substrattan uzaklaştırılmasında görev alır (Atkin ve Paulson, 2014). Hedef protein, proteozomlarda, ubiquitin bağımlı proteaz (Ubp) tarafından bir ATP harcanarak yıkılır ve Ubiquitin açığa çıkar. Ubiquitin proteazom sistemi (UPS), geri dönüşümlü bir sistemdir ve yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonu, hücre canlılığı, hücre içi homeostazın düzenlenmesinde görev alır (Ciechanover ve ark, 2004). Ubiquitine olmuş proteinlerin birikmesi ALS, AH, PH, HH gibi nörodejeneratif hastalıklarda görülür ve bu hastalıkların ayırt edici bir özelliğidir (Jansen ve ark, 2014).



**Şekil 11:** Ubiquitin proteozom sistemi. Güney ve ark, 2002'den adapte edilmiştir.

### 2.6.1.1. GLT'in Ubiquitasyonu

GLT-1 merkezi sinir sistemindeki ana glutamat taşıyıcısıdır ve GLT-1 konsantrasyonu nörodejeneratif hastalıklarda azalır (Sheldon ve ark, 2007). Glutamat taşınımının gerçekleştirildiği yolda GLT-1, Protein Kinaz C (PKC) aktivasyonu sonucu ubiquitine olmakta ve degrade olmaktadır (Sheldon ve ark, 2008). PKC, kendisi fosforilasyona uğrayarak aktive olmaktadır (Wang ve ark, 2016). Translasyon sonrası, PKC'nin bu modifikasyonlar dizisi, hücrelerdeki PKC proteinlerinin seviyesinin düzenlenmesi için önemli bir moleküler mekanizmadır (Wang ve ark, 2016). PKC, HECT ailesinin bir üyesi olan Nedd4-2'yi (E3 ligaz) fosforile ederek aktif duruma getirmektedir. Aktif duruma geçen Nedd4-2, GLT-1'e Ubiquitin eklemekte ve GLT-1 proteozomlar tarafından degrade edilmektedir (Tardón ve ark, 2012). Bu sisteme bağlı olarak, GLT-1 seviyesi azalmaktadır ve bu mekanizma nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilidir. GLT-1'in amino ve karboksil bölgelerindeki lizin amino asitlerinin arjinine mutasyonu gerçekleştirilerek, GLT-1'in ubiquitinasyon mekanizması aydınlatılmıştır (Sheldon ve ark, 2008; Susarla ve ark, 2008). Bu proses, GLT-1'in hücre yüzeyi ekspresyonunun dinamik olarak değişimini ve kontrol edilmesini sağlamaktadır. Sinaptik boşlukta glutamat seviyesi arttığında, hücre yüzeyinde GLT-1 seviyesi artar. Sinaptik boşlukta glutamat seviyesi azaldığında ise hücre yüzeyinde, GLT-1, yukarıda anlatılan mekanizma ile degrade edilir.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışma sırasında; sıvı azot tankı (-196°C), invert mikroskop (Olympos CK40), -80°C buz dolabı (Nuair), -20 dondurucu (Samsung), buz dolabı (Samsung), sıcak su banyosu (Mammert), inkübatör (Nuair), buz makinesi (Uğur buzaL60), hassas terazi (Scaltec SBC31), santrifüj (Hettich zentrifugen), otoklav (Hirayama), hücre sayım cihazı (Invitrogen countess<sup>TM</sup>), ısı bloğu (Lab companion), spektrofotometre (Thermo fisher scientific), masa üstü santrifüj (Hettich zentrifugen mikko20), soğutmalı santrifüj (Eppendorf centrifuge 5415 R), vorteks (İsolab), hücre kültür kabini (Logic<sup>+</sup> purifier biosafety cabinet), distile su cihazı (Nüve), çalkalayıcı (IKA<sup>®</sup> KS 130), pH metre (Mettler toledo), western blot seti (yürütme, transfer tankı, güç kaynağı, Biorad), UV görüntüleme cihazı (G:BOX SYNGENE), otoklav kullanılmıştır.

#### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma kapsamında; IHA (immortalized human astrocytes) hücresi, U87 hücre hattı (ATCC'den), DMEM High Glucose with L-Glutamine (DMEM, 500 ml, Capricorn), Fetal Bovine Serum (FBS, 500 ml, Capricorn), L-Glutamine Solution (200 mM, 100 ml, Capricorn), Penisilin/Streptomisin (100x, 100 ml, Capricorn), Sodyum pirüvat (Capricorn), 50 ml'lik steril falkon (Axygen), Tek kullanımlık steril pipet (10 ml, Costar), Tek kullanımlık steril pipet (5 ml, Biologix), 10 cm<sup>2</sup>'lik petri kabı (SPL Life Sciences), Etanol (Merck Millipore Emsure), Pastör pipeti (VWR), Dulbecco's PBS (Fosfat tamponlu salin) (1x, Capricorn), Tripsin-EDTA (0,05%, Capricorn), Dimetil Sülfoksit (DMSO, Merck), 15 ml'lik falkon tüpü (Axygen), Şırınga filtresi (İsolab), 10 ml şırınga (BD-Luer-Lok<sup>TM</sup> Tip), Mikro santrifüj tüpü (Tarsons), Hücre sayım slaytı (Countess<sup>TM</sup>), Trypan blue (Sigma-T6146), 96 well plate (Biologix), RIPA Lizis Tamponu (VWR), Proteaz ve fosfataz inhibitörü (1 ml, 100x, MedChem Express), 1 ml'lik steril enjektör (Beybi), Protein Quantitation Kiti (Reagent

+ BSA Standart ) (Bradford testi, Biosciences), Tris Hidrokrolid (Sigma), Sodyum Klorür (Merck Millipore Emsure), Tween 20 (Sigma), Tris Base (Tris(hidroksimetil)aminometan) (1000g, Nzytech), Glisin (1000g, Nzytech), Metanol (LiChrosolv® Merck Millipore), SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (BioShop), Yağsız süt tozu (Pınar), β-Merkaptoetanol (250 ml, Merck Millipore), Tris (Sigma), Ponceau S (Sigma), SDS-Page for Loading Dye (5x-1ml, Nzytech), Hazır jel (Biorad), Filtre kağıdı (Whatman®), Membran (PVDF) (Whatman®), Marker (GeneDirex-BLUeye Prestained Protein Ladder), SIRT4 antikoru (Elabscience), PKC antikoru (Bioassay Technology Laboratory), Ubiquitin (Bioassay Technology Laboratory), GAPDH (Bioassay Technology Laboratory), GLT-1 (Elabscience), Goat-Anti Rabbit IgG-HRP 2. Antikor (Elabscience), ECL (Novex® Chemiluminescent Substrat - İnvitrogen) kullanıldı.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Hücre Kültürü Uygulamaları**

#### **3.2.1.1. Medyum Hazırlama**

500 ml medyum (besiyeri) hazırlamak için;

%1 Penisilin/Streptomisin, %10 FBS, %1 Sodyum Piruvat ve %3 L-Glutamin miktarı kadar non-complete medyum (DMEM) ana stoktan çıkartıldı. Ana stoktan çıkartılan non-complete medyum (DMEM) 50 ml'lik falkon tüplerinin içerisine koyuldu. Ana stok içerisine hesaplanan miktarlarda 5 ml Penisilin/Streptomisin, 50 ml FBS, 5 ml Sodyum Piruvat ve 15 ml L-Glutamin koyuldu.

#### **3.2.1.2. Hücre Çözme**

Önceden ATCC tarafından kuru buz içerisinde gelen U87 hücre hattı ve İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü (İBG)'den temin edilen IHA hattının, sıvı azottan çıkarılarak kültür ortamına ve hücre kültürüne uygun bir şekilde çalışılmasını içeren bir basamaktır.

Su banyosu önceden ısıtılarak 37°C'ye getirildi ve serum bulunduran besiyerinin 37°C'lik su banyosunda ısınması sağlandı. -196°C'lik sıvı azottan çıkarılan hücreler, hızlı bir



şekilde, su banyosunda, hücrelerin bulunduğu tüpün kapağı suya değmeyecek şekilde çözdürüldü. Hücrelerin bulunduğu tüpler, %70'lik etil alkol ile steril edilerek kültür kabinine alındı. IHA ve U87 hücre hattı için 9 ml DMEM besiyeri (serumlu), 10 cm<sup>2</sup> lik petri kabı içerisine koyularak üzerine çözdürülen hücre hattı (1 ml) eklendi ve petri kabı yavaş bir şekilde yukarı-aşağı; sağa-sola olacak şekilde hareket ettirilerek hücrelerin petri kabı içerisinde eşit dağılması sağlandı. Petri kabının içerisine eşit dağılıp dağılmadığı invert mikroskop ile kontrol edilen hücreler, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> bulunan inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin, petri kabının yüzeyine tutunması için 24 saat inkübatörde bırakıldı. 24 saat bekleyen hücreler, petri kabının yüzeyine tutunduktan sonra, DMSO'lu dondurma besiyeri de içeren temel besiyeri çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine, yeni serumlu besiyerinden 10 ml eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Petri kabının yüzeyindeki hücreler, %70-80 arası hücre doluluk oranına ulaştığında, tekrar 10 cm<sup>2</sup> lik petri kaplarına pasajlandı.

### **3.2.1.3. Hücre Pasajlama**

Hücreler düzenli olarak invert mikroskopta incelendi. Hücrelerin üzerindeki besiyeri gerekirse her gün yeni besiyeri ile değiştirildi. Hücrelerin yoğunluğu, %70-80 olduğunda pasajlama yapıldı. Serumlu besiyeri ve PBS, sıcaklığı 37°C'ye gelen su banyosunda ısıtıldı. 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörden alınan petri kabındaki hücrelerin invert mikroskopta hücre canlılığı ve yoğunluğu incelendi. Önceden %70'lik etil alkol ile sterile edilmiş hücre kültürü kabinine, petri kapları alındı. Hücrelerin üzerindeki eski medium çekildi. Petri kabının içerisine 5 ml PBS koyuldu ve hücreler yıkandı. Hücrelerin üzerine, konsantrasyonu %0.05 olan Tripsin-EDTA'dan 1 ml koyuldu ve 3-5 dakika hücrelerin kalkması için inkübatörde bekletildi. 1:2 pasajlama için yeni petri kapları çıkartıldı ve üzerine etiketleme yapıldı. Yeni petri kaplarının içerisine, 5'er ml serumlu DMEM besiyeri koyuldu. Hücreler inkübatörden alındı ve invert mikroskopta incelendi. Petri kabı yüzeyi ile arasındaki bağlantıları kopan hücrelerin üzerine 9 ml serumlu besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak toplandı. Besiyeri içinde toplanan hücreler, 2 petri kabı içerisine 5 ml olacak şekilde ayrıldı. İvert mikroskopta hücrelerin eşit dağılıp dağılmadığı kontrol edildikten sonra pasajı yapılan hücreler inkübatöre kaldırıldı.

1:3 pasajlama yapmak için, üç adet yeni petri kabı çıkartılır ve üzerine etiketleme yapılır. Yeni petri kaplarının içerisine, 7 ml serumlu DMEM besiyeri koyulur. Hücrelere, 1:2 pasajlama işlemindeki şekilde PBS ile yıkama ve Tripsin-EDTA ile petri kabı yüzeyinden

kaldırma basamakları uygulanır. Petri kabı yüzeyi ile arasındaki bağlantıları kopan hücreler 8 ml serumlu DMEM besiyeri ile petri kabının içerisinden pipetaj yapılarak toplanır. Besiyeri içinde toplanan hücreler, 3 petri kabı içerisine 3 ml olacak şekilde ayrılır.

