

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**GLİOBLASTOMA PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNDE  
SIRT4'ÜN GLUTAMAT METABOLİZMASI İLE  
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ VE POTANSİYEL TÜMÖR  
BASKILAYICI ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ayşenur AKKULAK  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF20031 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2022**

## **KABUL VE ONAY**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi, deneyimi, yol göstericiliği, anlayışı ve sabrı ile bana destek olan, yapılan çalışma ile sınırlı kalmayıp hayatımda da çok güzel izler bırakan, aynı anda hem güçlü ve çalışkan hem de adaletli ve vicdanlı olmayı başaran, çok saygı duyduğum, örnek aldığım sevgili danışmanım Prof. Dr. Gizem Dönmez Yalçın'a,

Gerek ders, gerekse tez döneminde kendisinden çokça şey öğrendiğim, çalışmalarda bilgi ve birikimiyle desteğini esirgemeyip bizlere ışık tutan, çok saygı duyduğum sevgili hocam Prof. Dr. Abdullah Yalçın'a,

Tez çalışmam boyunca her yardıma ihtiyacım olduğunda tecrübelerini benimle paylaşan, Arş. Gör. Dr. Umut Kerem Kolaç'a,

Bugünlere gelmemde, yetişmemde büyük emekleri olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olup beni motive eden, haklarını asla ödeyemeyeceğim aileme,

Lisans dönemimde hayatıma giren her konuda her zaman destek olan ve dostluğuyla kız kardeşim gibi hissettiren İrem Karacan'a ve Nurten Akarca'ya,

Yüksek lisans dönemimin son zamanlarında hayatıma giren bana destekleri ile yakınım dostum olan Elif Bayrak'a ve Emre Yeşilören'e, ve tecrübesi ile her yardım istediğimde yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Bakiye Göker Bağca'ya,

Hayatımda olduğu ilk andan beri her iyi ve kötü zamanlarımda, her zorluğumda, başarılarımda büyük desteği ve sevgisi ile yanımda olan arkadaşım, sevgilim, canım Emre Kambur'a teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
TABLolar DİZİNİ .....	viii
ÖZET .....	ix
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM) .....	5
2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması .....	6
2.1.1.1. Glioblastoma.....	7
2.1.1.2. Medulloblastoma .....	8
2.1.1.3. Oligodendroglioma .....	8
2.1.1.4. Ependimoma .....	9
2.1.1.5. Menengioma .....	10
2.1.1.6. Astrositoma .....	11
2.2. Glutamata Bağlı Eksitotoksisite .....	12
2.2.1. Eksitotoksisite Nasıl Meydana Gelir? .....	12
2.3. Glutamat .....	13
2.4. Glutamat Metabolizması.....	14
2.5. Glutamat Döngüsü.....	14
2.6. Glutamat Reseptörleri.....	15

2.6.1. Metabotropik Glutamat Reseptörleri (mGLuR) .....	16
2.6.2. İyonotropik Glutamat Reseptörleri (iGluR) .....	17
2.6.2.1. NMDA (N-Metil-D-Aspartat) Reseptörleri .....	18
2.6.2.2. AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit) Reseptörleri .....	18
2.6.2.3. Kainat Reseptörleri .....	19
2.7. Glutamat Taşıyıcıları .....	19
2.7.1. Eksitator Amino Asit Taşıyıcıları (EAAT'ler).....	20
2.7.2. Vesiküler Glutamat Taşıyıcıları (VGLUT'lar) .....	21
2.8. Glutamat Dehidrogenaz (GDH).....	22
2.9. Glutamin Sentetaz (GS).....	25
2.10. Glioblastoma ve Eksitotoksosite Arasındaki İlişki.....	26
2.10.1. Glioblastomalarda Nekrozun Fizyolojik Mekanizması.....	27
2.11. Sirtuinler (Sirt).....	29
2.11.1. Sirtuin 4 (SIRT4) .....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Gereç.....	34
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	34
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	34
3.2. Yöntem .....	35
3.2.1. Gen İfadesi Değişim Analizleri .....	36
3.2.1.1. Total RNA İzolasyonlarının Yapılması .....	36
3.2.1.2. RNA'nın Saflık ve Kalite Kontrolünün Yapılması .....	38
3.2.1.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinin Gerçekleştirilmesi .....	38
3.2.1.4. Real Time PCR (RT-PCR) .....	39
3.2.2. İstatistiksel Analiz .....	41
4. BULGULAR .....	42

4.1. SIRT4'ün İntrakraniyel Primer Tümör Dokularındaki Gen İfadesinin Belirlenmesi.....	42
4.2. Glutamin Sentetaz (GS)'nin İntrakraniyel Primer Tümör Dokularındaki Gen İfadesinin Belirlenmesi .....	43
4.3. GDH'ın İntrakraniyel Primer Tümör Dokularındaki Gen İfadesinin Belirlenmesi.....	45
5. TARTIŞMA .....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR .....	52
EKLER .....	66
Ek 1. Etik Kurul Karar Formu .....	66
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	68
ÖZ GEÇMİŞ.....	69

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADP</b>	: Adenozin Difosfat
<b>AH</b>	: Alzheimer Hastalığı
<b>ALS</b>	: Amiyotrofik Lateral Skleroz
<b>AMPA</b>	: $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
<b>ASCT</b>	: Alanin Serin Sistein Taşıyıcıları
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Monofosfat
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EAAT</b>	: Eksisatör Aminoasit Taşıyıcısı
<b>EAAT-2</b>	: Eksisatör Aminoasit Taşıyıcı 2
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>GBM</b>	: Glioblastoma Multiforme
<b>GDH, GLDH</b>	: Glutamat Dehidrojenaz
<b>Gln</b>	: Glutamin
<b>GLT-1</b>	: Glutamat Taşıyıcısı 1
<b>GluR1</b>	: Glutamat Reseptörü 1
<b>GluR2</b>	: Glutamat Reseptörü 2
<b>GluR3</b>	: Glutamat Reseptörü 3
<b>GluR4</b>	: Glutamat Reseptörü 4
<b>GS</b>	: Glutamin Sentetaz
<b>GTP</b>	: Guanosin-5'-trifosfat
<b>HH</b>	: Huntington Hastalığı

<b>IDH</b>	: izositratdehidrojenaz
<b>K</b>	: Potasyum
<b>MCD</b>	: Malonil CoA Dekarboksilaz
<b>mGLuR</b>	: Metabotropik Glutamat Reseptörleri
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>mTORC1</b>	: Rapamisin Kompleksi
<b>Na</b>	: Sodyum
<b>NAD</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NADH</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidrit
<b>NADP</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>NMDA</b>	: N-metil D-aspartat
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PH</b>	: Parkinson Hastalığı
<b>qPCR</b>	: Kantitatif PCR
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>RT PCR</b>	: Real Time PCR
<b>SIRT</b>	: Sirtuin
<b>SIRT1</b>	: Sirtuin 1
<b>SIRT3</b>	: Sirtuin 3
<b>SIRT4</b>	: Sirtuin 4
<b>SIRT5</b>	: Sirtuin 5
<b>SIRT6</b>	: Sirtuin 6
<b>SIRT7</b>	: Sirtuin 7
<b>Sistem xc</b>	: Sistein/Glutamat Antiporter Sistemi
<b>TCA</b>	: Trikarboksilik Asit



**VGLUT** : Vesiküler Glutamat Taşıyıcıları

**WHO** : World Health Organization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 4 farklı GBM hastasının beyin görüntüsü.....	6
Şekil 2. WHO'ya göre MSS tümörlerinin derecelendirilmesi .....	7
Şekil 3. Glutamat döngüsü.....	13
Şekil 4. Glutamin-glutamat döngüsü.....	15
Şekil 5. Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması .....	16
Şekil 6. NMDA reseptörünün yapısı.....	18
Şekil 7. GDH Düzenlenmesi.....	24
Şekil 8. Glioblastomadaki glutamat eksitotoksitesine bağlı nekroz mekanizması.....	28
Şekil 9. İntrakraniyel primer tümör dokularında SIRT4 gen ifade analizi.....	43
Şekil 10: İntrakraniyel primer tümör dokularında GS gen ifade analizi .....	45
Şekil 11. İntrakraniyel primer tümör dokularında GDH gen ifade analizi.....	47

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> mGlu reseptörler alt tiplerinin sınıflandırılması. ....	17
<b>Tablo 2.</b> Sirtünlerin lokasyonları, aktivitesi ve patolojileri.....	30
<b>Tablo 3.</b> Hasta Özellikleri .....	35
<b>Tablo 4.</b> Komplementer DNA (cDNA) reaksiyon şartları. ....	39
<b>Tablo 5.</b> Deneyde kullanılan primer baz dizileri.....	40
<b>Tablo 6.</b> qPCR reaksiyon şartları. ....	40

## ÖZET

### GLİOBLASTOMA PRİMER BEYİN TÜMÖRLERİNDE SIRT4'ÜN GLUTAMAT METABOLİZMASI İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ VE POTANSİYEL TÜMÖR BASKILAYICI ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Akkulak A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.

**Amaç:** Eksitotoksisite; glutamatın, fazla salınım veya bozulmuş geri alım nedeniyle nöronlar arası boşlukta birikme durumudur. Eksitotoksisite birçok beyin hastalığında rol oynar. Nöronlar arası boşluğa salınan glutamata, astrositlerde bulunan GLT-1 (Glutamat Transporter 1) toplar. Glutamatın bir kısmı, astrositlerde glutamat dehidrogenaz (GDH) tarafından  $\alpha$ -ketoglutarata çevrilir ve TCA siklusuna girer. İkinci bir yol olarak; glutamat, astrositlerde glutamin sentetaz (GS) tarafından glutamine çevrilir. Glutamin, tekrar glutamaterjik nörona geçerek bu döngüyü sürdürür.

**Gereç ve Yöntem:** Glioblastoma Multiform (GBM), tüm birincil beyin ve merkezi sinir sistemi neoplazilerinin %16'sını oluşturan, en yaygın birincil kötü huylu beyin tümörüdür. Glioblastomada, nöronların, eksitotoksisite yolu ile öldüğü bilinmektedir. Glutamat alımından çoğunlukla Glutamat Transporter 1 (GLT-1) diğer adıyla Eksitator Amino Asit Taşıyıcısı 2 (EAAT2) sorumludur. EAAT2'nin aktivitesinin azalması, glutamat birikimine yol açar. Bu birikim, hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunda yükselme ve hücre ATP seviyelerinde azalma yolunu takip ederek glutamat eksitotoksisitesine ve nöronların olası nekrozuna sebep olur.

**Bulgular:** Sirtuinler, proteinleri deasetilasyon veya ADP-ribosilasyon yoluyla posttranslasyonel olarak modifiye eden; çekirdek, mitokondri veya sitoplazmada ifade edilen enzimlerdir. Sirtuin 4 (SIRT4), beyinde de ifade edilen bir mitokondriyal sirtuindir. Daha önce, SIRT4'ün farede delesyonunun, bir eksitotoksik ajan olan kainik aside karşı hassasiyeti arttırdığı ve GLT-1'e bağlı glutamat alımını azalttığı gösterilmiştir. Yapılan

diğer çalışmalarda ise SIRT4'ün, hücre dizilerinde, glutamate metabolizmasını modüle ederek, eksitotoksisiteyi engellediği gösterilmiştir.

Glutamat metabolizması modölatörlerinin glioblastoma tümörlerindeki ifadesinin belirlenmesi; hastalığın tespiti, prognozu, mekanizması ve ilerleyişini anlamak için yol gösterici olacaktır.

**Sonuç:** Bu çalışmada 84 adet primer tümörlü beyin dokusu (parafinli kesit), 12 adet kontrol beyin dokusu (parafinli kesit) alınmıştır. Parafinli doku kesitlerinden, RNA izolasyon kiti kullanılarak ve protokole uyularak total RNA çıkarılmıştır. Nanodrop ile RNA konsantrasyonları ve kalitesi ölçüldükten sonra cDNA sentez kiti kullanılarak ve verilen protokole uyularak cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA, glutamat dehidrojenaza (GDH), glutamin sentetaz (GS) ve Sirtuin4 (SIRT4)'e özgü primerler kullanılarak ve qPCR (quantitative PCR-kuantitatif polimer zincir reaksiyonu) kit protokolüne uyularak mRNA elde etme işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen GDH, GS ve SIRT4 mRNA'ları, beta aktin mRNA'sına oranlanarak normalleştirilmiştir. Daha sonra istatistiksel analizde iki örnek grubunun ortalamaları arasındaki fark için Two-Tailed Unpaired, Student's t-test kullanılmıştır. Grup sayısı üç ve üzerinde olan durumlar için ise OneWay ANOVA testi kullanılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Glutamat Dehidrojenaz, Glutamin Sentetaz, Glioblastoma, SIRT4, Eksitotoksisite

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN SIRT4 AND THE GLUTAMATE METABOLISM AND ITS TUMOR SUPPRESSING POTENTIAL IN GLIOBLASTOMA PRIMARY TUMOR TISSUES

**Akkulak A. Aydin Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Medical Biology Program, Master's Thesis, Aydin, 2022.**

**Objective:** Accumulation of excess glutamate in the space between nerve cells is called excitotoxicity. Excitotoxicity plays a role in many brain diseases. Glutamate released into the interneuronal space is collected by GLT-1 (Glutamate Transporter 1) found in astrocytes. Some of the glutamate is converted to  $\alpha$ -ketoglutarate by glutamate dehydrogenase (GDH) in astrocytes and enters the TCA cycle. As a second pathway, glutamate is converted to glutamine by glutamine synthetase (GS) in astrocytes. Glutamine completes this cycle by entering into the glutamatergic neuron.

**Material and Metedos:** Glioblastoma Multiform (GBM) is the most common primary malignant brain tumor, accounting for 16% of all primary brain and central nervous system neoplasms. In glioblastoma, neurons are known to die by excitotoxicity. Glutamate Transporter 1 (GLT-1), also known as Excitatory Amino Acid Transporter 2 (EAAT2), is mostly responsible for glutamate uptake. Decreased activity of EAAT2 leads to accumulation of glutamate. This accumulation leads to glutamate excitotoxicity and possible necrosis of neurons, due to a large increase in intracellular  $Ca^{+2}$  and a decrease in cellular ATP levels.

**Results:** Sirtuins are enzymes that posttranslationally modify proteins by deacetylation or ADP-ribosylation and are expressed in the nucleus, mitochondria, or cytoplasm. Sirtuin 4 (SIRT4) is a mitochondrial sirtuin that is also expressed in the brain. It has previously been shown that SIRT4 deletion in the mouse increases susceptibility to the excitotoxic agent, kainic acid, and reduces GLT-1-dependent glutamate uptake. In other studies, it has been shown that SIRT4 prevents excitotoxicity by modulating glutamate metabolism in cell lines.

The expression of glutamate metabolism modulators in glioblastoma tumors will be a guide to understand the detection, prognosis, mechanism and progression of the disease.

**Conclusion:** In this study, 84 primary tumor brain tissues (paraffinic sections) and 12 control brain tissues (paraffinic sections) were used. Total RNA was extracted from paraffin tissue sections using the RNA isolation kit by following the protocol provided. The RNA concentration and the quality were measured using the Nanodrop. Then, cDNAs were obtained using the cDNA synthesis kit by following the given protocol. The mRNA was transcribed from the obtained cDNA using primers specific to glutamate dehydrogenase (GDH), glutamine synthetase (GS) and Sirtuin 4 (SIRT4) by following the qPCR (quantitative PCR-quantitative polymer chain reaction) kit protocol. The GDH, GS and SIRT4 mRNA obtained was normalized to the beta actin mRNA. Then, Two-Tailed Unpaired, Student's t-test was used for the difference between the means of the two sample groups for the statistical analysis, One Way ANOVA test was used for cases with three or more groups.

**Keywords:** Glutamate Dehydrogenase, Glutamine Synthetase, Glioblastoma, SIRT4, Excitotoxicite

# 1. GİRİŞ

Sinir hücrelerinin diğer başka hücelere sinyal olarak gönderdiği kimyasallara nörotransmitter denir. (Meldrum BS. 2000). Glutamat beyinde öğrenme ve hafıza gibi bilişsel işlevlerde görev yapan ve seviyesi kritik öneme sahip olan bir nörotransmitterdir. (Meldrum BS. 2000). Eksitotoksisite; glutamatın, fazla salınım veya bozulmuş geri alım nedeniyle nöronlar arası boşlukta birikme durumudur (Karaca M, ve ark. 2011). Eksitotoksisite, epilepsi, felç ve nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer Hastalığı (AH), Parkinson Hastalığı (PH), Huntington Hastalığı (HH), Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS)) gibi beyin hastalıkların ile glioblastoma gibi beyin tümörlerinde görülür (Sontheimer, 2008). Glioblastoma multiforme, WHO sınıflandırmasına göre 4. evre histolojik malignitenin bir merkezi sinir sistemi tümörüdür. Yaşa göre ortalama insidans oranı 100.000 nüfus başına 3,2'dir (Davis M.E. 2016). Glioblastoma Multiforme yalnızca beyinde meydana gelmesine rağmen, beyin sapı, beyincik ve omurilikte de görülebilmektedir. Başlangıçta, GBM'lerin yalnızca glial hücrelerden oluştuğu düşünülüyordu; ancak kanıtlar bunların nöronal kök hücre benzeri özelliklere sahip çok sayıda hücre tipinden türeyebileceğini göstermektedir (Davis M.E. 2016).

Birçok çalışma, glioma hücrelerinin eksitotoksik seviyede glutamat salgıladığı ve glutamat reseptörlerini de ifade edebileceği fikrini desteklemektedir (Michael C, ve ark. 2012).

Eksitotoksik hücre ölümündeki rolü dikkate alındığında, glutamat, glioblastomadaki nekroz zincirinde anahtar bir faktör gibi görünmektedir. Çünkü glioblastomada nöronlar eksitotoksisite yoluyla nekroza uğrayarak ölmektedir (Noch E, ve ark. 2015). Glioblastomada glutamat aracılı nekrozun mekanizması belirsizliğini korumaktadır, ancak glutamat alım yolunun birkaç anahtar bileşeni, nekrotik hücre ölümünün belirli fizyolojik yönlerinde rol oynamıştır (Noch E, ve ark. 2015).

Glutamat eksitotoksisitesinin bir sonucu olarak hücre ölümüne neden olan iki yol vardır. Birinci yol, iyonotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonunu, ardından kalsiyum homeostazındaki değişiklikleri ve reaktif oksijen türü hasarından kaynaklı nihai hücre ölümünü içerir. Bu yolun nekroza yol açtığı öne sürülmüştür (Noch E, ve ark. 2015). İkinci yol, yetersiz hücre içi sistin ile sonuçlanan, xc sisteminin (Sistein/Glutamat Antiporter



Sistemi) glutamat aracılı inhibisyonunu içerir. Bu eksiklik, sistinin hücre içinde sistine indirgenmesini önler ve sonuçta glutatyon üretiminde bozulma olur. Etkilenen hücreler, nötrleştirilemeyen reaktif oksijen radikalleri biriktirir. Bu radikaller, endoplazmik retikulum gibi hücre içi depolardan  $Ca^{2+}$  salınımını arttırır ve büyük oranda ATP tükenmesine, membran oksidasyonuna ve nekroza neden olur (Noch E, ve ark. 2015).

Nekroz, glioblastoma durumunda önemli bir belirleyici etkidir. Elektron taşıma zincirinin çökmesi ve ardından oksidatif fosforilasyonun azalması sonucunda aniden hücre ATP'nin tükenmesi glioblastomadaki nekroz yolunu başlatır (Noch E, ve ark. 2015). Bu ATP eksikliği,  $Na^+$  akışından büyük bir hücre hacmi artışı başlatan ATP'ye bağlı iyon kanallarının ve pompalarının başarısızlığına yol açar. Hücre içi  $Na^+$  konsantrasyonu artar ve hücre ATP'yi tüketen  $Na^+ -K^+ -ATPaz$ 'ın aktivasyonu ile sonuçlanır (Noch E, ve ark. 2015). Bu tükenme, seçici olmayan  $Ca^{2+}$  kanallarının açılmasına yol açarak, hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyelerinin yükselmesine neden olur ve sonucunda mitokondriyal depolarizasyon ile  $Ca^{2+}$ -ATPaz'ın aktivasyonuna yol açar. Ek olarak, ATP tükenmesi ile birlikte,  $K^+$  akışı iyonik homeostazı korumaz, bu da hücre bozulmayı hızlandırır, bunun sonucunda daha fazla  $Na^+$  ve su akışı meydana gelir. Hücre zarı yırtılır, hücrenin içeriği hücre dışı boşluğa salınır (Noch E, ve ark. 2015).

Glutamat eksitotoksitesi durumunda, apoptotik yolak aktivasyonunun işlevsel glutamat alımında bozulmaya yol açabileceği ve bu yolların herhangi biri yoluyla nekrotik hücre ölümünü hızlandırabileceği de gösterilmiştir. Bununla birlikte, hastalığın ilerleyişini etkileyen, sadece moleküler yol değil, nekrozla ilgili morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler olabileceği düşünülmüştür (Noch E, ve ark. 2015).

Glutamat dehidrojenaz (GLDH, GDH), tüm organizmalarda bulunur ve glutamata  $\alpha$ -ketoglutarata dönüştüren bir enzimdir (Mc. Kenna ve ark. 2016). Koenzim olarak  $NAD(P)^+$  kullanır. (Hong Q. Smith ve ark. 2019). GDH'nin termodinamik dengesi  $\alpha$ -ketoglutaratın glutamata indirgeyici aminasyonu için gereken enerjiyi sağlamasına rağmen, mitokondrideki  $NAD^+/NADH$  oranı ve amonyak için yüksek  $K_m$  beyindeki oksidatif deaminasyonunu destekler/sağlar. (Mc. Kenna ve ark. 2016).

Çok fazla nöronal GDH1 ekspres eden transgenik hayvanlar, Alzheimer hastalığı patolojisine benzer şekilde CA1 hipokampal bölgesinde yaşa bağlı dejenerasyon gösterirler. Bu yüzden, beyin fonksiyonlarının sağlıklı gelişmesi için GDH'nin düzgün bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir (Smith H.Q, ve ark. 2019).

Glutamin sentetaz (GS), glutamat ve amonyağı glutamine dönüştüren bir katalizördür ve beyinde astrositlerde ifade edilir. Nöronları eksitotoksisiteden korumak için glutamat seviyesini düzenler. (Go Woon Kim ve ark. 2021). GS korunmuş bir gen tarafından kodlanır. GS birçok amino asitin, pürin ve pirimidinlerin biyosentezi için önemli bir enzimdir. GS'nin, amonyak ve glutamat detoksifikasyonu, pH dengesinde ve hücre sinyal iletiminde anahtar bir rolü mevcuttur. İnsan karaciğerinde, beyinde ve kasta glutamin sentetaz aktivitesi yüksek seviyelerde bulunur. (Vermeulen T, ve ark. 2008).

GS en çok beyinde astrositler olarak bilinen glial hücrelerde bulunur. Astrositler, nöronları eksitotoksisiteye karşı korumak ile görevlidir. Fazla biriken amonyağın ve glutamatın, GS tarafından katalize edilerek glutamine dönüştürülmesini sağlarlar. GS'nin aktivitesinin hasara uğraması, Alzheimer hastalığı, epilepsi, glioblastoma multiforme, anksiyete ve depresyon gibi nörolojik hastalıklara yol açar (Yamashita M, ve ark. 1989).

Sirtuinler, yaşa bağlı hastalıklara karşı koruyucu etkileri olan NAD<sup>+</sup> bağımlı enzimlerdir. Nörodejeneratif hastalıklarda yaşlanma ortak risk faktörüdür (Dönmez G. 2012). Sirtuinler, nörodejeneratif hastalıklarda, protein agregasyonu, stres cevabı ve inflamatuvar süreçlerinde rol oynarlar. Bu nedenle sirtuinler nörodejenerasyonda ve dolayısıyla sinir sisteminde araştırılmışlardır. (Dönmez G. 2012). Nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere, kompleks hastalıkların tedavisi için olası hedefler olarak sirtuin ailesinin enzimleri potansiyel hedef olarak görülmektedir. (Carafa V, ve ark. 2016).