1:4 pasajlama yapmak için, dört adet yeni petri kabı çıkartılır ve petri kaplarının üzerine etiketleme yapılır. Yeni petri kaplarının içerisine, 8 ml serumlu DMEM besiyeri koyulur. Hücrelere, 1:2 pasajlama işlemindeki şekilde PBS ile yıkama ve Tripsin-EDTA ile petri kabı yüzeyinden kaldırma basamakları uygulanır. Petri kabı yüzeyi ile arasındaki bağlantıları kopan hücreler 7 ml serumlu DMEM besiyeri ile petri kabının içerisinden pipetaj yapılarak toplanır. Besiyeri içinde toplanan hücreler, 4 petri kabı içerisine 2 ml olacak şekilde ayrılır. İnvirt mikroskopta hücrelerin eşit dağılıp dağılmadığı kontrol edilir ve pasajı yapılan hücreler inkübatöre kaldırılır.

#### **3.2.1.4. Hücre Dondurma Besiyerinin Hazırlanması**

Hazırlanmak istenen medyumun miktarına bağlı olarak; %20'si kadar FBS (Fetal Sığır Serum), %10'u kadar DMSO (Dimetil sülfoksit) ve toplam hacmi tamamlamak için serumsuz medium (içeriğinde FBS, sodyum pirüvat, glutamin ve penisilin/streptomisin bulundurmayan) eklendi. Hazırlanan dondurma besiyeri (freeze mediumu) filtreden geçirildi. Hazırlanmış olan freeze medyumunu buz üzerine alındı.

#### **3.2.1.5. Hücrelerin Dondurulması**

IHA ve U87 hücreler pasajlama sürecinde iken, hücrelerin bir kısmı, sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere mümkün olduğunca düşük pasaj numaralarında, genetik değişikliğe uğramalarına izin verilmeden, cryotüpler içerisine 1 ml olarak dondukları ve saklandı.

Dondurma besiyeri (freeze mediumu) önceki kısımda anlatıldığı gibi hazırlanarak buz üzerine bırakıldı. Petri kapları inkübatörden alınarak invert mikroskopta canlılığı ve yoğunluğu incelendikten sonra, önceden steril edilen hücre kültürü kabine alındı. Hücrelerin üzerindeki eski medium çekildi. Hücreler, önceden 37°C'de ısıtılmış PBS ile yıkandı ve PBS petri kabının içerisinden uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1 ml Tripsin-EDTA eklendi ve 3-5 dk arasında inkübatörde bırakıldı. Hücreler, invert mikroskopta kontrol edildikten sonra, 6-7

ml medium ile hücreler toplandı ve falkon tüp içerisine alındı. 5 dk 4°C’de 1200 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım çekilerek atıldı ve pelet buz üzerinde 2 dk bekletildi. Hücreler üzerine önceden hazırlanan dondurma besiyeri eklenerek yavaşca pipetaj yapıldı ve homojen şekilde karıştırıldı. Daha sonra, stoklanacak cryotüpler içine ise 1 ml olacak şekilde koyuldu. Tüpler, ilk olarak -20°C’de 20 dk bekletildi ve -80’e kaldırıldı.

### **3.2.1.6. Hücreden Protein Çıkarma**

Öncelikle, protein izole edilecek hücrelerin konfluent olup olmadığı invert mikroskopta kontrol edildi. Konfluent olduğu görülen hücreler, tekrar inkübatöre kaldırılarak protein izolasyonu için gerekli malzemeler hazırlandı. Her petri kabı için 150 µl RIPA tamponuna (Radio-Immunoprecipitation Assay/ lizis ve ekstraksiyon tamponu) ihtiyaç vardır. 170 µl RIPA tamponu (lizis ve ekstraksiyon tamponu) için; %1 proteaz inhibitörü, %1 fosfotaz inhibitörü ve 166,6 µl RIPA tamponu, ependorf tüpünün içerisinde hazırlandı. Petri kabı içerisinde bulunan hücrelerin üzerindeki eski mediumlar çekilerek uzaklaştırıldı. 5 ml PBS ile hücreler yıkandı. 1 ml Trypsin-EDTA hücrelerin üzerine koyuldu ve 3-5 dk inkübatörde bekletildi. 5 ml PBS ile hücreler toplandı. Toplanan hücreler 15 ml’lik falkon tüpünün içine koyularak, 5 dk 2000 rpm’de 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Pelet, 1 ml PBS ile pipetaj yapılarak homojen hale getirildi ve ependorf tüp içerisine alındı. Daha sonra, 5 dk 2000 rpm’de 4°C’de santrifüj edildi, süpernatant kısım atıldı ve peletin üzerine 150 ul RIPA eklendi. RIPA tampon çözeltisi eklenmiş pelet, 15 kez pipetaj yapıp 15 kez iğneden geçirildikten sonra, -80°C’de 20 dk bekletildi. Daha sonra, buzda eritilip 15 kez pipetaj yapıldı (4 kez). 4°C’de 2000 rpm’de 25 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı, bir ependorf tüpün içerisine alındı. Elde edilen proteinler -20°C’ye kaldırıldı.

### **3.2.2. Bradford Assay**

Bradford Assay kolorimetrik protein tayin yöntemlerinden birisidir. Bu yöntemin temeli; Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının tahlil edilecek olan proteine bağlanarak mavi renk vermesine ve 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm alınmasına dayanır. Coomassie boyasının proteine bağlanması, boyanın mavi anyonik formunu sabitler.

Bradford Assay’da protein tayinini yapabilmek için, belirli konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı (Tablo 5) (Standartların içeriğinde protein bulunduğu için bu işlemler buz üzerinde yapıldı).

**Tablo 5:** Bradford assay standartlar tablosu

SIRA	H <sub>2</sub> O (µl)	BSA (µl)	KONSANTRASYON(µg/µl)
A	0	300 Stok	2000
B	125	375 Stok	1500
C	325	325 Stok	1000
D	175	175 B’den	750
E	325	325 C’den	500
F	325	325 E’den	250
G	325	325 F’den	125
H	400	100 G’den	25
I	400	0	0

Tablo 5’te gösterilen şekilde standartlar hazırlandı. Vortex ve santrifüj yapılarak buz üzerine kaldırıldı. Standartlar sonrası örnekler 1:5 oranında seyreltilerek hazırlandı.

**Tablo 6:** Bradford assay örnekler tablosu

ÖRNEK ADI	PROTEİN(µl)	H <sub>2</sub> O (µl)
U87	5	20
IHA	5	20

Tablo 6’da gösterildiği gibi örnekler hazırlandı, santrifüj edildi ve buz üzerine kaldırıldı.

Çalışma solüsyonu hazırlamak için 4600 µl çalışma solüsyonu 15 ml’lik falkon tüp içerisine koyuldu ve vortextlendi.

Hazırlanan standart ve örneklerden, 96 well plate de yapılacak olan ölçüm için, 2 tekrarlı olmak üzere, her kuyucuğa 5 µl koyuldu (Tablo 7). Koyulan standartlar ve örneklerin üzerine, çalışma solüsyonundan 200 µl koyularak yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı. 30 saniye çalkalayıcıda bırakıldı ve 5 dk inkübe edildi. Spektrofotometrede 595 nm dalgaboyunda, hazırlanan plate için ölçüm alındı. Ölçüm sonrası çıkan değerler için hesaplama aşamasına

geçildi. Tablo 7’de görüldüğü gibi standart ve örnekten ikişer tekrarlı yükleme yapıldığı için ortalamaları alındı. Hesaplanan ortalamalardan blank olarak kullanılan distile H<sub>2</sub>O’nun ortalaması çıkartıldı. Standart değerleri ve temsil ettikleri konsantrasyon değerleri için Excel programında dağılım grafiği çizildi. Grafikte verilen R<sup>2</sup> değerinde, örneklerin ortalamaları y değeri yerine yazılarak, x değerleri, her bir örnek için hesaplandı. Örnekler, 1:5 oranında seyreltilerek hazırlandığı için her değer 5 ile çarpılarak örneklerin konsantrasyonu hesaplandı ve hesaplanan değer 1000’e bölünerek protein konsantrasyonları µg/ml’ye çevrildi.

**Tablo 7:** Bradford yükleme planı

A	0	100 (G’den)	325 (F’den)	325 (E’den)	325 (C’den)	175 (B’den)	325 Stok	375 Stok	300 Stok
B	0	100 (G’den)	325 (F’den)	325 (E’den)	325 (C’den)	175 (B’den)	325 Stok	375 Stok	300 Stok
C	IHA	IHA	U87	U87					

### 3.2.3. Western Blot

Hücrelerden izole edilen protein ekstraktı içerisindeki spesifik proteinin tanımlanması için yapılan bir blotlama yöntemidir.

Hücreden protein izolasyonu yöntemi ile proteinler elde edildi. Yükleme istediğimiz protein örnekleri için, 120 µg, bradford assayde çıkan konsantrasyonlara bölünerek, yüklenecek örneklerin hacmi µl olarak hesaplandı. Yükleme boyasının eklenmesi ve örneklerin denatüre edilmesinin ardından, jelle önce IHA (glia) sonra U87 (glioblastoma) proteinleri olacak şekilde üçer tekrarlı olarak yüklendi. Protein örnekleri elektroforez yöntemi ile molekül ağırlıklarına göre jel üzerinde yürütüldü. Şekil 12’deki gösterildiği şekilde western blot sandviçi yapılarak transfer jelden PVDF membran üzerine transfer edildi. Membranların yerleştirileceği kutular çıkartılarak her antikor için kutular tek tek etiketlendi. Transfer işleminin sonunda membranlar kesilerek kutulara yerleştirildi. Membranların üzerine 5 ml blocking solüsyonu koyularak oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Bloklama işlemi sonunda, yeniden, membranların üzerine 5 ml blocking solüsyonu ile EAAT2 (GLT-1), Ubiquitin, Sirt4 ve PKC primer antikorları etiketlenen kutulara sırası ile 1:1000, 1:1000, 1:500 ve 1:500 oranında koyuldu. Membran, 16 saat

boyunca, +4°C'deki çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Süre bitiminde 3 defa 5'er dakika wash buffer ile membran yıkandı. 1:5000 oranında Goat Anti-Rabbit (2.cil/second) antikoru ve 5 ml blocking solüsyonu koyuldu. Membran 2 saat oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Süre sonunda, membran, 3 kere 10'ar dakika wash buffer ile yıkandı. 500 µl ECL solüsyonu hazırlanarak membran üzerine eklendi. ECL inkübasyonu için 2 dk beklendi ve membran asetat üzerine koyularak western blot görüntüleme cihazında (G:BOX SYNGENE) görüntü alındı. Membranlar stripping buffer ile 90 dk oda sıcaklığındaki çalkalayıcıda strip edildi. Süre bitiminde membranlar 3 defa 5'er dakika wash buffer ile yıkandı. 5 ml blocking solüsyonu koyularak oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Süre bitiminde membranların üzerine 5 ml blocking solüsyonu ve 1:3000 oranında GAPDH antikoru koyuldu. Membran, 16 saat boyunca, +4°C'deki çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Süre bitiminde 3 defa 5'er dakika wash buffer ile membran yıkandı. 1:5000 oranında Goat Anti-Rabbit (2.cil/second) antikoru ve 5 ml blocking solüsyonu koyuldu. Membran 2 saat oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Süre sonunda, membran, 3 kere 10'ar dakika wash buffer ile yıkandı. 500 µl ECL solüsyonu hazırlanarak membran üzerine eklendi. ECL inkübasyonu için 2 dk beklendi ve membran asetat üzerine koyularak western blot görüntüleme cihazında (G:BOX SYNGENE) görüntü alındı. Western blot yöntemi ile ekspresyonlarına bakılan proteinlerin, Image J programı kullanılarak kuantifikasyonları yapıldı.

### **3.2.3.1. Tampon Çözeltiler**

10X Yürütme Tamponu (10X Running Buffer-1 lt) için; 30.3 gr Tris-Base (0.25 M), 144 gr glisin (1.92 M) ve 10 gr SDS (0.04 M) hassas terazide tartılarak son hacim 1 lt olacak şekilde dH<sub>2</sub>O'da çözdürüldü.