Sirtuin 4 (SIRT4), glial bir proteindir ve beyinde ifade edilir. SIRT4, bir ADP-ribosil-transferaz ve lisin deasetilaz olarak görev yapmaktadır (Huang G, ve ark. 2018). SIRT4'ün beyindeki işlevi tam olarak bilinmemektedir (Shih J, ve ark. 2014). Fakat yapılan çalışmalar bize SIRT4'ün, glutamat metabolizmasını düzenlediğini ve eksitotoksisiteyi önlediğini göstermiştir (Dönmez Yalçın ve Çolak 2020). Ayrıca SIRT4, glutamin dehidrojenaz ve glutamin sentetazın modülatörüdür. (Dönmez Yalçın ve Çolak 2020).

SIRT4'ün ilk başta glutamat dehidrojenaz (GDH) aktivitesini azalttığı ve böylece pankreas  $\beta$  hücrelerinde insülin salgısını engellediği bulunmuştur (Min Z, ve ark. 2019). GDH'nin glutamin metabolizmasını ve ATP üretimini kolaylaştırdığı ve bunun sonucunda insülin salgısını arttırdığı bilinmektedir (Min Z, ve ark. 2019).

Glutamat metabolizması modülatörlerinin ve SIRT4'ün, glioblastoma tümörlerindeki ifadesinin belirlenmesi; hastalığın tespiti, prognozu, mekanizması ve ilerleyişini anlamak için yol gösterici ve biomarker olabilme potansiyeline sahiptir.

Bu çalışmada, amaç, primer tümörlü beyin dokularında bulunan ve ayrıca eksitotoksistide görev alan glutamat dehidrogenaz ve glutamin sentetaz enzimlerinin, qPCR yöntemi kullanarak, ifade seviyelerini ölçmektir. Ayrıca, GDH ve GS'nin modülatörü olan SIRT4'ün de glutamat metabolizmasındaki rolünü ve bu enzimlerle ilişkisini araştırmak bu çalışmanın amaçlarından biridir.

## 2. GENEL BİLGİLER

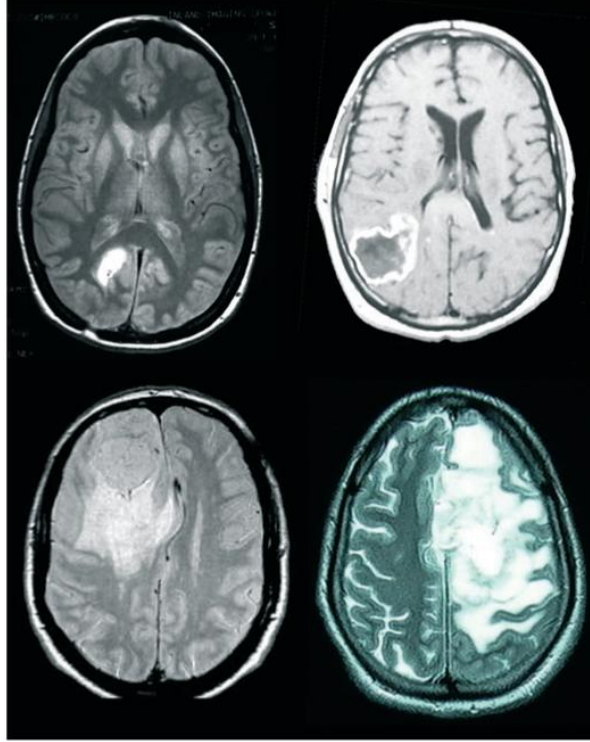
### 2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)

Glioblastoma Multiforme (GBM) en yaygın kötü huylu beyin tümörüdür. Ortalama yaşa göre insidans oranı 100.000 nüfus başına 3,2'dir. GBM'lerin sadece beyinde oluştuğu bilinse de, beyincik, beyin sapı veya omurilikte de oluştuğu görülebilir. GBM'lerin yalnızca glial hücrelerden meydana geldiği düşünülmekte idi fakat artan kanıtlar bunların nöronal kök hücre benzeri özelliklere sahip hücre tipinden kaynaklanabileceğini ortaya koydu (Davis M. E. 2016). Primer beyin tümörlerinde en yaygın grup olan gliomalar arasında astrositomalar, oligodendrogliomalar ve ependimomalar bulunur. Ortalama tanı yaşı 64'tür ve erkeklerde kadınlara göre 1,5 kat, beyaz ırkta siyah ırka göre 2 kat daha yaygındır. Gelişmiş radyolojik tanı nedeniyle, özellikle yaşlılarda, insidans oranı son 20 yılda artmıştır (Alifieris C, ve ark. 2015).

Klinik olarak GBM'li hastalarda belirtiler; baş ağrısı, fokal nörolojik defisitler, konfüzyon, hafıza kaybı, kişilik değişiklikleri veya nöbetler ile başlar. Etiyolojik olarak, GBM'de çevresel risk faktörleri, radyasyona maruz kalma, vinil klorür, pestisitler, sigara içme, petrol rafinasyonu veya üretim işi ve sentetik kauçuk üretiminde istihdam gibi risk faktörleri vardır. Tüm tedavi etme çabalarına rağmen, tedavi edilemez bir hastalık olarak kalmıştır (Alifieris C, ve ark. 2015).

GBM'de standart yaklaşım, tümör dokunun cerrahi yöntemlerle dikkatli bir şekilde çıkarılmasıdır. Tümörün çıkarılamayacağı düşünülüyorsa radyasyon tedavisi veya kemoterapi uygulanır (Alifieris C, ve ark. 2015). GBM'nin kapsamlı ve tam cerrahi yöntemlerle çıkarılması zordur çünkü bu tümörler sıklıkla invazivdir ve genellikle beynin konuşmayı, motor fonksiyonunu ve duyarları kontrol eden alanlar gibi önemli bölgelerinde bulunurlar. Yüksek derecede invazivlik nedeniyle, tümör hücreleri her zaman beyinde kalır ve daha sonra hastalığın ilerlemesine veya tekrar nüksetmesine yol açar (Şekil 1) (Davis M. E. 2016).

GBM'de nekroz ayırt edici bir özelliktir ve bir beyin tümörünün evre IV olması veya Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırma sisteminde bir GBM olarak sınıflandırılması için nekroz varlığı gereklidir (Şekil 1) (Davis M. E. 2016).



**Şekil 1.** 4 farklı GBM hastasının beyin görüntüsü. (Gliomanın büyüyerek yayılması gösterilmiştir. Sontheimer H.(2008) 'den alınmıştır.)

### **2.1.1. Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması**

Dünya sağlık örgütü, tümörleri nüks durumu ve tümörün malinitesine göre farklı sınıflara ayırmaktadır. Bu sınıflandırma en son 2016 yılında yapılmıştır (Şekil 2) (David N. Louis ve ark. 2016). Piloitik astrositoma 1. evre olarak sınıflandırılır ve genellikle çocuklukta görülür (Kamila M. Bond ve ark. 2017). Difuz astrositomalar ise evre 2, 3 veya 4 olabilir. Evresi düşük olan tümörlerin zaman geçtikçe evreleri artar ve bu tümörler agresif malign özellik gösterir (Kamila M. Bond ve ark. 2017). En yaygın glioma GBM'dir (WHO evre IV), tüm primer beyin tümörlerinin % 45-50'sini oluşturmaktadır (Aldape K. ve ark. 2015).

WHO grades of select CNS tumours			
<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>			
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III	Papillary glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV	Rosette-forming glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-mutant	IV	Central neurocytoma	II
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV	Extraventricular neurocytoma	II
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II	Cerebellar liponeurocytoma	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III	<b>Tumours of the pineal region</b>	
<b>Other astrocytic tumours</b>		Pineocytoma	I
Pilocytic astrocytoma	I	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III
Subependymal giant cell astrocytoma	I	Pineoblastoma	IV
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	Papillary tumour of the pineal region	II or III
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III	<b>Embryonal tumours</b>	
<b>Ependymal tumours</b>		Medulloblastoma (all subtypes)	IV
Subependymoma	I	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV
Myxopapillary ependymoma	I	Medulloepithelioma	IV
Ependymoma	II	CNS embryonal tumour, NOS	IV
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV
Anaplastic ependymoma	III	CNS embryonal tumour with rhabdoid features	IV
<b>Other gliomas</b>		<b>Tumours of the cranial and paraspinal nerves</b>	
Angiocentric glioma	I	Schwannoma	I
Chordoid glioma of third ventricle	II	Neurofibroma	I
<b>Choroid plexus tumours</b>		Perineurioma	I
Choroid plexus papilloma	I	Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV
Atypical choroid plexus papilloma	II	<b>Meningiomas</b>	
Choroid plexus carcinoma	III	Meningioma	I
<b>Neuronal and mixed neuronal-glioma tumours</b>		Atypical meningioma	II
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I	Anaplastic (malignant) meningioma	III
Gangliocytoma	I	<b>Mesenchymal, non-meningothelial tumours</b>	
Ganglioglioma	I	Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III
Anaplastic ganglioglioma	III	Haemangioblastoma	I
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I	<b>Tumours of the sellar region</b>	
		Craniopharyngioma	I
		Granular cell tumour	I
		Pituitary tumour	I
		Spindle cell oncocyoma	I

Şekil 2. WHO'ya göre MSS tümörlerinin derecelendirilmesi. (David N. Louis ve ark. (2016)'dan alınmıştır.)

### 2.1.1.1. Glioblastoma

Glioblastoma yani glioblastoma multiforme (GBM), IV. evre bir gliomadır ve en agresif, primer malign tümör olarak karakterize edilir (Guan X. ve ark. 2018). Standart tedavi, hastaların genel sağkalımını iyileştirmeyen radyasyon tedavisi ve temozolomid (TMZ) kemoterapisi ile birlikte cerrahi rezeksiyon içerir (Rezaei V. ve ark. 2020).

GBM, erkeklerde ve yaşlı bireylerde daha sık görülmekte olup sporadik olarak ortaya çıkar (Ohgaki H., Kleihues P. 2005). Yaygın semptomlar; nöbetler, baş ağrıları, mide bulantısı, kusma, hafıza kaybı, kişilik, ruh hali, konsantrasyon değişiklikleri ve lokalize nörolojik sorunları içerir (Alifieris C., Trafalis D. T. 2015).

2006'daki WHO sınıflandırması histopatolojik değerlendirme sonucuyla yapılmıştır, ancak 2016'daki son sınıflandırmada IDH (izositrat dehidrojenaz) mutasyonunun varlığı

dikkate alınmıştır (Şekil 2) (Ohgaki H., Kleihues P. 2013). IDH wild type (vahşi tip) mutasyonu görülen tümörlü dokuya sahip bireylerde hastalık, primer glioblastoma olarak bilinmekte olup sıklıkla yaşlılarda görülmektedir. IDH-mutant glioblastoma ise daha çok, genç ve orta yaşlı bireylerde rastlanmaktadır (Ohgaki H., Kleihues P. 2013). Maksimum tedaviye rağmen kanser neredeyse her zaman tekrarlamaktadır (Gallego O. 2015).

### **2.1.1.2. Medulloblastoma**

Medulloblastoma, ortalama yaş 3 ile 7 arasında olan en yaygın malign pediatrik beyin tümörüdür. Beynin arkaya ve aşağıya doğru olan kısmından, kafatasının tabanından, beyincikten veya arka fossadan kaynaklanır (Roussel M.F.; Hatten M.E. 2011).

Medulloblastomalı bireylerde CTNNB1, PTCH1, MLL2, SMARCA4, DDX3X, CTDNEP1, KDM6A ve TBR1 genlerinde tekrarlayan mutasyonlar tespit edilmiştir (Jones DT. ve ark. 2012). Medulloblastomanın genetik ve moleküler genetik analizleri sayesinde, büyümeyi (Shh/Patched, the Wnt, Notch, IGF/PTEN/mTOR) ve negatif büyüme düzenleyicilerini (BMP) destekleyen yollar da dahil olmak üzere, serebellar progenitör hücre nörojenezini için önemli olan sinyal yollarının düzenlenmesindeki değişiklikler tanımlanmıştır (Roussel M.F.; Hatten M.E. 2011). Medulloblastoma ile ilişkili bu yollardaki moleküler değişiklikler, hem fonksiyon kaybını hem de fonksiyon mutasyonlarının kazanımını ve ayrıca bu yolların düzenleyicilerinin mRNA'sındaki veya protein seviyelerindeki değişiklikleri içerirler (Roussel M.F.; Hatten M.E. 2011).

Tedavi, tümörün cerrahi olarak çıkarılması ile başlar. Radyasyon tedavisi ve kemoterapi de uygulanır fakat tedaviden sonra yan etkiler yaygın olarak ortaya çıkan bir sonuçtur (Blomstrand M. ve ark 2012; Merchant T. E. ve ark. 2008).

### **2.1.1.3. Oligodendroglioma**

Oligodendroglioma (OD), tüm glial tümörlerin %5-20'sini oluşturur (Van Den Bent M. ve ark. 2008). Oligodendrogliomalar, WHO sınıflandırmasına göre 2. evre veya 3. evre olarak gruplandırılırlar (Şekil 2). IDH mutasyonu ve 1p/19q genlerinin delesyon olup olmamasına göre evre (grade) sınıflandırması yapılır (Louis D. N. ve ark. 2016). Şimdiye

kadar bulunan en yaygın delesyon kromozomal kolların 1p ve 19q birlikte silinmesidir (Barbashina V. ve ark. 2005).

1p/19q delesyon olmayan anaplastik oligodendrogliyal tümörlerde ortalama genel sağkalım 2-3 yıldır, ancak 1p ve 19q delesyon olan tümörlerde 6-7 yıldan azdır (Van Den Bent M. ve ark. 2008).

Oligodendrogliomalar genellikle mevcut tedaviler kullanılarak tedavi edilemezler. Bununla birlikte daha yaygın astrositomalarla karşılaştırıldığında uzun süreli hayatta kalma ile yavaş yavaş büyürler (Ohgaki H.; Kleihues P. 2005). Diffüz olarak sızan yapıları nedeniyle, oligodendrogliomalar tamamen rezekt edilemez ve cerrahi eksizyonla tedavi edilemez. Tümör kütlesi bitişik beyin yapılarını sıkıştırırsa, bir beyin cerrahisi tipik olarak diğer kritik, sağlıklı beyin yapılarına zarar vermeden tümörün olabildiğince çoğunu çıkaracaktır (Hamlat A. ve ark. 2005).

Oligodendrogliomalar, diğer gliomalar gibi, çok yüksek (neredeyse tek tip) bir tekrarlanma oranına sahiptir ve zamanla derece olarak kademeli şekilde artarlar. Tekrarlayan tümörler genellikle daha agresif kemoterapi ve radyasyon tedavisi ile tedavi edilir. Son zamanlarda, stereotaksik cerrahi, erken teşhis edilmiş küçük tümörlerin tedavisinde başarılı olduğunu kanıtlamıştır (Tatter S. B. 2002).

#### **2.1.1.4. Ependimoma**

Ependimomalar, mikropapiller ependimoma ve subependimoma (evre I), ependimoma (evre II) ve anaplastik ependimoma (evre III) olarak sınıflandırılan, nöroektodermal kökenli nadir tümörlerdir (Reni M. ve ark. 2007). Çocuklarda tümörler ağırlıklı olarak intrakraniyal olarak ortaya çıkarken, yetişkinlerde omurga en yaygın yerleşim yeridir (Gerstner E.R., Pajtler K.W. 2018).

Ependimal tümörler, yaygın olarak ventriküllere veya omuriliğin merkezi kanalına bağlı olarak büyüyen nöroepitelyal neoplazmlardır (Neumann J.E. ve ark. 2020). İlk önce omuriliğin ortasındaki ependim hücrelerinde ve beyindeki ventriküller olarak bilinen sıvı dolu boşluklarda oluşurlar (Bellefonds C. 2020).

Tümörün nerede başladığına ve ne kadar hızlı büyüdüğüne bağlı olarak dört türü vardır (Bellefonds C. 2020):



- Evre I (subependimomalar): Bunlar genellikle beyindeki bir ventrikülün yakınında ortaya çıkar ve yavaş büyür. Genellikle yetişkinleri ve yaşlı erkekleri etkilerler (Bellefonds C. 2020).
- Evre II (miksoependimomalar): Bunlar genellikle genç yetişkinlerin omuriliklerinde görülür. Yavaş büyürler (Bellefonds C. 2020).
- Evre III (ependimomalar): En yaygın ependimoma türü olan bu tümör genellikle beyinde bulunur (Bellefonds C. 2020). Vakaların %80'i çocuklarda ortaya çıkar. Çocuklarda beyinde ortaya çıkarken yetişkinlerde omurgada meydana gelir (Prabhu R. S. ve ark. 2019).
- Evre IV (anaplastik ependimomalar): Çoğunlukla beyinde veya kafatasında yer alırlar ve tipik olarak diğer ependimoma türlerinden daha hızlı büyürler (Bellefonds C. 2020).

Yavaş büyüyen gliomalar olan evre I-II tümörler nadiren beyin parankimine, sinir köklerine, kemiklere ve beyin omurilik sıvısı (BOS)'a yayılır; bazen asemptomatiktirler ve tesadüfen otopside bulunurlar. Anaplastik ependimomalar daha hızlı bir büyüme paterni sergiler ve bazen invazivdir. II. evre tümörlerin malign progresyonunun sonucu olabilirler ve özellikle posterior fossada bulunuyorlarsa BOS'a daha sık yayılma eğilimi gösterirler (Reni M. ve ark. 2007).

Ependimomada başlangıç tedavisi için kılavuz ilkeler, radyasyonun izlediği maksimum cerrahi rezeksiyondur (Reni M. 2003).

### **2.1.1.5. Menengioma**

Menengiomalar en sık görülen primer intrakraniyal tümörlerden biridir. (Maggio I. ve ark. 2021). Spesifik olarak tümör, meninks adı verilen üç zar tabakası üzerinde oluşur. Menengiomaların çoğu beyinde oluşmakla birlikte omuriliğin bazı kısımlarında da büyüebilirler (McMillen M. 2021). Menengiomaların çoğu iyi huyludur, ancak farklı sonuçlarla ilişkili olarak evre I'den evre III'e (anaplastik/malign) kadar farklı evrelerde farklılaşma gösterebilirler (Maggio I. ve ark. 2021).

Tedavi genellikle tam rezeksiyon sağlamak amacıyla cerrahidir. Rezeksiyon kapsamı Simpson derecesi ile ölçülür. (Maggio I. ve ark. 2021). Ameliyat için uygun olmayan

menenjiomalar için ışınlama, lokal büyüme kontrol etmek için geçerli bir alternatifi temsil eder. Adjuvan radyoterapi, evre III için standart bir tedavi yöntemi olmakla birlikte evre II için tartışmalıdır (Maggio I. ve ark. 2021).

Kadınlarda erkeklerden daha sık görülürler (McMillen M. 2021). Bazı menenjiomalar atipik olarak sınıflandırılırlar. Hızlı büyüme eğilimindedirler. Ayrıca beynin diğer bölgelerine ve ötesine, sıklıkla akciğerlere yayılabilirler (McMillen M. 2021).

### **2.1.1.6. Astrositoma**

Astrositoma, beyin ve omurilikte gelişebilen bir glioma tümör türüdür. Erkeklerde kadınlardan daha yaygındır ve çoğunlukla 45 yaşından sonra ortaya çıkar. Birkaç astrositoma türü vardır ve bazıları diğerlerinden daha hızlı büyür (Peri C. 2022). Standart tedavi sadece sağkalımı biraz iyileştirir (Hirtz A. ve ark. 2020).

Birkaç astrositoma türü vardır:

- Anaplastik astrositomalar nadirdir. Hızla büyüyen ve yakındaki dokuya yayılan evre III tümörlerdir. Yakındaki beyin dokusuna dönüşen yapısı nedeniyle tamamen çıkarılması zordur (Peri C. 2022).
- Glioblastomalar ayrıca evre IV astrositomalar olarak da adlandırılır. Astrositomaların %50'den fazlası glioblastomalardır. Çok hızlı büyürler ve tedavileri zordur çünkü genellikle farklı kanser hücresi türlerinin bir karışımıdır (Peri C. 2022).
- Diffüz astrositomalar yavaş büyürler. Düşük evreli (evre II) olarak kabul edilirler, ancak daha yüksek evreli tümörlere dönüşebilirler (Peri C. 2022).
- Pilositik astrositomalar ve subependimal dev hücreli astrositomalar çocuklarda daha sık görülür ve evre I olarak kabul edilir (Peri C. 2022).

Astrositoma, en yaygın alt tip olan glioblastoma multiforme (GBM) dahil olmak üzere malign gliomalar, neoplazmların en agresifleri arasındadır (Reardon D.A. ve ark. 2006). Tanı, histopatoloji tarafından doğrulanan klinik ve radyografik bulgularla konulur. Standart tedavi; cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve temozolomid içerir (Sathornsumetee S. ve ark. 2007). Yüksek evreli astrositomaları olan hemen hemen tüm hastalarda, bu çok modaliteli tedaviden sonra tümör nüksü veya progresyonu gelişir (Sathornsumetee S. ve ark. 2007).

Tümörün tamamını veya mümkün olduğunca fazlasını çıkarmak için yapılan cerrahi, olası bir ilk adımdır. İstisna, ameliyatın çok riskli olabileceği bölgelerdeki gliomalardır. Evre 1 tümörleri tedavi etmek için cerrahi müdahale yeterli olabilir (Peri C. 2022). Cerrahi müdahalede genellikle daha yüksek dereceli bir tümörün tamamı çıkarılamayabilir. Radyasyon tedavisi, genellikle tümörün tamamının çıkarılamaması durumunda kullanılır. Kemoterapi tedavisi genellikle glioblastoma ve anaplastik astrositoma için kullanılır. Kemoterapi tedavisi, radyasyon tedavisinden önce veya sonra da kullanılabilir (Peri C. 2022).

## **2.2. Glutamata Bağlı Eksitotoksisite**

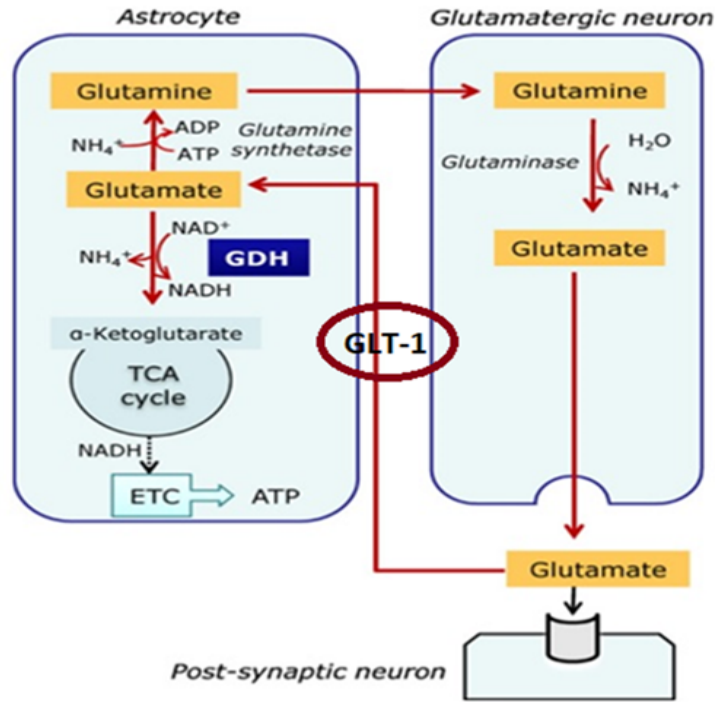
Glutamat, nöronlarda en fazla bulunan eksitator nörotransmitterdir, ancak fazlası postsinaptik reseptörleri aşırı aktif hale getirip toksisiteye neden olur. Postsinaptik reseptörler aktif hale geldiğinde, postsinaptik sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonu yükselir, proteazları, lipazları ve endonükleazları aktif hale getirerek hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olur (Fendt ve ark, 2017).

1957'de Newhouse ve arkadaşları glutamatın nöronlardaki toksik etkisini göstermiş ve daha sonra Olney ve arkadaşları bu olayı eksitotoksisite olarak adlandırmıştır (Gözen O. 2008; Choi D. W. 1988). Eksitotoksisite, postsinaptik glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, presinaptik aşırı glutamat salımı veya glutamat geri alımının yetersizliğinden kaynaklanmaktadır (Gözen O. 2008). Eksitotoksisite birçok nörodejeneratif hastalıkta rol oynar. Bunlar; İnme, travmatik beyin hasarı, Multipl Skleroz (MS), Alzheimer Hastalığı (AH), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Parkinson Hastalığı (PH), Huntington Hastalığı (HH) ve epilepsidir.