1X Yürütme Tamponu (1X Running Buffer-1 lt) için; 900 ml dH<sub>2</sub>O içerisine 100 ml 10X Running Buffer eklenerek hazırlandı (Tris-Base (0.025 M), Glisin (0.192 M), SDS (0.004 M)).

Transfer Tamponu (Transfer Buffer-1 lt) için; 3.03 gr Tris-Base (0.025 M) ve 14.4 gr glisin (0.192 M) hassas terazide tartıldı ve bir beher içerisine alındı. Üzerine 200 ml methanol, 2 ml %10 SDS eklenerek yaklaşık 800 ml'ye kadar dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı, karışımın çözünmesi sağlandı, çözüldükten sonraki hacim 1 lt'ye tamamlandı.

TBS (Tris-Buffered Salline-1 lt) için; 6.05 gr Tris-HCl (0.038 M) ve 8.76 gr NaCl (0.15 M) tartıldı, üzerine 800 ml'ye yakın otoklavlanmış dH<sub>2</sub>O eklenerek çözünmeleri sağlandı. Elde edilen çözeltinin pH'si, pH metre ile ölçüldü, pH: 7.6 olarak ayarlandı ve son olarak çözelti 1 litreye dH<sub>2</sub>O ile tamamladı.

Blotlama Solüsyonu (Blocking Solution - %5 Skim Milk (Süt Tozu) + TBS (pH: 7.6) ) için 5 gr süt tozu hassas terazide tartıldı. Beher içerisine manyetik karıştırıcı atılarak karıştırıcı üzerinde TBS ile çözüldü.

Yıkama Tamponu (Wash Buffer –TBS (pH: 7.6) + %0,1 Tween 20) için; 100 ml TBS (pH: 7.6) çözeltisine 100 µl Tween-20 eklenerek hazırlandı.

%10'luk SDS çözeltisi; hassas terazide tartılan 10 gr SDS ve dH<sub>2</sub>O ile hazırlandı (Total hacim 100 ml olmalıdır).

Strip Tamponu (Stripping Buffer- %2SDS, 62.5 mM Tris (pH:6.7), 100 mM β-merkapttoethanol) için; 200 ml %10 SDS, 62.5 ml 1 M Tris (pH:6.7) (β-merkapttoethanolsüz) dH<sub>2</sub>O ile 1 lt tampon hazırlandı. Her strip aşamasında 50 ml strip tamponu içine 350 µl β-merkapttoethanol eklenerek kullanıldı.

Tripan mavisinden 0,04 g tartıldı ve 10 ml PBS içerisinde eritilerek %0,04'lük boya solüsyonu hazırlandı.

Ponceau S çözeltisi (%5 asetik asitte %0.1 w/v Ponceau-100 ml) için; 0.1 gr Ponceau S hassas terazide tartıldı, 5 ml asetik asit ve dH<sub>2</sub>O ile çözdürüldü.

### **3.2.3.2. Örneklerin Hazırlanması, Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi**

Jele yüklenecek örneklerin miktarı, Bradford Assay ile hesaplandı ve 6 µl yükleme boyası ile birlikte ependorf tüplerin içerisine hazırlandı. 2000 rpm'de 10 saniye santrifüj yapıldı. Örnekler, ısı bloğunda 96°C'de 5 dakika denatüre edildi ve 2000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Jel alınarak yürütme tankına koyuldu ve yürütme tamponu (1X Running Buffer) eklendi. Jelin üzerindeki tarak çıkartıldı. İlk kuyucuğa 3 µl marker yüklendi sonrasında ise örnekler sırası ile yüklendi (Max 30 µl = Yükleme boyası (5X) + Örnek => 6 µl yükleme boyası + 24 µl örnek). Jel 100V'da 1-1.30 saat yürütüldü (Yükleme boyası jelin sonuna gelene kadar yürütülür).

### 3.2.3.3. Jelden Membrana Transfer, Blotlama ve Görüntüleme

Transfer sandviçini hazırlamak için aşağıdaki işlemler sırasıyla yapıldı. Sünger transfer buffer ile ıslatıldı ve siyah kasetin üzerine koyuldu. Whatman kağıdı transfer buffer ile ıslatıldı ve koyuldu. Jel whatman kağıdının üzerine koyuldu. Jelin üzerine, membran transfer buffer ile ıslatılarak koyuldu. Üzerine, whatman kağıdı transfer buffer ile ıslatılarak koyuldu ve rulo ile üzerinden geçildi. Sünger transfer buffer ile ıslatıldı, koyuldu ve rulo ile üzerinden geçildi (Şekil 12). Kaset kapatıldı. Kaset tank içerisine – ve + yönlerine dikkat edilerek yerleştirildi. Tankın içerisine buz bloğu yerleştirildi. Transfer buffer koyuldu. Tank +4°C güç kaynağına bağlandı ve 70V’da 2 saat yürümesi için bırakıldı.



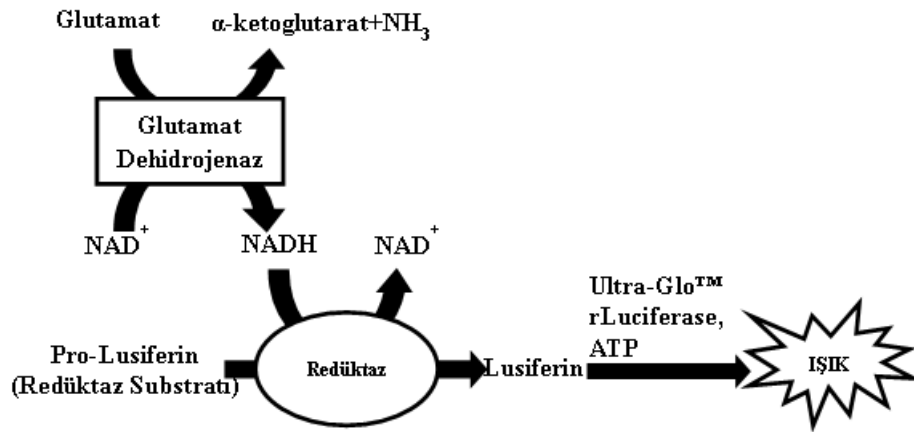
**Şekil 12:** Western blot için transfer sandviçinin hazırlanma sırası

Transfer sonrası, membranın üzerine 5 ml blocking solüsyonu koyuldu. Oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Bloklama işlemi sonunda, yeniden, membranın üzerine 5 ml blocking solüsyonu ve 1:1000 oranında EAAT2 (GLT-1) primer antikoru koyuldu. Membran, 16 saat boyunca, +4°C’deki çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Süre bitiminde 3 defa 5’er dakika wash buffer ile membran yıkandı. 1:5000 oranında Goat Anti-Rabbit (2.cil) antikoru ve 5 ml blocking solüsyonu koyuldu. Membran 2 saat oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Süre sonunda, membran, 3 kere 10’ar dakika wash buffer ile yıkandı. 500 µl ECL solüsyonu hazırlanarak membran üzerine eklendi. ECL inkübasyonu için 2 dk beklendi ve membran asetat üzerine koyularak western blot görüntüleme cihazında (G:BOX SYNGENE) görüntü alındı.



### 3.2.4. Glutamat Assay

Glutamat assay testi biyolojik numunelerde glutamatın hızlı, seçici ve hassas bir biçimde algılanması için kullanılan biyoluminesans testidir. Şekil 13’de gösterildiği gibi glutamat dehidrojenaz (GDH), glutamata  $\alpha$ -ketoglutarata çevirirken,  $\text{NAD}^+$ ’ı  $\text{NADH}$ ’a çevrilir. Test, bu aşamada salınan  $\text{NADH}$ ’ın tespitine dayanır.  $\text{NADH}$  varlığında, bir pro-lusiferin redüktaz substratı, redüktaz tarafından lusiferine dönüştürülür. Ortaya çıkan lusiferin, Ultra-Glo™ Rekombinant Lusiferaz tarafından ışık üretmek için kullanılmaktadır. Tüm glutamat tüketilene kadar, sabit bir lüminesans sinyal elde edilir ve açığa çıkan lüminesans sinyal numunedeki glutamat miktarı ile orantılıdır. Bu sinyalin ölçümüyle örneklerdeki glutamat miktarı tayin edilmektedir.



**Şekil 13:** Glutamat assay çalışma prensibinin gösterimi. Promega Ultra-Glo™ glutamat assay kitinden modifiye edilmiştir.

Hücre sayımında ölü hücrelerin boyanmasında kullanılan tripan mavisinden 0,04 g tartıldı ve 10 ml PBS içerisinde eritilerek %0,04'lük boya solüsyonu hazırlandı.

10  $\text{cm}^2$ 'lik petri kaplarında yetiştirilen IHA ve U87 hücrelerinin, 1 ml tripsin-EDTA ile petrinin yüzeyinden kalkması sağlandı ve 9 ml besiyeri ile hücreler toplanarak içinde 10 ml medium olan falkon tüpe alındı. Hücre solüsyonu homojen bir hale getirildi. Hücre solüsyonundan ve tripan blue boyasından 1:1 oranında alınarak ependorf içerisinde karıştırıldı. Slaytın A ve B kısımlarına ependorf tüp içerisinde hazırlanan solüsyondan 10  $\mu\text{l}$  koyuldu ve cihazda hücre sayımı yapıldı. Sonuçlar hesaplanarak, 96 well plate'e, bir tane kuyucuga yalnızca medium ve diğer kuyucuklara üçer tekrarlı 5000'er hücre (100  $\mu\text{l}$ ) olacak

şekilde ekildi. 0 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat için tüm deney boyunca her kuyucuktan medium toplanacağından ve toplam 9 kuyucuk olduğu düşünülerek 36 tane ependorf tüp gruplarına göre isimlendirildi, içlerine ayrı ayrı 98 µl steril PBS, hücre kültürü kabini içerisinde koyulup 4°C'ye kaldırıldı.

Hücreler canlılık ve yoğunlukları için mikroskopta kontrol edildi. DMEM besiyeri ısıtıldı. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 100 µl DMEM besiyeri koyuldu. Besiyeri değiştirilir değiştirilmez, 0 saat için her kuyucuktan 2 µl besiyeri alınarak önceden hazırlanmış olan 98 µl PBS içeren tüplere toplandı ve tüpler -20°C'ye kaldırıldı. Besiyeri değişiminin üzerinden 24 saat, 48 saat ve 72 saat geçtiğinde besiyeri toplama işlemi 0 saat için olduğu gibi tekrar edildi ve besiyeri içeren PBS'li tüpler -20°C'ye kaldırıldı.

Assay Aşaması; Glutamat assay kitinde yer alan Tablo 8'e uygun şekilde plate'de kullanılacak olan 36 kuyucuk için hazırlandı.

**Tablo 8:** Glutamat assay kitinde yer alan bileşenler ve kuyucuk başına kullanım miktarları. Promega glutamat assay kitinden modifiye edilmiştir.

Bileşen	Kuyucuk başına kullanılan miktar
Lusiferin tespit etme solüsyonu	50 µl
Redüktaz	0,25 µl
Redüktaz substratı	0,25 µl
Glutamat dehidrojenaz	1 µl
NAD <sup>+</sup>	1 µl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	GLU	M	IHA	IHA	IHA	IHA	U87	U87	U87	U87			0 Saat
B		M	IHA	IHA	IHA	IHA	U87	U87	U87	U87			24 Saat
C		M	IHA	IHA	IHA	IHA	U87	U87	U87	U87			48 Saat
D		M	IHA	IHA	IHA	IHA	U87	U87	U87	U87			72 Saat
E													
F													
G													
H													

**Şekil 14:** Glutamat assay testi için toplanan besiyerlerinin yükleme planı

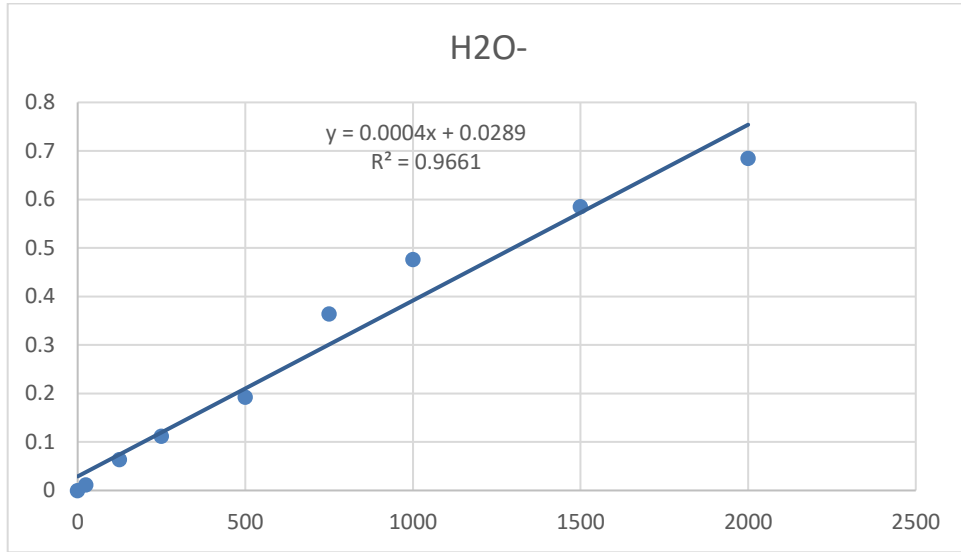
-20°C’de saklanan besiyeri ve PBS içeren örnekler çıkartıldı ve çözümleri sağlandı. Örnekler Şekil 14’de gösterilen plana göre assay plate içerisine kuyucuk başına 50 µl olarak yüklendi. Plate’e yüklemek için test içerisinde gelen 10 mM, 50 µl glutamattan 50 µM glutamat hazırlandı.  $[50 \mu\text{l} \times 50 \mu\text{M}] / 10000 = 0,25 \mu\text{l}$  hesaplamasından çıkan miktar ependorf tüpte son hacim 50 µl olacak şekilde PBS ile tamamlandı. Bu glutamat yalnızca tek bir kuyucuğa kontrol olarak koyuldu. Ardından hazırlanan glutamat tespit reaktifinden her kuyucuğa 50 µl eklendi. Plate ışısız ortamda, oda sıcaklığında, 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sona erdiğinde lüminometre ile ölçüm alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

#### 4.1.1. Bradford Assay ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücrelerden yapılan protein izolasyonu sonrası, Bradford Assay ile protein konsantrasyonu belirlendi. Protein konsantrasyonu sonuçları, Excel programında hesaplanarak absorbans/standart grafikleri oluşturuldu. Şekil 15'deki grafikte verilen  $R^2$  denklemine göre, protein konsantrasyonu hesaplamaları yapıldı. Denklemden elde edilen absorbans değeri (OD) y değeri yerine koyularak x değeri bulundu. Bulunan x değeri daha sonra 1000'e bölünerek  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  cinsinden protein konsantrasyonu elde edildi. Western Blot uygulaması sırasında, jelle, bu sonuçlara bağlı olarak 120  $\mu\text{g}$  yükleme yapıldı.



**Şekil 15:** IHA ve U87 hücrelerinden elde edilen protein örneklerinin Bradford Assay sonuçları ile oluşturulan absorbans /standart grafiği.

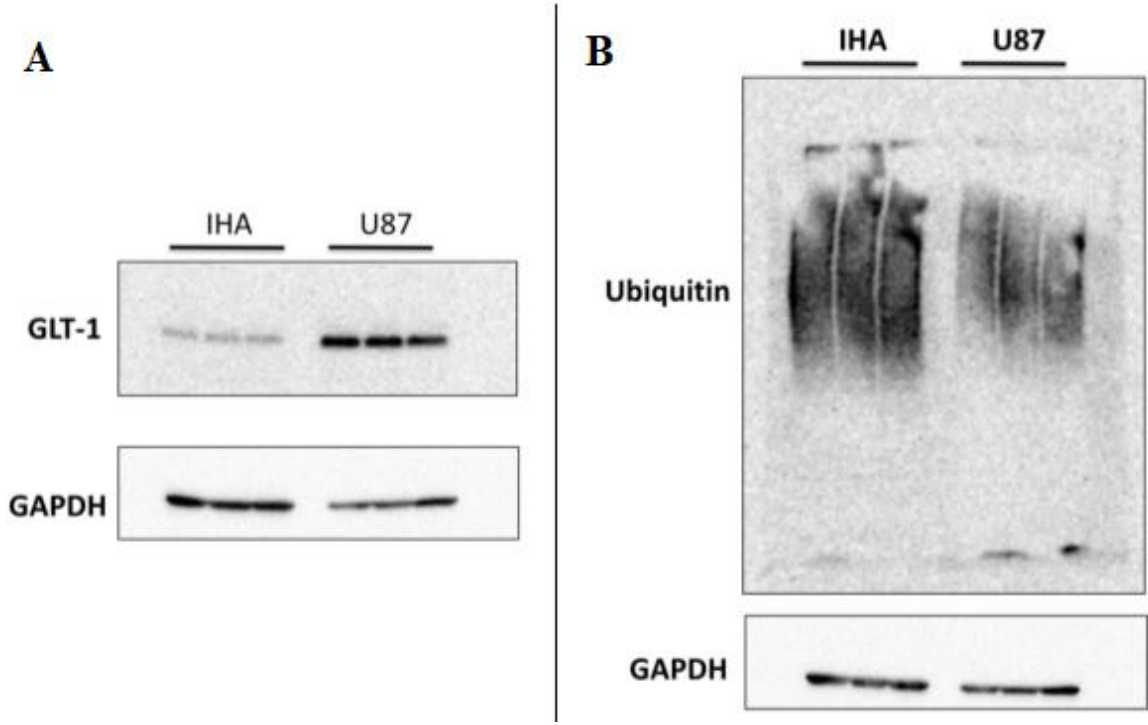
#### **4.1.2. GLT-1 ve Ubiquitin Protein İfadesinin Western Blot ile Tespiti**

Şekil 16'daki GLT-1 ve Ubiquitin bantları GAPDH'e oranlanarak bakıldığında, IHA hücrelerine kıyas ile U87 hücrelerinde GLT-1'in protein ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ve Ubiquitin protein ekspresyonunun ise azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar birbiri ile uyumludur çünkü GLT-1 ubiquitine olarak degrade edilmektedir. Dolayısıyla, ubiquitinasyon azalırsa, GLT-1'in degradasyonu azalacaktır ve protein ifadesi artacaktır.

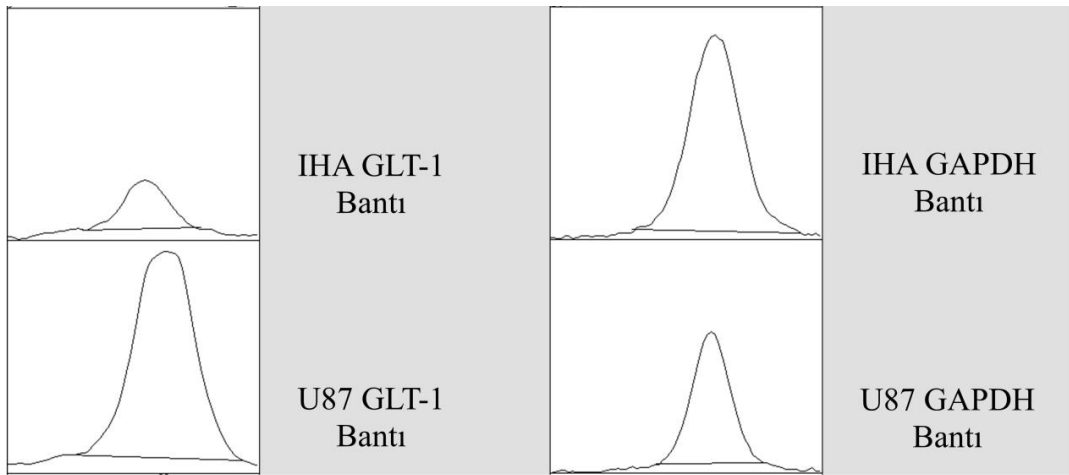
#### **4.1.3. GLT-1 ve Ubiquitin Protein Bantlarının Image J Programı Kullanılarak Hesaplanması**

Image J programı NIH (Ulusal Sağlık Enstitüsü- National Institute of Health)'in web sitesinden ücretsiz olarak indirilmiştir. Kuantifikasyon program içeriğinde anlatıldığı üzere yapıldı. İlk basamakta, Şekil 16'da bulunan western blot görüntüsündeki bantlar etrafında, dikdörtgenler çizildi. Program, bu dikdörtgenler içindeki bantların yoğunluğuna göre ölçüm yaparak “tepe grafiği”ni çizdi (Şekil 17-18). Bu tepe grafiğinin altındaki alanı hesaplayarak bantlara karşılık gelen değerleri verdi.

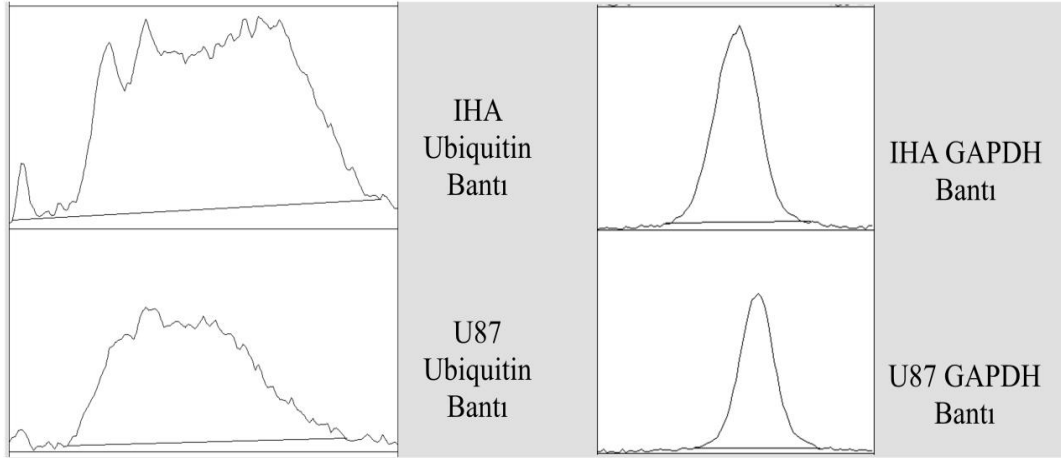
İkinci basamakta, Şekil 16'da bulunan western blot görüntüsündeki GAPDH bantları etrafında dikdörtgenler çizildi. Program, bu dikdörtgenler içindeki bant yoğunluğuna göre, “tepe grafiği”ni çizdi (Şekil 17-18). Program bu tepe grafiğinin altındaki alanı hesaplayarak bantlara karşılık gelen değerleri verdi. Bu veriler bir tablo olarak verilmiştir (Tablo 9-10). GLT-1 ve Ubiquitin bantlarının değerleri, GAPDH bant değerlerine oranlanarak rölatif ekspresyon grafikleri çizilmiştir ve Şekil 19-20'de gösterilmiştir.



**Şekil 16:** IHA ve U87 hücrelerinde, GLT-1 ve Ubiquitin protein ifadelerinin western blot ile görüntülenmesi. GAPDH kontrol olarak kullanılmıştır.



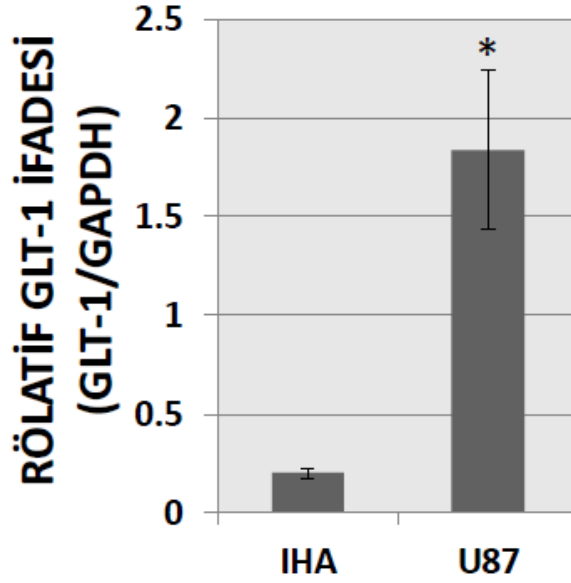
**Şekil 17:** Şekil 16A' daki western blot deneyi sonrası, GLT-1 ve GAPDH protein bantları için Image J programı ile tepe grafiğinin çizilmesi.