### **2.2.1. Eksitotoksisite Nasıl Meydana Gelir ?**

Nöronlar ve astrositler beyin dokusu içinde birlikte bulunur (Şekil 2). Glutamaterjik nöronda glutamin, glutaminaz tarafından glutamata çevrilir. Glutamat nöronlar arası boşluğa salınır ve post sinaptik nöron veya astrositler tarafından toplanır. Bu toplama işleminin büyük kısmı astrositler üzerinde bulunan glutamat transporterları (özellikle GLT-1)

tarafından yapılır. İçeri alınan glutamatın bir kısmı astrositlerde bulunan glutamat dehidrogenaz tarafından  $\alpha$ -ketoglutarata çevrilir, TCA (trikarboksilik asit) siklusuna girer veya glutamin sentetaz (GS) tarafından glutamine çevrilir (Şekil 3). Glutamin tekrar glutamaterjik nörona geçerek bu döngünün devamını sağlar. Eğer glutamat nöronlar arası boşlukta birikirse eksitotoksiste olayı meydana gelir (Karaca M ve ark. 2011). Dolayısıyla eksitotoksiste, fazla glutamat salınımı, glutamatın nöronlar arası boşlukta birikmesi veya salınan glutamatın toplanamaması ile meydana gelir (Şekil 3).



Şekil 3. Glutamat döngüsü. (Karaca M ve ark. (2011)'den modifiye edilmiştir.)

### 2.3. Glutamat

Glutamat omurgalı merkezi sinir sisteminin başlıca uyarıcı nörotransmitteridir. Beyin dokusunda glutamat konsantrasyonu yüksektir (yaklaşık 5-15 mmol/kg). Ayrıca glutamatın çoğu nöronlarda bulunur (Featherstone D, 2009). Glutamat, öğrenmeye ve hafızaya katkıda bulunur (Tapiero ve ark, 2002). Omurgalılarda en çok bulunan uyarıcı nörotransmitterdir ve insan beyninde bulunan sinaptik bağlantıların %90'dan fazlasını meydana getirir (Meldrum B.S. 2000).

Glutamat, hücre yüzey reseptörlerine bağlanıp aktive ederek etkisini gösterir (Shigeri Y. ve ark. 2004). AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit), kainat ve NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörleri iyonotropik glutamat reseptörleri olarak tanımlanmıştır ve aktive olduklarında iyonların geçmesine izin veren zar kanalları açarlar. Metabotropik glutamat reseptörleri de G proteinine bağlı reseptörlerdir, etkilerini ise karmaşık bir ikincil haber sistemi aracılığıyla gösterirler (Shigeri Y. ve ark. 2004).

## 2.4. Glutamat Metabolizması

Glutamat, çok çeşitli proteinlerin önemli bir bileşenidir; sonuç olarak insan vücudunda fazla bulunan amino asitlerden biridir (Meldrum B. S. 2000).

Glutamat esansiyel olmayan bir amino asit olarak sınıflandırılır, çünkü başlangıç noktası sitrat olan bir dizi reaksiyonla sitrik asit döngüsünün bir parçası olarak üretilen  $\alpha$ -ketoglutarik asitten sentezlenir (Smith Q. R. 2000). Glutamat, tek olarak kan-beyin bariyerini geçemez, ancak beyin sıvılarındaki konsantrasyonunu oldukça sabit bir seviyede tutan yüksek afiniteli bir taşıma sistemi tarafından aktif olarak sinir sisteminden taşınır (Smith Q. R. 2000).

Glutamat, protein sentezi ve enerji metabolizması gibi hücresel süreçlerde görev yapar ya da nörotransmitter olarak kullanılmak için depolanır. Glutamat, sinaptik veziküller içine, glutamat taşıyıcısı ile alındıktan sonra ekzositoz ile salınır (Gözen O, 2008). Hücre dışı sıvıdan alınan glutamat, astrositlerde glutamine dönüştürülebilir. Glutamin, hücre dışına salınır ve daha sonra nöronlar tarafından alınıp tekrar glutamata çevrilir. Nöronlar ve astrositler arasında oluşan glutamat ve glutamin alışverişi glutamat için ana geri dönüşüm yoludur ve bu yola glutamin-glutamat döngüsü adı verilir. (Gözen O, 2008).

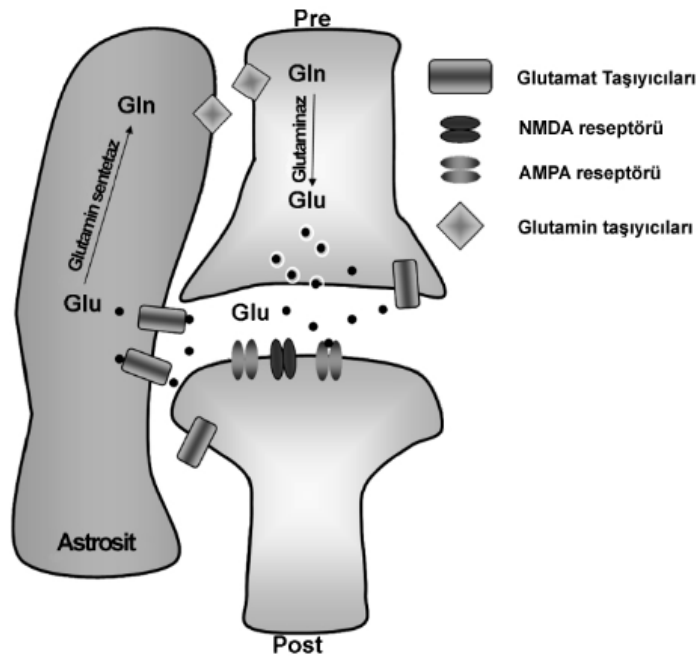
## 2.5. Glutamat Döngüsü

Astrositler tarafından geri alınan glutamat iki farklı yol izlemektedir. Birinci yol olarak glutamat, glutamine dönüşür ya da ikinci yol ise glutamatın alfa-ketoglutarat'a dönüşmesidir (Şekil 4). ATP'ye bağlı ve gliaya özel olan glutamin sentetaz enzimi tarafından glutamat glutamine dönüştürülür. Alfa-ketoglutarata dönüşüm iki farklı yoldan

gerçekleşmektedir, ilk olarak glutamat dehidrogenaz ile deaminasyona uğrar ya da ikinci yol olarak transaminazlar ile transaminasyon geçirir (Gözen O. 2008).

Glutamat taşıyıcıları, EAAT (Uyarıcı Amino Asit Taşıyıcısı) ve VGLUT (Veziküler Amino Asit Taşıyıcısı), nöronal ve glial membranlarda bulunur (Shigeri Y. ve ark. 2004). Glutamatı hücre dışı boşluktan hızla uzaklaştırırlar. Beyin hasarı veya hastalığında, genellikle tersine çalışırlar ve aşırı glutamat hücrelerin dışında birikebilir. Bu süreç, kalsiyum iyonlarının NMDA reseptör kanalları yoluyla hücelere girmesine neden olarak nöronal hasara ve nihai hücre ölümüne yol açarak eksitotoksisite olarak adlandırılır (Shigeri Y. ve ark. 2004).

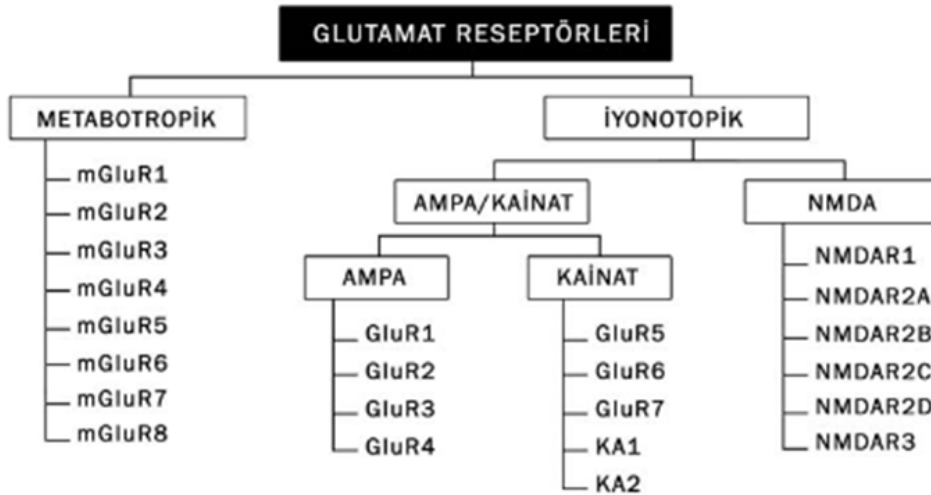
Hücre ölümü mekanizmaları şunları içerir:  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu, mitokondriyal fonksiyonları düzenler ve kontrolsüz bir şekilde arttığında, mitokondriye zarar verebilir (Duchen M.R. 2012).  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu, hücre içi nitrik oksit (NO) konsantrasyonunu artırır. Artan nitrik asit molekülleri serbest radikaller oluşturarak hücrenin oksidatif stresini artırır (Murphy M.P. 1999). Glutamat veya  $Ca^{+2}$ , proapoptotik genler için transkripsiyon faktörlerinin desteklenmesine veya anti-apoptotik genler için transkripsiyon faktörlerinin azalmasına aracılık eder. Böylece artan Glu/ $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun net etkisi hücre apoptozudur (Dong X. ve ark. 2009).



Şekil 4. Glutamin-glutamat döngüsü. (Gözen O. (2008)'dan modifiye edilmiştir.)

## 2.6. Glutamat Reseptörleri

Glutamat reseptörleri nöron ve glia hücrelerinin zarlarında bulunan sinaptik ve sinaptik olmayan reseptörlerdir. Nöral plastisite, nöral gelişim ve nörodejenerasyonda önemli rol oynarlar (Brassai A. ve ark. 2015). Glutamat reseptörleri, nöral hücrelerin glutamat aracılı postsinaptik uyarılmasından sorumlu olup iyonotropik ve metabotropik reseptörler olarak adlandırılan iki farklı reseptör grubuna ayrılmıştır (Şekil 5) (Nakanishi S, ve ark, 1998). Glutamat reseptörleri, birçok nörolojik yolakta önemli rol oynarlar. Glutamat reseptörlerinin eksitotoksistide rol alması ve merkezi sinir sistemindeki yaygın işlevi, birçok nörodejeneratif hastalıkla bağlantılı olduklarını göstermektedir. (Brassai A. ve ark. 2015).



Şekil 5. Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması. (Gözen O. (2008)'den modifiye edilmiştir.)

Glutamat reseptörlerinin, hem beyin gelişiminde hem de olgun glial hücrelerde, hücre proliferasyonu ve farklılaşması sırasında, gen ifadesini modüle etmede rol oynadığı öne sürülmektedir (Steinhauser C., Gallo V. 1996).

Glutamat reseptörleri esas olarak merkezi sinir sisteminde bulunur. Bu reseptörler, postsinaptik hücrelerin dendritlerinde bulunabilir ve presinaptik hücreler tarafından sinaptik yarığa salınan glutamata bağlanır. Ayrıca hem astrositlerde hem de oligodendrositlerde bulunurlar (Steinhauser C., Gallo V. 1996).

### 2.6.1. Metabotropik Glutamat Reseptörleri (mGLuR)

Metabotropik glutamat reseptörleri, hücre içi heterotrimerik G-proteinlerine bağlı membran proteinleridir (Tablo 1). Glutamatın metabotropik glutamat reseptörlerine (mGluR) bağlanması, G proteinine bağlı hücre içi sinyalleme kaskadlarının aktivasyonunu tetikler (Featherstone D, 2009). Memeli metabotropik glutamat reseptörlerinin tip I, tip II ve tip III olarak adlandırılan üç alt tipi vardır (Featherstone D, 2009). Bu sınıflandırma, bağlanma mekanizmalarındaki dizilerin moleküler yapısı ve homolojisindeki benzerlikler ve reseptörlerin farmakolojisiyle belirlenmiştir (Cartmell J. ve ark, 2002).