**Şekil 18:** Şekil 16B’deki western blot deneyi sonrası, Ubiquitin ve GAPDH protein bantları için Image J programı ile tepe grafiğinin çizilmesi.

**Tablo 9:** Şekil 16A’daki western blot deneyi için, GLT-1 ve GAPDH protein bantları için oluşturulan tepe grafiklerinin altındaki alanın hesaplanması ile bantlara karşılık gelen değerler.

	GLT-1	GAPDH	GLT-1/GAPDH	ORTALAMA
<b>IHA (1)</b>	2428,69	16004,309	0,15175226	0,20013505
<b>IHA (2)</b>	3597,296	14955,116	0,24053949	
<b>IHA (3)</b>	2923,347	14046,894	0,20811341	
<b>U87 (1)</b>	17551,43	6847,66	2,56312813	1,83968149
<b>U87 (2)</b>	17046,116	9590,803	1,77733981	
<b>U87 (3)</b>	14072,602	11940,338	1,17857652	

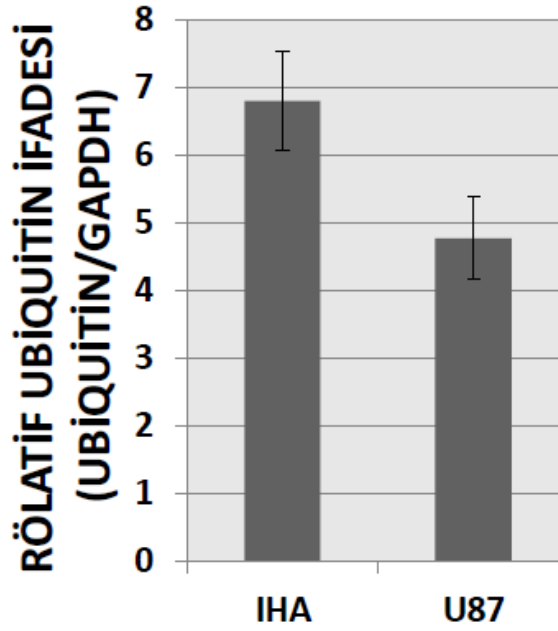


**Şekil 19:** Şekil 16A'daki western blot deneyinde, IHA ve U87 hücreleri için rölatif GLUT-1 ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği. IHA ve U87 örneklerindeki GLUT-1 bantlarının, GAPDH bantlarına oranlarının ortalaması ile hesaplanmıştır. \*p=0.00754217 <0.05

**Tablo 10:** Şekil 16B'deki western blot deneyinde, Ubiquitin ve GAPDH protein bantları için oluşturulan tepe grafiklerinin altındaki alanın hesaplanması ile bantlara karşılık gelen değerler.

	Ubiquitin	GAPDH	Ubiquitin/GAPDH	ORTALAMA
<b>IHA (1)</b>	88351,403	15737,823	5,61395328	6,80244815
<b>IHA (2)</b>	102486,988	12603,702	8,13149882	
<b>IHA (3)</b>	97573,273	14646,48	6,66189235	
<b>U87 (1)</b>	51026,822	9373,388	5,44379706	4,77123492
<b>U87 (2)</b>	61070,6	11475,853	5,32166106	
<b>U87 (3)</b>	51569,337	14533,752	3,54824666	





**Şekil 20:** Şekil 16B'deki western blot deneyinde, IHA ve U87 hücreleri için rölatif Ubiquitin ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği. IHA ve U87 örneklerindeki Ubiquitin bantlarının, GAPDH bantlarına oranlarının ortalaması ile hesaplanmıştır.  $p=0.05003025 >0.05$

Şekil 16A'daki GLT-1 western blot görüntüsüne ve Şekil 19'da yer alan kuantifikasyon grafiğine bakıldığında, IHA hücrelerine kıyas ile U87 hücrelerinde GLT-1 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü ( $*p=0.00754217 <0.05$ ). Şekil 16B'deki Ubiquitin Western blot görüntüsüne ve Şekil 20'deki kuantifikasyon grafiğine bakıldığında IHA hücrelerine kıyas ile U87 hücrelerinde Ubiquitin protein ifadesinde bir azalma olduğu görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0.05003025 >0.05$ ).

#### 4.1.4. PKC ve Sirt4 Protein İfadesinin Western Blot ile Tespiti

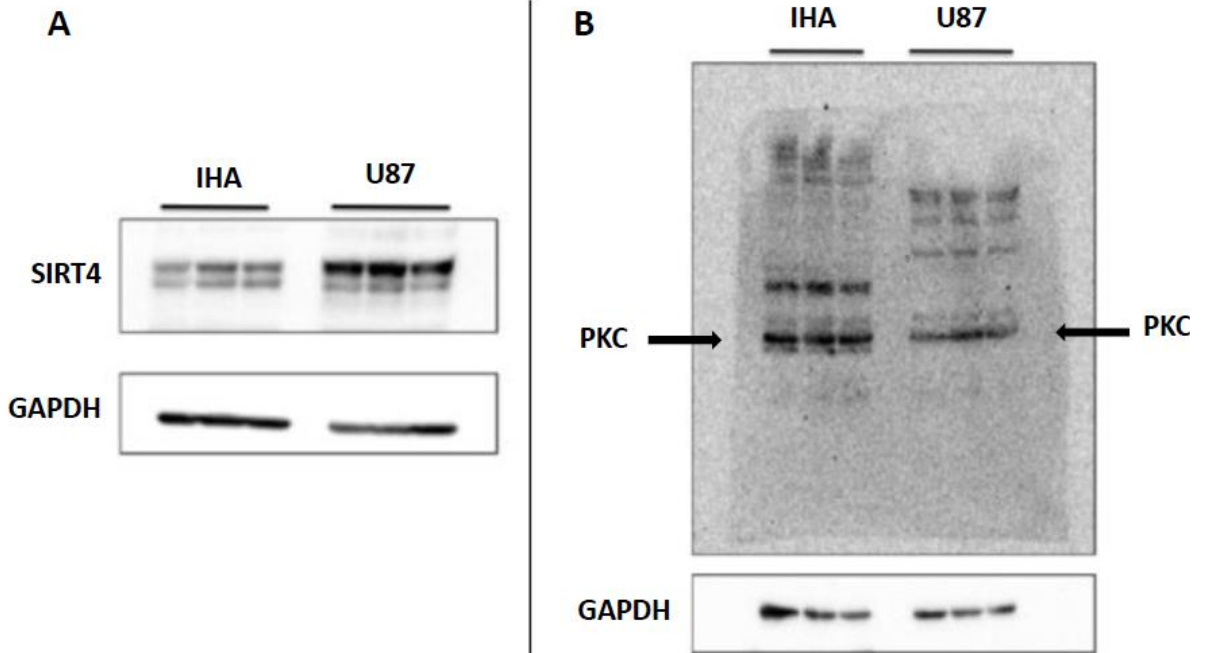
Şekil 21'de gösterilen PKC ve Sirt4 bantlarına GAPDH ile karşılaştırılarak bakıldığında U87 hücresinde PKC protein ifadesinin azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, Sirt4 protein ifadesinin ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, hücrede GLT-1 proteininin ubiquitine ve degrade olmasını sağlayan PKC proteininin glioblastoma hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaldığını, hücrede koruyucu etki sağlayarak mitokondriyal metabolizmanın düzenlenmesinde

görevli olan Sirt4 proteininin ise glioblastoma hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştir.

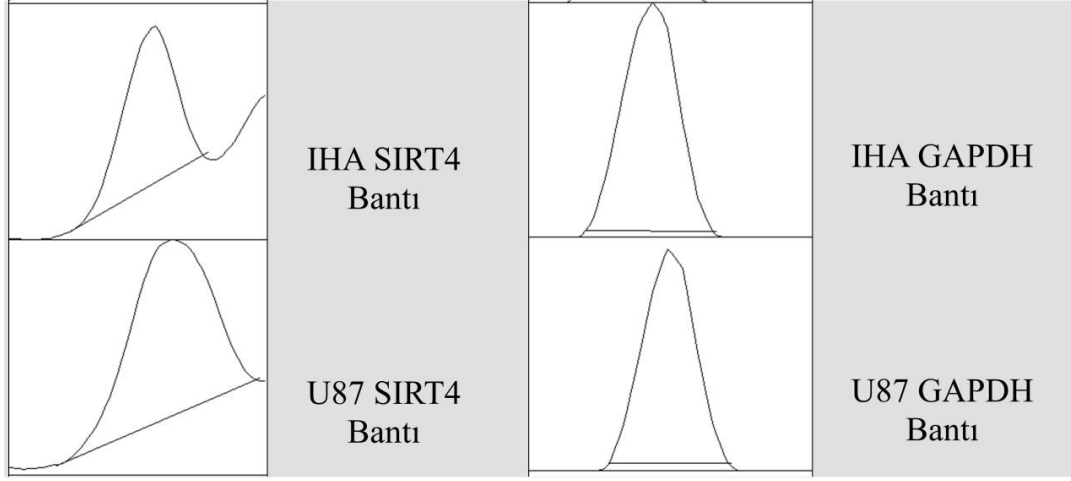
#### 4.1.5. Sirt4 ve PKC Protein Bantlarının Image J Programı Kullanılarak Hesaplanması

İlk basamakta, Şekil 21'deki western blot görüntüsündeki bantlar etrafında dikdörtgenler çizildi. Program bu dikdörtgenler içindeki, bantların yoğunluğuna göre ölçüm yaparak "tepe grafiği"ni çizdi (Şekil 22-23). Bu tepe grafiğinin altındaki alanı hesaplayarak bantlara karşılık gelen değerleri verdi.

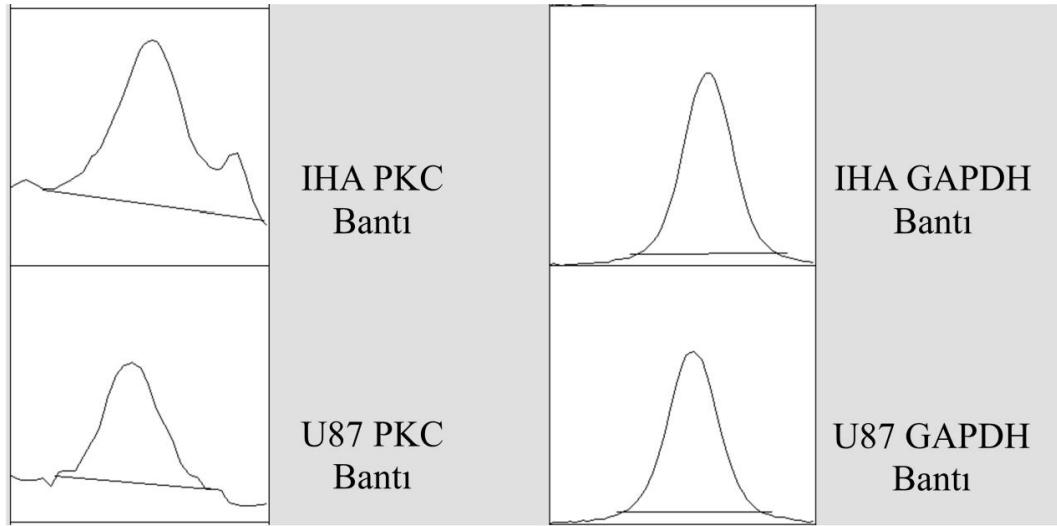
İkinci basamakta, Şekil 21'deki western blot görüntüsündeki GAPDH bantları için dikdörtgenler çizildi. Program, bu dikdörtgenler içindeki bant yoğunluğuna göre "tepe grafiği"ni çizdi (Şekil 22-23). Program bu tepe grafiğinin altındaki alanı hesaplayarak bantlara karşılık gelen değerleri verdi. Bu hesaplamalar Tablo 11-12'de verilmiştir. Bu veriler ile Sirt4 ve PKC protein bantları GAPDH bantlarına oranlanarak rölatif ekspresyon grafikleri çizilmiştir ve Şekil 24-25'de gösterilmiştir.



**Şekil 21:** IHA ve U87 hücrelerinde, Sirt4 ve PKC protein ifadelerinin western blot ile görüntülenmesi. GAPDH kontrol olarak kullanılmıştır.



**Şekil 22:** Şekil 21A'daki western blot deneyi sonrası, Sirt4 ve GAPDH protein bantları için Image J programı ile tepe grafiğinin çizilmesi.



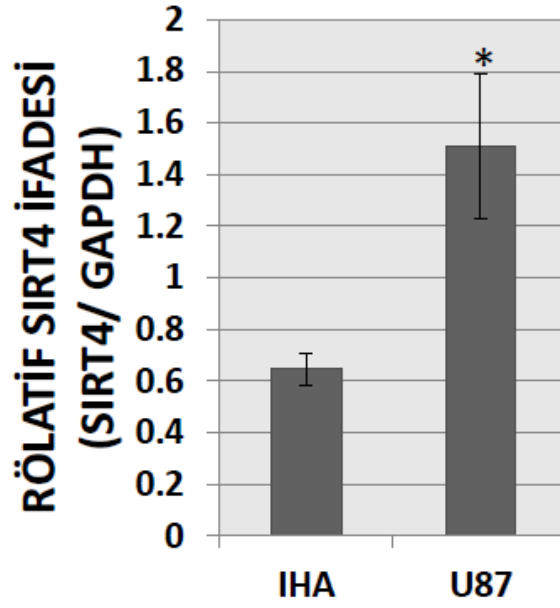
**Şekil 23:** Şekil 21B'deki western blot deneyi sonrası, PKC ve GAPDH protein bantları için Image J programı ile tepe grafiğinin çizilmesi.

**Tablo 11:** Şekil 21A'daki western blot deneyinde, Sirt4 ve GAPDH protein bantları için oluşturulan tepe grafiklerinin altındaki alanın hesaplanması ile bantlara karşılık gelen değerler.

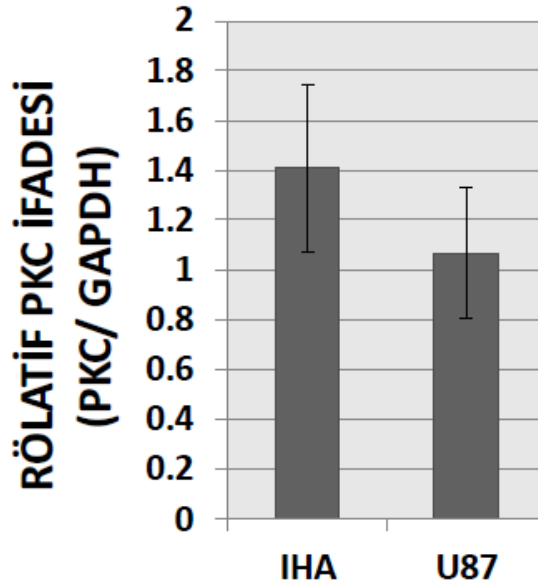
	<b>Sirt4</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Sirt4/GAPDH</b>	<b>ORTALAMA</b>
<b>IHA (1)</b>	7780,593	15091,51	0,51556093	0,64311749
<b>IHA (2)</b>	11725,806	16908,874	0,69347054	
<b>IHA (3)</b>	10721,836	14884,803	0,72032099	
<b>U87 (1)</b>	18848,676	9178,903	2,05347807	1,50827213
<b>U87 (2)</b>	16462,848	12381,56	1,32962632	
<b>U87 (3)</b>	17091,342	14969,924	1,14171201	

**Tablo 12:** Şekil 21B'deki western blot deneyinde, PKC ve GAPDH protein bantları için oluşturulan tepe grafiklerinin altındaki alanın hesaplanması ile bantlara karşılık gelen değerler.

	<b>PKC</b>	<b>GAPDH</b>	<b>PKC/GAPDH</b>	<b>ORTALAMA</b>
<b>IHA (1)</b>	17886,735	19291,037	0,92720443	1,40873876
<b>IHA (2)</b>	15587,057	12496,652	1,24729864	
<b>IHA (3)</b>	14552,25	7092,731	2,05171323	
<b>U87 (1)</b>	7802,045	10035,51	0,7774438	1,06641842
<b>U87 (2)</b>	14497,936	9094,095	1,59421427	
<b>U87 (3)</b>	5675,439	6857,731	0,8275972	



**Şekil 24:** Şekil 21A'daki western blot deneyinde, IHA ve U87 hücreleri için rölatif Sirt4 protein ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği. IHA ve U87 örneklerindeki Sirt4 protein bantlarının, GAPDH protein bantlarına oranlarının ortalaması ile hesaplanmıştır. \*p=0.01933925 <0.05

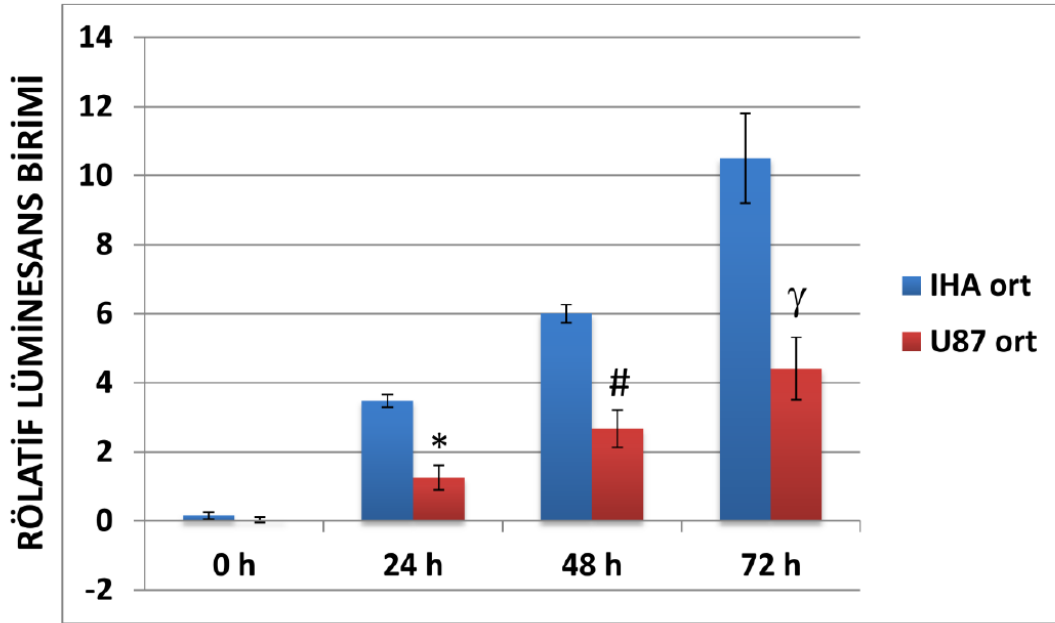


**Şekil 25:** Şekil 21B'deki western blot deneyinde, IHA ve U87 hücreleri için rölatif PKC protein ifadesini gösteren kuantifikasyon grafiği. PKC protein bantlarının, GAPDH protein bantlarına oranlarının ortalaması ile hesaplanmıştır. p=0.23349453 >0.05

Şekil 21A'daki Sirt4'ün Western blot görüntüsüne ve Şekil 24'de yer alan kuantifikasyon grafiğine bakıldığında, IHA hücrelerine kıyas ile U87 hücrelerinde Sirt4 protein ifadesinin anlamlı bir şekilde arttığı (\*p=0.01933925 <0.05) görüldü. Şekil 21B'deki PKC'nin Western blot görüntüsüne ve Şekil 25'deki kuantifikasyon grafiğine bakıldığında, U87 hücre hattında PKC proteininde azalma olduğu görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,23349453 >0.05).

#### 4.2. IHA ve U87 Hücrelerinde Glutamat Assay Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Glutamat assay deneyi tamamlandıktan sonra lüminometre kullanılarak ölçüm yapıldı. Her saat için üçer tekrarlı olarak elde edilen örneklerin ortalaması, Excel programı kullanılarak hesaplandı ve Şekil 26'da yer alan grafik çizildi.



**Şekil 26:** IHA ve U87 hücrelerindeki glutamat assay sonuçlarının değerlendirilmesi. (h: hour (saat)) (\*p= 24 h zaman noktasında, IHA ve U87 hücre medyumunda biriken glutamatın karşılaştırılması, #p= 48 h zaman noktasında, IHA ve U87 hücre medyumunda biriken glutamatın karşılaştırılması, γp= 72 h zaman noktasında, IHA ve U87 hücre medyumunda biriken glutamatın karşılaştırılması) (\*p=0.00070334<0.05, #p=0.00069661<0.05, γp=0.00427705<0,05)

IHA ve U87 hücrelerinde, 24. saatteki (24 h) glutamat birikimi istatistiksel olarak kıyaslandığında, U87 hücrelerinin medyumundaki glutamat miktarının, IHA hücrelerinin medyumundaki glutamat miktarından az olduğu gözlemlendi (\* $p=0.00070334<0,05$ ). IHA ve U87 hücrelerinde, 48. saatteki (48 h) glutamat birikimi kıyaslandığında, 24. saatteki duruma benzer şekilde, U87 hücre medyumundaki birikmiş glutamat miktarının, IHA hücrelerine göre daha düşük olduğu gözlemlendi (# $p=0,00069661<0,05$ ). IHA ve U87 hücrelerinde, 72. saatteki (72 h) glutamat birikimi kıyaslandığında, yine U87 hücre medyumundaki glutamat miktarının IHA hücrelerine göre daha düşük olduğu gözlemlendi ( $p=0,00427705<0,05$ ).

Ayrıca, hem IHA ve hem de U87 hücrelerinde, 24. saatten 72. saate doğru gidildiğinde medyumda ölçülen birikmiş glutamat miktarının arttığı gözlemlenmiştir. IHA hücrelerinin, 24. ve 48. saatteki glutamat birikimi, kendi aralarında kıyaslandığında, 48. saatteki glutamat miktarının, 24. saatteki miktara göre istatistiksel olarak fazla olduğu gözlemlenmiştir ( $p=0,0053739<0,05$ ). IHA hücrelerinin, 24. ve 72. saatteki glutamat birikimi, kendi aralarında kıyaslandığında, 72. saatteki glutamat miktarının, 24. saatteki miktara göre istatistiksel olarak fazla olduğu gözlemlenmiştir ( $p=0,00088204<0,05$ ). IHA hücrelerinin, 48. ve 72. saatteki glutamat birikimi, kendi aralarında istatistiksel olarak kıyaslandığında 72. saatteki glutamat miktarının, 48. saatteki miktara göre istatistiksel olarak fazla olduğu gözlemlenmiştir ( $p=0,00735883<0,05$ ). U87 hücrelerinin, 24. ve 48. saatteki glutamat birikimi, kendi aralarında kıyaslandığında, 48. saatteki glutamat miktarının, 24. saatteki miktara göre istatistiksel olarak fazla olduğu gözlemlenmiştir ( $p=0,03527124<0,05$ ). U87 hücrelerinin, 24. ve 72. saatteki glutamat birikimi, kendi aralarında kıyaslandığında, 72. saatteki glutamat miktarının, 24. saatteki miktara göre istatistiksel olarak fazla olduğu gözlemlenmiştir ( $p=0,00871256<0,05$ ). U87 hücrelerinin, 48. ve 72. saatteki glutamat birikimi kendi aralarında kıyaslandığında, 72. saatteki glutamat miktarının, 48. saatteki miktara göre fazla olduğu gözlemlenmiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,07390057>0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, glia ve glioblastoma hücre hatlarında GLT-1 yıkım yolağı, bu yolağı etkileyen Ubiquitin (Ub), Sirt4 ve PKC proteininin ekspresyon seviyeleri western blot tekniğı ile IHA (glia) ve U87 (glioblastoma) hücrelerinde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Çalışma kapsamında, IHA (glia) ve U87 (glioblastoma) hücre hatlarında, Sirt4 proteininin ekspresyon seviyesi western blot tekniğı ile incelendi. U87 hücrelerinde, IHA hücrelerine kıyasla, Sirt4 protein ekspresyonunda artış gözlemlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde elde edilen veriler, kuantifikasyon sonuçları ile desteklendi. Sirt4, metabolizmanın strese girmesine neden olan eksitotoksisite durumunda aktive olarak koruyucu etki göstermektedir (Dönmez Yalçın ve Çolak, 2020; Shih ve ark, 2014). Eksitotoksisite durumunda, hücredeki fazla Sirt4 ekspresyonu, tümör oluşumunu ve hücrelerinin proliferasyonunu baskılamaktadır (Jeong ve ark, 2013; Min ve ark, 2019). U87 (glioblastoma) hücre hattındaki, Sirt4 proteininin ekspresyonundaki artış, eksitotoksisite durumunda Sirt4'ün glioblastomada da koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmüştür.