**Tablo 1.** mGlu reseptörler alt tiplerinin sınıflandırılması. )Cartmell J. ve ark, (2002)'den modifiye edilmiştir.)

	Alt Tip	İletim Mekanizması
Grup I	mGlu1	↑PI Hidrolizi
	mGlu5	↑PI Hidrolizi
Grup II	mGlu2	↓Döngüsel AMP
	mGlu3	↓Döngüsel AMP
Grup III	mGlu4	↓Döngüsel AMP
	mGlu6	↓Döngüsel AMP
	mGlu7	↓Döngüsel AMP
	mGlu8	↓Döngüsel AMP

Grup I reseptörleri, mGluR1 ve mGluR5'ten oluşur (Tablo 1). Bu grup, fosfolipaz C'yi (protein kinaz C'yi aktive eden ve diasilgliserol üreten) ve ayrıca inositol-1,4,5-trifosfatı (hücre içi depolardan Ca<sup>++</sup> salınımını sağlayan fosfoinositid hidrolizini üreten ikincil haberciler olarak uyarır (Tapiero H. ve ark. 2002).

Grup II reseptörleri, mGluR2 ve mGluR3'ten oluşur. Bu grup cAMP oluşumunu uyarın forskolin veya G bağlı proteinleri inhibe eder. Bu grubun agonisti 2,3-dikarboksisiklopropil-glikoldür (Tapiero H. ve ark. 2002).

Grup III ise mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR8'den oluşur. cAMP oluşumunda daha düşük inhibisyona sahip grup II reseptörleri ve agonistler olarak L-amino-4-pirofosfobütirat (L-AP4) ve L-serin-O-fosfat (O-SOP) ile aynı etkiye sahiptir. Grup II ve III, adenil siklaza negatif olarak bağlanır (Tapiero H. ve ark. 2002).

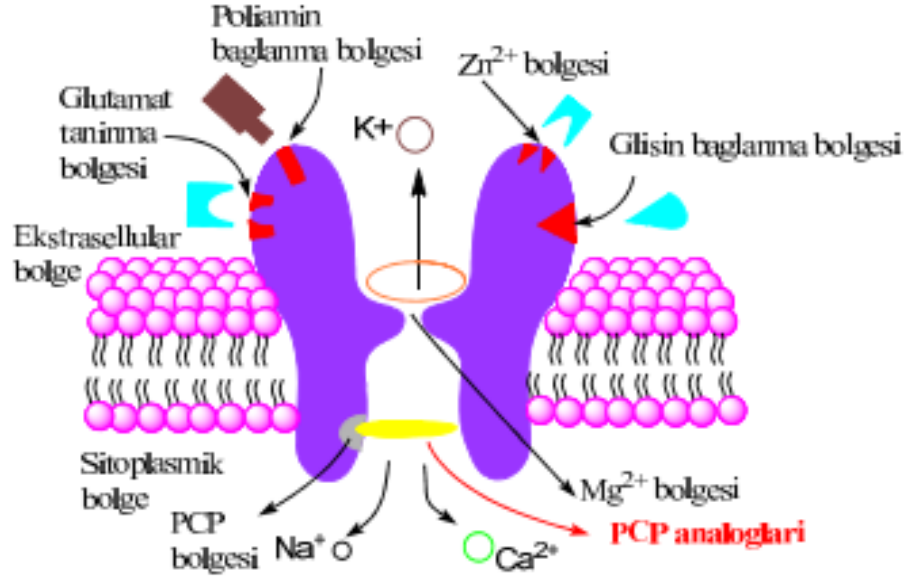


## 2.6.2. İyonotropik Glutamat Reseptörleri (iGluR)

İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR), multimerik glutamat kapılı iyon kanallarıdır. Glutamat, iGluR alt birimlerinin hücre dışı alanlarına bağlandığında; iGLUR proteini, plazma membranından katyon akışına izin vermek için konformasyonu değiştirerek hücre depolarizasyonuna yol açar. Memeli iGluR'leri ayrıca üç türe ayrılır: AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoksazol-propiyonat) reseptörleri, NMDA (*N*-metil- d-aspartik asit) reseptörleri ve kainat reseptörleridir. (Featherstone D, 2009).

### 2.6.2.1. NMDA (N-Metil-D-Aspartat) Reseptörleri

N-metil-D-aspartat reseptörü nöronlarda bulunan bir glutamat reseptörü ve iyon kanalıdır (Anson L. C. ve ark. 1998). Alt birim birleşimine bağlı olarak ligandları glutamat ve glisindir. Kanalin açılması için ligandların bağlanması yeterli olmayabilir çünkü sadece nöron yeterince depolarize olduğunda uzaklaştırılan  $Mg^{2+}$  iyonları tarafından bloke edilebilir. Böylece kanal bir “detektör” görevi görür ve ancak bu koşulların her ikisi de sağlandığında kanal açılır ve pozitif yüklü iyonların (katyonların) hücre zarından geçmesine izin verir (Furukawa H. ve ark. 2005). NMDA reseptörünün, sinaptik plastisiteyi kontrol etmek ve öğrenme ve hafıza işlevlerine aracılık etmek için çok önemli olduğu düşünülmektedir (Li F.; Tsien J. Z. 2013).



Şekil 6. NMDA reseptörünün yapısı. (Atıla S, ve ark (2010)'dan modifiye edilmiştir.)

#### 2.6.2.2. AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit) Reseptörleri

AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit) reseptörleri (AMPA'lar), diğer iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR'ler), NMDA ve kainat reseptörleri ile birlikte, merkezi sinir sistemindeki uyarıcı nörotransmisyonun çoğunluğuna aracılık eden tetramerik iyon kanallarıdır. AMPAR'lar sinapslarda ana hızlı iletim elemanlarıdır ve plastisitenin ifadesi için önemlidir. AMPAR'ların kinetik ve iletkenlik özellikleri, biyogenezleri sırasında belirlenir. Transkripsiyon sonrası RNA düzenlemesi, ekleme (splice) varyasyonu, translasyon sonrası modifikasyon ve alt birim kompozisyonu ile düzenlenir (Greger I, ve ark. 2017).

AMPA'ların milisaniyenin altındaki zaman ölçeğinde olağanüstü hızlı kinetiği, postsinaptik membranın hızlı depolarizasyonunu sağlayarak, sinir hücreleri arasında uyarıların yüksek doğrulukta iletilmesine izin verir (Greger I, ve ark. 2017).

AMPA reseptörlerinin epileptik nöbetlerin oluşmasında ve yayılmasında kilit rol oynadığı çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Rogawski M. A. ve ark. 2013). Epilepsi araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir konvülzan olan kainik asit, kısmen AMPA reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla nöbetlere neden olur (Fritsch B. ve ark. 2014).

### 2.6.2.3. Kainat Reseptörleri

Kainat reseptör alt birimleri 1990'lı yıllarda klonlanmıştır. Kainat reseptörleri de AMPA reseptörleri gibi büyük moleküllerdir, yaklaşık 900 aminoasitten oluşur. Kainat reseptörleri, beş farklı alt gruptan oluşur. Bunlar GluR5 (Glutamat Reseptörü 5), GluR6 (Glutamat Reseptörü 6), GluR7 (Glutamat Reseptörü 7), KA-1 (Kainat 1) ve KA-2 (Kainat 2)'dir (Tosun F, 2008).

Kainate reseptörleri hem presinaptik hem de postsinaptik etkilere sahiptir. Postsinaptik kainat reseptörleri, uyarıcı nörotransmisyonunda yer alır. Presinaptik kainat reseptörleri, bir presinaptik mekanizma yoluyla inhibitör nörotransmitter GABA ( $\gamma$ -aminobütirik asit)'nin salınımını modüle ederek inhibitör nörotransmisyonunda yer almıştır (Dingledine R. ve ark. 1999).

### 2.7. Glutamat Taşıyıcıları

Glutamati, bir zar boyunca hareket ettiren nörotransmitter taşıyıcı protein ailesine glutamat taşıyıcıları denir. İki alt sınıftan oluşur: uyarıcı aminoasit taşıyıcı (EAAT) ailesi ve veziküler glutamat taşıyıcı (VGluT) ailesi (Rothstein G. R. 1999). EAAT ailesi; glutamati, sinaptik yarıktan ve ekstrasinaptik bölgelerden, glial hücrelere ve nöronlara, glutamat geri alım yolu ile alarak uzaklaştırır. VGluT ailesi ise glutamati hücre sitoplazmasından sinaptik veziküllere taşır (Rothstein G. R. 1999).

Sinaptik yarıktaki sinaptik iletim ve glutamat seviyelerinin düzenlenmesi, glutamat taşıyıcıları tarafından gerçekleştirilir. Bu taşıyıcılar, insan merkezi sinir sisteminin yanı sıra diğer dokularda da bulunur (Maragakis J, 2001).

Glutamat taşıyıcılarının aktivitesi olmazsa glutamat, bir dizi biyokimyasal kaskadı tetikler ve nöronlar için toksik bir etki oluşturarak eksitotoksisiteye yol açar. (Zou J. Y., Crews F. T. 2005). Glutamat taşıyıcılarının aktivitesi ayrıca glutamatın tekrar salınması için geri dönüştürülmesine izin verir (Zou J. Y., Crews F. T. 2005).

### 2.7.1. Eksitatör Amino Asit Taşıyıcıları (EAAT'ler)

Beş  $\text{Na}^+$  bağımlı glutamat taşıyıcısı vardır, bunlar EAAT1(Eksitatör amino asit taşıyıcısı 1), EAAT2 (Eksitatör amino asit taşıyıcısı 2), EAAT3 (Eksitatör amino asit taşıyıcısı 3), EAAT4 (Eksitatör amino asit taşıyıcısı 4) ve EAAT5 (Eksitatör amino asit taşıyıcısı 5)'tir. 500-600 amino asit aralığında polipeptidlerdir ve %50-60 amino asit homolojisi sergilerler. EAAT'ler ayrıca nötr amino asit taşıyıcıları, alanin-serin-sistein taşıyıcıları (ASCT) ile %30-40 homoloji paylaşmaktadır (Shigeri Y, ve ark, 2004).

EAAT'ler yalnızca glutamata yüksek afinite ile taşımakla kalmaz, aynı zamanda substrat translokasyonuna termodinamik olarak bağlı olmayan bir glutamat ve sodyumla aktive edilmiş klorür iletkenliğine aracılık eder. Her taşıma döngüsü için, bir  $\text{K}^+$  iyonu yerine iki veya üç  $\text{Na}^+$  iyonu ve bir  $\text{H}^+$  ile birlikte bir glutamat molekülü alınır (Shigeri Y, ve ark, 2004).

Glial tip glutamat taşıyıcı olan EAAT2 (GLT-1), toplam glutamat alımının %90'ından fazlasını sağlar ve EAAT işlevinde önemli bir rol oynar (Shigeri Y, ve ark, 2004). EAAT1-2 alt tipleri glial hücrelerin (astrozitler, mikroglia ve oligodendrositler) zarlarında bulunur (Lehre K. P. ve ark. 1995).

- **EAAT1:** GLAST olarak da adlandırılıp insanlarda SLC1A3 geni tarafından kodlanır (Robinson M. B., Jackson J. G. 2017). EAAT1 ağırlıklı olarak plazma zarında eksprese edilir ve glutamatın hücre dışı boşluktan uzaklaştırmasına izin verir (Lehre K. P. ve ark. 1995). EAAT1, üç  $\text{Na}^+$  ve bir  $\text{H}^+$  katyonunun birlikte taşınması ve bir  $\text{K}^+$  katyonunun karşı taşınması ile glutamik ve aspartik asidin taşınmasına aracılık eder (Kanai Y., Hediger M. A. 2004).
- **EAAT2:** GLT-1 olarak da bilinir ve insanlarda SLCA2 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Pines G. ve ark. 1992). Zira bağlı protein olarak bulunup, merkezi sinir sistemindeki sinapslarda hücre dışı boşluktan uyarıcı nörotransmitter glutamata temizleyen ana taşıyıcıdır. Uygun sinaptik aktivasyon için ve glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonundan kaynaklanan nöronal hasarı önlemek için gereklidir. EAAT2, beyindeki glutamat geri alımının %90'ından fazlasından sorumludur (Rao P. ve ark. 2015).
- **EAAT3:** İnsanlarda SLC1A1 geni tarafından kodlanır (Smith C. P. ve ark. 1994). EAAT3, nöronların plazma membranında, özellikle dendritler ve akson

terminallerinde eksprese edilir (Underhill S.M. ve ark. 2014). EAAT3 glutamatın nöronlarda plazma membranları boyunca taşınmasında önemli bir rol oynayan yüksek afiniteli glutamat taşıyıcılarının bir üyesidir (Stewart S.E. ve ark. 2013). EAAT3 ayrıca nöronal sistein alımının ana yoludur. Sistein, ana antioksidan glutatyonun bir bileşenidir ve EAAT3'ten yoksun fareler, nöronlarda düşük glutatyon seviyeleri, artan oksidatif stres ve yaşa bağlı nöron kaybı sergiler (Stewart S.E. ve ark. 2013).