IHA ve U87 hücrelerinde western blot tekniğı ile GLT-1 protein ekspresyon seviyesine bakıldığında, U87 hücre hattında GLT-1 ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu görüldü. GLT-1 ekspresyonundaki artış, glioblastoma hücrelerinde artmış olan eksitotoksisite durumuna karşı, hücre tarafından verilen bir cevap ve alınan bir tedbir olduğunu düşündürmektedir. GLT-1 ekspresyonunun, eksitotoksisite durumu ile artışı, hücrelerin yaşamsal faaliyetleri için olumlu bir durum olsa da, glutamat reseptörlerinin, bu toksik durumdan dolayı sinaptik boşlukta biriken glutamat tarafından sürekli olarak uyarılması, glutamat taşınım mekanizmasında düzensizliğe yol açmaktadır (Soni ve ark, 2014; Kim ve ark, 2011). İnsan glioblastoma tümörlerinde yapılmış olan bir çalışma, GLT-1 mRNA ifadesinin, tümör dokularında kontrole göre daha az olduğunu göstermiştir (Dönmez Yalçın ve ark, 2020). Bu çalışmada, U87 hücre hattında bu durumun tersi gözlenmiştir. Bunun nedeni, hücre hatları ve dokuların her zaman uyumlu sonuç vermemesi olabilir. Dokuda, farklı mikroçevrelerin de etkisiyle, bütünüyle in vitro bir ortam olan hücreye göre, farklı etken ve yollara maruz kalarak, GLT-1'in ifadesi azalmış olabilir. Ayrıca, bu durum son derece hızlı bölünen U87 hücre hattına özgü bir durum da olabilir. Dolayısıyla, ileriki çalışmalarda, farklı glioblastoma hücre hatlarının test edilmesi gerekir.



Sonuç olarak, GLT-1 ve Sirt4 protein ifadelerinin, her ikisinin de U87 hücrelerinde IHA hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olması birbiriyle uyumlu sonuçlardır. GLT-1 ifadesinin, Sirt4 ifadesine bağlı olduğu ya da Sirt4 tarafından regüle edildiği önceki çalışmalarda gösterildiği için (Dönmez Yalçın ve Çolak, 2020; Shih ve ark, 2014), Sirt4 ifadesi arttığı zaman GLT-1'in de artmış olması beklenen bir durumdur.

Glutamat taşınımının gerçekleştirildiği yolakta, PKC (Protein Kinaz C), Nedd4-2'yi fosforile ederek aktive etmektedir. Aktif duruma geçen Nedd4-2, GLT-1'e ubiquitin takmakta ve GLT-1 proteozomlarda degrade olmaktadır (Tardón ve ark, 2012; Sheldon ve ark, 2008). IHA ve U87 hücre hatlarında, PKC ve Ubiquitin seviyesi western blot tekniği ile incelenmiştir. U87 hücrelerinde, PKC ve Ubiquitin ekspresyon seviyelerinin IHA hücrelerine oranla azaldığı görülmüştür ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu sonuçlar, glioblastoma hücrelerinde, ubiquitinasyon için gereken PKC proteinin ifadesinin azalmasına bağlı olarak ubiquitinasyonun da azaldığını ve GLT-1 protein ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını düşündürmüştür. Bu sonuçlara bağlı olarak, Sirt4'ün PKC'yi regüle ediyor olabileceği saptanmıştır. PKC proteini, Ubiquitinasyonu düzenlediği için, her ikisinin de aynı anda, U87 hücrelerinde IHA hücrelerine göre azalmış olması uyumlu ve beklenen bir sonuçtur.

Sonuç olarak, glioblastoma hücrelerinde, Sirt4'ün PKC'nin ifadesini veya aktivitesini azaltma yönünde regüle ettiği, dolayısıyla PKC'nin regüle etmekte olduğu ubiquitinasyonun azaldığı, buna bağlı olarak, GLT-1 degradasyonunun azaldığı ve GLT-1 ifadesinin arttığı düşünülmektedir. İleride yapacağımız çalışmalar bu çıkarım ve yorumları doğrulamak yönünde olacaktır.

IHA ve U87 hücrelerinin medyumunda biriken glutamat miktarı, glutamat assay ile ölçülmüştür. IHA hücrelerinde, U87 hücrelerine göre medyumda bulunan glutamat miktarında zamana bağlı olarak 24., 48. ve 72. saatlerde, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi. Hücrelerin medyumunu değiştirilmeden yapılan bu assayde, hücre medyumunda, zamana bağlı olarak glutamat birikimi gözlemlenmiştir.

Glutamat assayde, her bir zaman noktasında, IHA hücrelerine kıyasla, U87 hücrelerindeki, glutamat birikiminin anlamlı bir şekilde düşük olması, U87 hücrelerinde zaman içerisindeki hücre ölümünün daha fazla olmasından kaynaklı olabileceğini düşündürdü. Glioblastoma hücre hatlarındaki proliferasyon hızı, IHA hücrelerine göre fazladır. Glutamat assayde medyum değiştirilmediği için ve U87 hücrelerinde proliferasyon hızı yüksek olduğu için, bu hücrelerde hücre ölüm oranının daha fazla olacağı ve bu duruma

paralel olarak medyuma salınan ve dolayısıyla biriken glutamat miktarında da azalma olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, glia ve glioblastoma hücre hatlarında GLT-1 yıkım yolağı incelenmiştir. İki hücre hattı üzerinde yapılan karşılaştırmalı incelemeler, nörodejeneratif hastalıkların ve beyin tümörlerinin ortak yolağı olan eksitotoksisite mekanizmasının anlaşılmasında yol gösterecektir. Günümüzde; AH ve diğer demansların tedavi edilmesinde kullanılan, FDA onaylı Memantine NMDA reseptör antagonistidir ve glutamat eksitotoksisitesini hedef alır (Thomas ve ark, 2009). ALS tedavisinde kullanılan Riluzole (Rilutek) MSS'de glutamaterjik nörotransmisyonu bloke etmektedir (Doble, 1996). GLT-1 yıkım yolağı üzerinde alternatif çalışmalar yapmanın; eksitotoksisite mekanizmasının, glioblastomanın ve nörodejeneratif hastalıkların hücresel düzeyde anlaşılmasını sağlayacağı ve yeni ilaç ve tedavi yöntemleri geliştirilmesinde etkili olacağı düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde; ortalama yaşam süresinin uzaması ile birlikte Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıkların ve kanserin görülme oranı artmıştır. Glioblastoma, glia hücrelerinden köken alan maling bir beyin tümörü türüdür (Alagöz, 2018). Bütün nörodejeneratif hastalıkların ve glioblastomanın ortak moleküler yollarından biri olan eksitotoksisite, glutamatın sinaptik boşlukta fazla miktarda birikmesi sonucu oluşmakta, nöronal ölüm ve hasara neden olmaktadır (Soni ve ark, 2014). Bu nedenle, sinaptik boşluktan glutamatın geri toplanması, beyin hastalıkları riskinin azalmasında önemli bir noktada yer almaktadır.

Bu çalışmada, glia (IHA) ve glioblastoma (U87) hücre hatlarında GLT-1 yıkım yolağı araştırılmıştır. IHA ve U87 hücre hatlarında, Sirt4 ve GLT-1 protein ifadeleri western blot tekniği ile incelenmiş ve U87 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Eksitotoksisite bir stres durumudur ve stres durumlarında aktive olan Sirt4 proteininin de koruyucu olarak (Dönmez Yalçın ve Çolak, 2020; Shih ve ark, 2014), glioblastoma hücrelerinde artmış olabileceği düşünülmektedir. Ubiquitin ve PKC protein seviyelerinin ise U87 (glioblastoma) hücrelerinde, IHA (glia) hücrelerine göre azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla, glioblastoma hücrelerinde, GLT-1'in ubiquitinasyonu için gereken PKC'nin azalması nedeniyle, ubiquitinasyonun da azaldığı, bunun sonucu olarak GLT-1 proteininin yıkılmadığı ve ifadesinin arttığı gözlenmiştir. PKC'nin kendisinin aktive olarak ubiquitin ligazı olan Nedd4-2'yi aktive ettiği ve GLT-1'in ubiquitinasyonuna yol açtığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Tardón ve ark, 2012). Sirt4'ün, PKC'yi ve dolayısıyla ubiquitinasyonu kontrol ederek GLT-1'i arttırdığı düşünülmektedir. Ayrıca, 24, 48 ve 72 saat sonra glutamat assay kullanılarak ölçülen birikmiş glutamatın, glioblastoma hücrelerinde daha az olduğunu görülmektedir. Bu sonuç, glioblastoma hücrelerindeki eksitotoksik hücre ölümünün fazla olmasından dolayı salınan ve biriken glutamatın az olmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışma sonucunda, glioblastoma hücrelerinde eksitotoksik hücre ölümünün daha fazla olduğu, Sirt4'ün bu durumu ya da eksitotoksisiteyi engellemek için intrinsik bir mekanizma olarak artmış olabileceği düşünülmüştür. Sirt4'ün, gastrik ve kolon kanserlerinde tümör suppressör olarak etki gösterdiği de bilinmektedir. Glioblastomada, bu durum gösterilmemiş olmakla birlikte, elde edilen sonuçlar, Sirt4'ün eksitotoksisiteyi modüle ederek

glioblastomada tümör suppressör olabileceğini düşündürmektedir. Glioblastoma hücrelerinde Sirt4'ün, eksitotoksisiteyi, GLT-1'in ifadesini, PKC ve ubiquitinasyonu düzenleyerek kontrol ettiği düşünülmektedir. Bunu yapılacak sonraki çalışmalar gösterecektir.