- **EAAT4:** İnsanlarda SLC1A6 geni tarafından kodlanır. EAAT4, ağırlıklı olarak beyincikte eksprese edilir ve uyarıcı amino asitler L-aspartat ve L-glutamat için yüksek afiniteye sahiptir. Bu amino asitler tarafından uyarıldığında, EAAT4, klorür iyonlarını iletir (Fairman W.A. ve ark. 1995).
- **EAAT5:** İnsanlarda SLC1A7 geni tarafından kodlanır. EAAT5 ağırlıklı olarak retinada eksprese edilir, uyarıcı amino asit L-glutamat için yüksek afiniteye sahiptir. Bu amino asit tarafından uyarıldığında, EAAT5 klorür iyonlarını iletir (Arriza J.L. ve ark. 1997).

### 2.7.2. Vesiküler Glutamat Taşıyıcıları (VGLUT'lar)

Yaklaşık 600 amino asitten oluşan veziküler glutamat taşıyıcısının üç alt tipi (VGLUT 1, 2 ve 3) tanımlanmıştır ve birbirleriyle %70'den fazla homoloji paylaştığı bilinmektedir. VGLUT'lerin bilinen tüm alt tipleri, EAAT'lardan 100 ila 1000 kat daha düşük bir afinite ile glutamatı taşır (Shigeri Y. ve ark. 2004).

Bu taşıyıcılar, sinaps içine salınabilmeleri için nörotransmitteri sinaptik veziküllere paketler. VGLUT'ler, salgı sisteminde bulunan proton gradientine bağlıdır ve veziküller sitozolden daha asidiktir (Shigeri Y. ve ark. 2004).

- **VGLUT1:** İnsanlarda SLC17A7 geni tarafından kodlanır (Ni B. ve ark. 1996). Bu gen tarafından kodlanan protein, nöronlarda spesifik olarak eksprese edilen veziküle bağlı, sodyuma bağımlı bir fosfat taşıyıcıdır. Sinaptik veziküllerin zarları ile ilişkilidir ve glutamat taşınmasında işlev görür (Aihara Y. ve ark. 2000).
- **VGLUT2:** İnsanlarda SLC17A6 geni tarafından kodlanır (Miyaji T. ve ark. 2008). Yetişkin, sağlıklı beyindeki küçük bir dopamin nöron alt kümesi, veziküler glutamat

taşıyıcı 2'yi (VGluT2) ifade eder ve böylece striatumda bir nörotransmitter olarak glutamat salgılar (Kouwenhoven W. M. ve ark. 2020).

- **VGLUT3:** İnsanlarda SLC17A8 geni tarafından kodlanır. Nörolojik ve ağrılı hastalıklarda rol oynar (Fremeau R. T. ve ark. 2002).

## 2.8. Glutamat Dehidrogenaz (GDH)

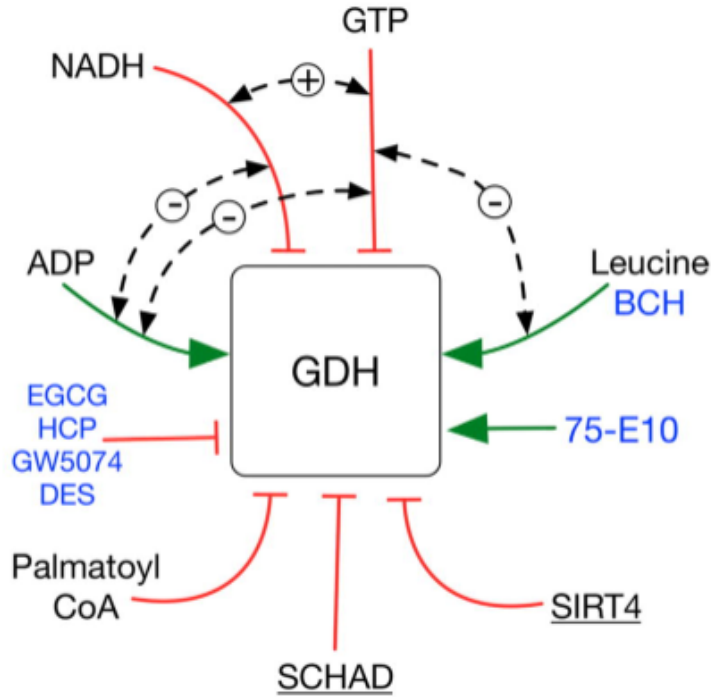
Glutamat dehidrogenaz (GDH), üre döngüsünün bir parçası olarak glutamati alfa-ketoglutarata çeviren mitokondrial bir enzimdir. (Aulbach A, ve ark, 2016). GDH enzimi esas olarak karaciğer, böbrek ve kalp kasında bulunmakla birlikte beyin, iskelet kası ve lökositlerde daha düşük seviyelerde bulunur (Hoosier G, ve ark, 2011).

Glutamat dehidrogenaz (GDH) kofaktör olarak NADP (H) ve NAD (H) kullanarak glutamatın  $\alpha$ -ketoglutarat ve amonyağa dönüşümünü katalize eder (Plaitakis A, ve ark, 2011). Enzim, amino asit ve karbonhidrat metabolizmasını birbirine bağlayarak hücrel homeostazda önemli bir rol oynar. Krebs döngüsü, amonyak düzenlenmesi ve enerji üretimi gibi hücrel olaylarda faaliyet gösterir. (Plaitakis A, ve ark, 2011).

GTP ve ~ 100 kat daha düşük afinite ile ATP, reaksiyonun inhibitörleridir ve ürün için bağlanma afinitesini artırarak etki eder, böylece enzimatik devri azaltır. Palmitoyl CoA, steroid hormonlar ve dietilstilbestrol (DES) bir grup hidrofobik ve güçlü inhibitörlerdir. ADP, ürün salınımını kolaylaştırarak GTP'ye zıt bir şekilde hareket eden bir GDH aktivatörüdür. Lösin, GDH için zayıf bir substrat ve enzim için allosterik bir aktivatördür. Lösin aktivasyonu ADP'ye benzer, fakat ADP'den farklı bir bölgede hareket ettiği düşünülmektedir (Smith H, ve ark, 2017). ADP ve lösin, GTP bağlanması ve inhibisyonu üzerinde güçlü antagonistik etkilere sahiptir. GDH, diğer mitokondriyal enzimler tarafından da düzenlenir; bunlar SCHAD ve SIRT4'dür. Bu nedenle, in-vivo GDH aktivitesi, sadece inhibitörler ve aktivatörler tarafından açılıp kapanmaktan ziyade, tüm bu allosterik düzenleyiciler arasındaki denge ve etkileşim tarafından önemli bir şekilde ayarlanır (Smith H, ve ark, 2017).

Ayrıca GDH'ın insan beyninde iki farklı izoenzimi vardır ve farklı genler tarafından kodlanmaktadır. Bunlar GDH1 ve GDH2'dir. Astrositlerde ve mitokondride ifade edilir (McKenna M. C. ve Ferreira G. C. 2016).

GDH'nin MSS gelişimi ve patolojilerinde önemli roller oynayabileceğine dair artan kanıtlar vardır (Smith H, ve ark, 2017). Parkinson hastalarında GDH1 ve GDH2 genlerinin sekanslanmasından, aktiviteyi artıran GDH2'deki bir A445S mutasyonunun, semptomların 6-13 yıl erken ortaya çıkmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur. Muhtemelen bu varyant östrojen inhibisyonuna daha duyarlı olduğu için, bu fenotip sadece erkeklerde gözlemlendi. Aşırı nöronal GDH1 ekspresyon eden transgenik hayvanlar, Alzheimer hastalığı patolojisine benzer şekilde CA1 hipokampal bölgesinde yaşa bağlı dejenerasyon sergiler. Bu nedenle, sağlıklı beyin fonksiyonu için GDH'nin uygun şekilde düzenlenmesi gereklidir (Şekil 7) (Smith H, ve ark, 2017).



Şekil 7. GDH Düzenlenmesi. (Smith H, ve ark. (2017)'dan modifiye edilmiştir.)

GDH'nin, glioblastoma hücrelerinin bozulmuş glukoz metabolizması veya Akt sinyallemede hücrelerin hayatta kalması için gerekli olduğu bulunmuştur. GDH aktivitesi bozulmuşsa, hücrelerin hala glikoz kullanabildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, hücreler glikozdan yoksun bırakıldıysa veya glikoz metabolizması bozulduysa, hücrelerin kesinlikle büyüme için GDH aktivitesine ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir (Smith H, ve ark, 2017).

GDH, çok çeşitli metabolitler tarafından yoğun şekilde allosterik olarak düzenlenir. Başlıca aktivatörler ADP ve lösindir ve inhibitörler arasında GTP, palmitoil CoA ve ATP bulunur (Li M. ve ark. 2013). Lösün ve diğer bazı monokarboksilik asitlerin, ADP'ye benzer bir şekilde koenzim salınımının hız sınırlayıcı adımını artırarak memeli GDH'sini aktive ettiği gösterilmiştir. Lösün, GDH için zayıf bir substrat olduğundan, bir bağlanma bölgesi aktif bölgedir, ancak ikinci bir allosterik bölge olup olmadığı belirsizdir. Palmitoyl-CoA ve dietilstilbestrol, memeli GDH'sinin inhibitörleridir, ancak bağlanma yerleri hakkında hiçbir şey bilinmemektedir (Li M. ve ark. 2013).

## 2.9. Glutamin Sentetaz (GS)

Glutamin sentetaz, glutamat ve amonyanın glutamine dönüşümünü katalize eder. Amonyak detoksifikasyonu, ve asit baz düzenlemesinde önemlidir. Yüksek glutamin sentetaz aktivitesi insan karaciğeri, beyni ve kasında bulunur (Häberle J, ve ark, 2005). GS yüksek oranda korunmuş bir gen tarafından kodlanır ve prokaryot ve ökaryotların metabolizmasında anahtar bir enzim olarak da bilinir (Vermeulen T, ve ark. 2008).

Omurgalılarda GS'nin ana rollerinden biri, merkezi sinir sistemi (MSS) için toksik olan glutamat ve amonyaktan glutamin (Gln) üretmektir. GS, insanlarda Gln sentezleyebilen tek enzim olduğu için, ifade ve aktivitesindeki değişikliklerin önemli biyolojik etkileri olması olasıdır (Palmieri E.M. ve ark. 2014).

Glutamin insan metabolizmasında en fazla bulunan amino asittir. Çeşitli amino asitlerin, pürinlerin ve pirimidinlerin biyosentezi için önemli bir kaynaktır. GS, amonyak ve glutamat detoksifikasyonu, pH homeostazı, asit-baz regülasyonu ve hücre sinyallemesinde belirleyici bir rol oynar (Vermeulen T, ve ark. 2008).

GS sitoplazmada lokalizedir ve karaciğer, beyin ve iskelet kasında yüksek konsantrasyonlarla ifade edilir. Astrositlerde GS, fazla amonyak ve glutamati ortadan kaldırarak nöroprotektif bir enzim olarak çalışır (Vermeulen T, ve ark. 2008). Bununla birlikte, GS ekspresyonu MSS (Merkezi Sinir Sistemi)'nde miyelin ürettiği ve aksonları kapladığı bilinen glial hücreler olan oligodendrositlerde de bulunmuştur (Xin W, ve ark. 2019). GS'nin, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) aracılı işlev kaybı, birçok nörodejeneratif bozuklukta gösterilmiştir (Palmieri E.M. ve ark. 2014).