Bulunan sonuçlar ve sonrasında gelecek çalışmalar ile Sirt4'ün, glioblastomada ve eksitotoksisite mekanizması içindeki rolü daha iyi anlaşılacaktır. Sirt4'ün, eksitotoksisiteyi modüle ederek glioblastomada, yeni ilaç hedefleri ve tedavi stratejileri geliştirilmesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Alagöz M.** Glioblastoma Multiforma Tedavisinde Kanser Kök Hücrelerinin Temozolomide Karşı Oluşturdukları Direnç. *Sakarya Tıp Dergisi*, 2018, 8(2): 379-387.
- Ansari A, Rahman S. Md, Saha S. K, Saikot F. K, Deep A, Kim K.** Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer and neurodegenerative disease. *Aging Cell*, 2017, 16(1): 4-16.
- Atila A, Alagöz-Ateş Z.** NMDA Reseptör Antagonistlerinin Nöropatik Ağrıdaki Rollerini. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2010, 39(1): 51-68.
- Aydın ÖF, Kurne A, Karabudak R.** Multipl Skleroz Patogenezinde Basamaklar - II: Nörodejenerasyonda Biyolojik Göstergeler, Sodyum Kanalları ve Glutamatın Rolü/ Steps in Multiple Sclerosis Pathogenesis - II: The Role of Biological Markers, Sodium Channels and Glutamate in Neurodegeneration. *Türk Nöroloji Dergisi*, 2006, 12(2): 98-105.
- Bayram A, İğci M.** Sirtuin Genleri ve İşlevleri. *Fırat Tıp Dergisi*, 2013, 18(3): 136-140.
- Beart PM, O'Shea RD.** Transporters for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *British Journal of Pharmacology*, 2007, 150(1): 5-17.
- Chandana SR, Movva S, Arora M, Singh T.** Primary brain tumors in adults. *American Academy of Family Physicians*, 2008, 77(10): 1423-1430.
- Ciechanover A, Schwartz AL.** The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2004, 1695: 3-17.
- Çetin D.** Depresyon Oluşturulmuş Sıçanlarda Glutamat Nörotransmitter Aktivite Değişimlerinin Tespiti ve Beta Laktam Antibiyotiklerinin Depresyon Tedavisindeki Muhtemel Etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 2014, 118.
- Dang W.** The controversial world of sirtuins. *Drug Discov Today Technol*, 2014, 12: e9-e17.
- Doble A.** The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*, 1996, 47(4): 233S-241S.
- Dönmez G, Guarente L.** Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell*, 2010, 9, 285-290.
- Dönmez-Yalçın G, Çolak M.** SIRT4 prevents excitotoxicity via modulating glutamate metabolism in glioma cells. *Human and Experimental Toxicology (HET)*, 2020, 39(7): 938-947.
- Dönmez-Yalçın G, Oktay E, Yalçın A, Diniz G, Kahraman Solakoglu D, Senoglu M.** Glutamate Transporter 1 expression in human glioblastomas. *JBUON*, 2020, 25(4): 2051-2058.
- García-Tardón N, González-González IM, Martínez-Villarreal J, Fernández-Sánchez E, Giménez C, Zafra F.** Protein Kinase C (PKC)-promoted Endocytosis of Glutamate Transporter GLT-1 Requires Ubiquitin Ligase Nedd4-2-dependent

Ubiquitination but Not Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(23): 19177-19187.

**Görgülü A, Kırış T.** Eksitator Aminoasidler ve Eksitotoksisite. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 2005, 15(1): 33-38.

**Gözen O.** Glutamat Taşıyıcısı EAAT2'in Transkripsiyonu ve Regülasyonunun Kontrolü. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, 2008.

**Güney Y, Bilgehan A.** Ubikitin Sistem. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2002, 22, 616-620.

**Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM.** SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic  $\beta$  Cells. *Cell*, 2006, 941-954.

**Han Y, Zhou S, Coetzee S, Chen A.** SIRT4 and Its Roles in Energy and Redox Metabolism in Health, Disease and During Exercise. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 1006.

**Hirschey M.D, Zhao Y.** Metabolic Regulation by Lysine Malonylation, Succinylation, and Glutarylation. *Molecular&Cellular Proteomics*, 2015, 14(9): 2308-2315.

**Ho L, Titus AS, Banerjee KK.** SIRT4 regulates ATP homeostasis and mediates a retrograde signaling via AMPK. *Aging*, November 2013, Vol 5 N 11.

**Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet VV, Grutle NJ, Mylonakou MN, Plachez C, Zhou Y, Furness DN, Bergles DE, Lehre KP, Danbolt NC.** The Density of EAAC1 (EAAT3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian CNS. *J Neurosci*, 2012, 32(17): 6000-6013.

**Hu Y, Lin J, Lin Y, Chen X, Zhu G, Huang G.** Overexpression of SIRT4 inhibits the proliferation of gastric cancer cells through cell cycle arrest. *Oncology Letters*, 2019, 17: 2171-2176.

**Huang G, Zhu G.** Sirtuin-4 (SIRT4), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive activity in cancer. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 3395–3400.

**Jansen A. HP, Reits E. AJ, Hol E. M.** The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Molecular Neuroscience*, 2014, 7(73): 1-14.

**Jeong SM, Xiao C, Finley LWS, Lahusen T.** SIRT4 has tumor suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell*, 2013, April 15; 23(4): 450–463.

**José M, Alcaín V, Alcaín FJ.** Sirtuin activators and inhibitors. *Biofactors*, 2012, September, 38(5): 349–359.

**Kaeberlein M, McVey M, Guarente L.** The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.*, 1999, 13: 2570-2580.

**Kanai Y, Hediger MA.** The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol*, 2003, 479:237–247.

**Karaca M, Frigerio F, Maechler P.** From pancreatic islets to central nervous system, the importance of glutamate dehydrogenase for the control of energy homeostasis. *Neurochemistry International*, 2011, 59: 510–517.

**Khalil R.A.** Regulation of Vascular Smooth Muscle Function. Morgan ve Claypool Yaşam Bilimleri, 2010.

- Kim K, Lee SG, Kegelman TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB.** Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol*, 2011, 226(10): 2484-2493.
- Kincaid B, Wetzel E.** Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2013, 5(48): 1-13.
- Kritis A.A, Stamoula E.G, Paniskaki K.A, Vavilis T.D.** Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015, 9: 1-18.
- Kurul S, Gülmez Ö.** Nöroproteksiyon ve Nöron Koruyucu Ajanlar. DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 2007, 21(2): 119-130.
- Küçükaya B.** Glutamat/ NMDA Eksitotoksitesisi ile Serbest Radikal Oluşumu Arasındaki İlişkinin In Vitro ve Ex Vivo İncelenmesi, Marmara Üniversitesi Uzmanlık Tezi, İstanbul, 1997, 54.
- Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R.** The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5807-5811.
- Laurent G, German NJ, Saha AK.** SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell*, 2013 June 6; 50(5): 686-698.
- Lee SH, Lee JH, Lee HY, Min KJ.** Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Reports*, 2019, 52(1): 24-34.
- Lehre KP, Danbolt NC.** The Number of Glutamate Transporter Subtype Molecules at Glutamatergic Synapses: Chemical and Stereological Quantification in Young Adult Rat Brain. *The Journal of Neuroscience*, 1998, 18(21): 8751-8757.
- Li Y, Zhou Y, Wang F, Chen X, Wang C, Wang J, Liu T, Li Y, He B.** SIRT4 is the last puzzle of mitochondrial sirtuins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2018, 26(14): 3861-38657.
- Lin CL, Kong Q, Cuny GD, Glicksman MA.** Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Future Med Chem.*, 2012, 4(13): 1689-1700.
- Mamati T.** Glioblastoma Multiforme'de konkomitant ve Adjuvant Temozolomid'in Radyoterapiye Katkısı. Doktora Tezi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyasyon Onkolojisi Kliniği, İstanbul. 2006.
- Mitrovic A.D, Amara S.G, Johnston A.R.G, Vandenberg R.J.** Identification of Functional Domains the Human Glutamate Transporters EAAT1 and EAAT2. *Journal of Neurochemistry*, 1998, 273(24): 14698-14706.
- Mostoslavsky R, Chua K.F, Lombard D. B, Demple B, Yancopoulos G.D, Alt F.W.** Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell*, 2006, 124(2): 315-329.
- Nieoullon A, Canolle B, Mamejean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S.** The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse?. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 98(4): 1007-1018.

- Özdemir O, Özdemir-Güzel P.** Glutamat Sistemi ve Şizofreni. *Current Approaches in Psychiatry*, 2016, 8(4): 394-405.
- Peterson AR, Binder DK.** Post-translational Regulation of GLT-1 in Neurological Diseases and Its Potential as an Effective Therapeutic Target. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.2019, 12(164): 1-11.
- Purves D, Augustine G.J, Fitzpatrick D, Katz L.C, La Mantia A.S, McNamara J.O, Williams S.M.** Neuroscience 2001.
- Rimmele TS, Rosenberg PA.** GLT-1 The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem Int.*, 2016, 98: 19-28.
- Robinson MB, Jackson JG.** Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochem Int.*, 2016, 98: 56-71.
- Sheldon AL, González MI, Krizman-Genda EN, Susarla B.TS, Robinson MB.** Ubiquitination-Mediated Internalization and Degradation Of The Astroglial Glutamate Transporter, Glt-1. *Neurochem Int.*, 2008, 53(6-8), 296-308.
- Sheldon AL, Robinson MB.** The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.*, 2007, 51(6-7), 333-355.
- Shih J, Liu L, Mason A, Higashimori H, Donmez G.** Loss of SIRT4 decreases GLT-1-dependent glutamate uptake and increases sensitivity to kainic acid. *J. Neurochem*, 2014, doi: 10.1111/jnc.12942.
- Soni N, Reddy BV, Kumar P.** GLT-1 transporter: An effective pharmacological target for various neurological disorders. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 127, 70-81.
- Sontheimer H.** A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *J Neurochem*, 2008, 105(2), 287-295.
- Susarla B.TS, Robinson M.B.** Internalization and Degradation of the Glutamate Transporter GLT-1 in Response to Phorbol Ester. *Neurochem Int.*, 2008, 52(4-5), 709-722.
- Şen M, Ay U, Akbayır E, Şenyer S, Tüzün. E, Küçükali Cİ.** NF-kB, SUMO ve Ubikitinasyon İlişkisi. *Deneysel Tıp Dergisi*, 2017, 13(7). 35-46.
- Tardón-García N, González-González IM, Martínez-Villarreal J, Fernández-Sánchez E, Giménez C, Zafka F.** Protein Kinase C (PKC)-promoted Endocytosis of Glutamate Transporter GLT-1 Requires Ubiquitin Ligase Nedd4-2-dependent Ubiquitination but Not Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(23): 19177-87.
- Thomas S.J, Grossberg G.T.** Memantine: a review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Interv Aging*, 2009, 4: 367-377.
- Tüfekçi M, Tunalı E.N.** Huntington Hastalığında Toksikite Mekanizmaları ve NMDAR-Aracılı Eksitotoksistede Poliaminlerin Rolü. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 2012, 32(1): 201-13.
- Varshavsky A.** The early history of the ubiquitin field. *Protein Sci*. 2006, 15(3): 647-654.
- Verdin E, Hirschev MD, Finley L-WS, Haigis MC.** Sirtuin Regulation of Mitochondria– Energy Production, Apoptosis, and Signaling. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(12): 669-675.



**Wang Y, Wang Y, Zhang H, Gao Y, Huang C, Zhou A, Li Y.** Sequential posttranslational modifications regulate PKC degradation. *Mol Biol Cell.* 2016, 15;27(2): 410-20.

**Yalcin A.** Posttranslasyonel Modifikasyon ve Protein Fonksiyonu. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 2012, 31(1): 29-37.

**Yalcin G.** Sirtuins and Neurodegeneration. *J Neurol Neuromed.* 2018, 3(1): 13-20.

**Yüksel M.** Nörodejeneratif Hastalıkların Patogenezinde Serbest Radikallerin Rolünün İncelenmesi, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001, 105.

**Zhang Y, Tan F, Xu P, Qu S.** Recent Advance in the Relationship between Excitatory Amino Acid Trensporter and Parkinson's Disease. *Neural Plasticity.* 2016, Article ID 8941327, 1-8.

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : DAĞDELEN Düriye Nur  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : Antalya / 16.05.1995  
**E-mail** : [dry.nur.07@gmail.com](mailto:dry.nur.07@gmail.com)  
**Yabancı Dil** : İngilizce

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Karamanoğlu Mehmetbey	2020
Lisans	Üniversitesi Biyomühendislik	2018

### İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2015-2016	Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı	Stajyer (Gönüllü)
2016-2017	Ziraat Fakültesi/ Akdeniz Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı	Stajyer