GS ifadesi, sağlıklı astrositlerde farklılaşma ve olgunlaşmanın bir belirteçidir. Bunun aksine, GS ifadesinde belirgin bir düşüş, nöronal hasar bölgesinde çoğalan astrositlerde sıklıkla meydana gelir. Örneğin, Alzheimer hastalığında serebral kortekste GS aktivitesi azalır. Alternatif olarak, serebral iskemi ve in vitro hipoksiyi takiben GS ifadesinin arttığı gösterilmiştir. GS'nin omurilikte yaralanma sonra astrositlerde olası rollerini incelemek üzere yapılan bir çalışmada GS'nin yaralanma bölgesinde astrositlerde azaldığı bulunmuştur (Zou J, ve ark. 2010).

Oksidan maddeler tarafından inaktivasyona karşı özel duyarlılığı nedeniyle, GS aktivitesi genellikle ROS aracılı beyin hasarını izlemek için kullanılır. Yaşlanma ve Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere bir dizi durumda, beyin dokularındaki GS'nin glutamatı glutamine, yaşa uygun normal kontrollere göre daha az verimli bir şekilde dönüştürdüğü bulunmuştur (Castegna A, ve ark. 2011).

## **2.10. Glioblastoma ve Eksitotoksisite Arasındaki İlişki**

Birçok çalışma, glioma hücrelerinin eksitotoksik seviyede glutamat salgıladığını göstermiştir (Michael C. Oh ve ark. 2012). Normal beyindeki glial hücrelerde eksprese olan iki önemli glutamat taşıyıcı alttipi GLT-1 ve GLAST'tır. Glioma hücrelerinden glutamat salınması, GLT-1 glutamat taşıyıcısının ekspresyonunun eksikliğinin yanında glioma hücrelerinde diğer glutamat taşıyıcısı olan GLAST'ın nükleer membrana yanlış lokalize olması ile ilişkilidir (Michael C. Oh ve ark. 2012).

Tümör ortamında artan glutamat konsantrasyonu, glutamat reseptörlerini eksprese eden glioma hücrelerini aktive etmek için parakrin ve otokrin şekilde hareket eder (Michael C. Oh ve ark. 2012).

Çeşitli glutamat reseptör tipleri vardır. Glioma hücreleri, a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izozolepropiyonik asit (AMPA), kainat ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri dahil olmak üzere iyonotropik glutamat reseptörlerini aktif olarak eksprese eder. Beyindeki en yaygın uyarıcı iyon kanalları olan AMPA reseptörleri, GluR1'den GluR4'e kadar adlandırılan dört farklı alt birimden oluşur (Michael C. Oh ve ark. 2012). Farklı alt birim kombinasyonları, işlevsel bir kanal oluşturmak için bir tetramer oluşturur. GluR2 veya GluR3 alt birimleri kalsiyum geçirmeyen AMPA reseptörleri oluştururken, GluR1 ve GluR4 alt birimleri, kalsiyum geçirgen kanallar oluşturur. İlginç bir şekilde, GluR2 alt

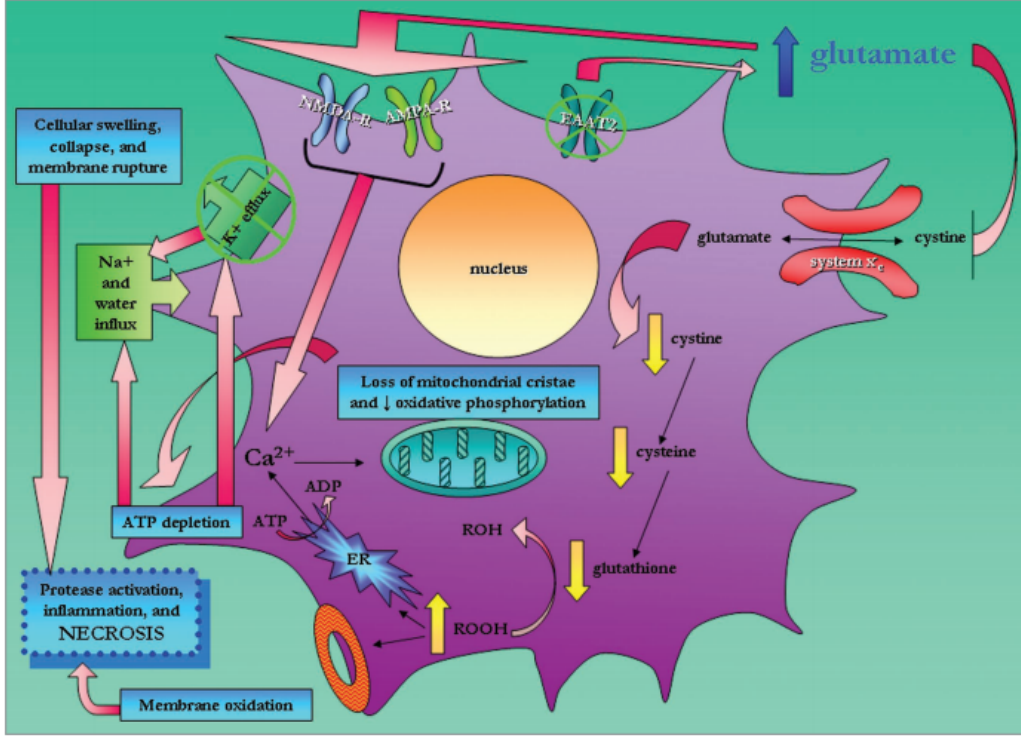
birimlerinden yoksun kalsiyum geçirgen AMPA reseptörlerinin GBM hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bu reseptörlerin aktivasyonunun, glioma hücrelerinin artan hareketliliğini ve proliferasyonunu desteklediği, invaziv potansiyellerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Michael C. Oh ve ark. 2012).

Sonuç olarak, birçok tümörde ve ayrıca peritümöral dokularda artmış glutamat konsantrasyonunun, malign gliomalarda nekroz oluşumundan, çevredeki normal nöronların ekzitotoksik ölümünden, glioma ile ilişkili nöbetlerden, proliferasyonundan sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Michael C. Oh ve ark. 2012).

### **2.10.1. Glioblastomalarda Nekrozun Fizyolojik Mekanizması**

Nekroz, glioblastomada ayırt edici bir özelliktir, bazı çalışmalarda vakaların %85'inden fazlasında nekroz varlığı görülmektedir. Glioblastomadaki nekroz yolu, elektron taşıma zincirinin çökmesi ve ardından oksidatif fosforilasyonun azalması sonucunda akut hücre ATP tükenmesi ile başlar (Şekil 8) (Noch E. ve ark. 2015). Bu ATP eksikliği,  $\text{Na}^+$  akışı yoluyla büyük bir hücre hacmi artışı başlatan ve ATP'ye bağlı iyon kanalları ile pompalarının başarısızlığına yol açar. Artan hücre içi  $\text{Na}^+$  konsantrasyonu, hücre ATP depolarını daha da tüketen  $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -\text{ATPaz}$ 'ın aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu tükenme, seçici olmayan  $\text{Ca}^{+2}$  kanallarının açılmasına yol açarak, hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  seviyelerinin yükselmesine ve sonunda mitokondriyal depolarizasyon ile  $\text{Ca}^{+2} -\text{ATPaz}$ 'ın aktivasyonuna neden olur.

Ek olarak, şiddetli ATP tükenmesinin sonucu olarak iyonik homeostaz, hücre dışına atılan  $\text{K}^+$  akışı ile sağlanmaz, bu da hücresel şişmeyi ve çökmeyi hızlandıran daha fazla  $\text{Na}^+$  ve su akışına yol açar. Hücre zarı yırtıldıkça, hücrenin içeriği hücre dışı boşluğa salınır ve nekrozun son aşaması, proteaz aktivasyonunu ve lokalize bir enflamatuar yanıtı içerir (Noch E. ve ark. 2015).



**Şekil 8.** Glioblastomadaki glutamat eksitotoksitesine bağlı nekroz mekanizması. (Noch E. et al. 2015'den adapte edilmiştir.)

Glioblastomada glutamat aracılı nekrozun mekanizması belirsizliğini korumaktadır, ancak glutamat alım yolunun birkaç anahtar bileşeni, nekrotik hücre ölümünün belirli fizyolojik yönleri ile ilişkilendirilmiştir. Glutamat birikimi, sistem xc yoluyla artan glutamat salınımını tetikler ve bu da glutamat eksitotoksitesini geliştirir (Noch E. ve ark. 2015).

EAAT2, hücre dışı glutamatu yeniden alım yolu ile düzenlemesine rağmen, glutamat salınımı, hücre içi glutamatu hücre dışı sistin için değiştiren  $\text{Na}^+$ dan bağımsız sistem xc tarafından düzenlenir. Xc sisteminin aktivitesi yoluyla glutamat salımı, normalde hücre dışı glutamat konsantrasyonunu azaltmak için EAAT2 tarafından yeniden alım yoluyla işlenir. Bununla birlikte, yüksek seviyelerde sistem xc ve düşük EAAT2 seviyeleri eksprese eden glioblastomalarda, glutamat, hücre dışı boşlukta aşamalı olarak birikir ve nöronların ve muhtemelen tümör hücrelerinin lokal eksitotoksitesini hızlandırır (Noch E. ve ark. 2015).

Fonksiyonel EAAT2 aktivitesinin azalmasının bir sonucu olarak glutamat birikimi, iyonotropik glutamat reseptör aktivasyonunu tetikler ve bu da  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunda bir artışa neden olur (Noch E. ve ark. 2015). Aynı zamanda, yüksek hücre dışı glutamat seviyeleri, sistem xc aktivitesini inhibe eder. Bu inhibisyon, hücre içi sistinin azalmasına ve ardından glutatyon üretiminin bozulmasına yol açarak reaktif oksijen türlerini nötralize

edememe ile sonuçlanır. Reaktif oksijen türleri, membran oksidasyonuna ve endoplazmik retikulumdan (ER) ATP'ye bağlı  $Ca^{+2}$  salımına neden olarak mitokondriyal hasara ve daha fazla ATP tükenmesine yol açar. ATP seviyelerinde ciddi azalma ile  $Na^{+}$  ve su hücreye girer ve büyük bir hücre hacmi artışını hızlandırır.  $K^{+}$  akışı iyonik homeostazı koruyamaz, bu da  $Na^{+}$  ve su akışında daha fazla artışa neden olur. Sonuç olarak, hücre şişer ve plazma zarı yırtılarak hücre sel çöküşe yol açar. Son aşamada, hücre içi içeriklerin sızması, iltihaplanmaya ve nihayetinde nekroza neden olan hücre dışı proteazların aktivasyonu ile sonuçlanır (Noch E. ve ark. 2015).

Nörotoksik etkilerden kaçınmak için hücre dışı glutamat konsantrasyonu dikkatli bir şekilde düzenlenmelidir. Pasif difüzyonun glutamatı sinaptik yarıktan uzaklaştırma yeteneği sınırlı olduğundan ve glutamat hücre dışı enzimler tarafından metabolize edilemediğinden, düşük hücre dışı glutamatın korunması için temel mekanizma, astrosit ve nöronların hücre zarlarında bulunan  $Na^{+}$  bağımlı glutamat taşıyıcıları aracılığıyla (Noch E. ve ark. 2015).

Bu uyarıcı amino asit taşıyıcıları (EAAT'ler), plazma zarı boyunca elektrokimyasal gradientler tarafından yönlendirilir ve glutamat bağlanması için  $Na^{+}$  ve net taşıma için  $K^{+}$  gerektirir.

## 2.11. Sirtuinler (Sirt)

Sirtuinler, prokaryotlarda ve ökaryotlarda önemli metabolik yolları düzenleyen  $NAD^{+}$  bağımlı histon deasetilazlardır ve hücrenin hayatta kalması, yaşlanma, proliferasyon, apoptoz, DNA onarımı ve hücre metabolizması gibi birçok biyolojik yollarda yer alırlar (Carafa V. ve ark. 2016). Sirtuin ailesinin yedi üyesi vardır: SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 ve SIRT7 (Tablo 2). Sirtuinler, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere insan patolojilerinin tedavisi için potansiyel hedefler olarak kabul edilir (Carafa V. ve ark. 2016).

**Tablo 2.** Sirtuinlerin lokasyonları, aktivitesi ve patolojileri. (Carafa V. ve ark. 2016'dan modifiye edilmiştir.)

Sirtuin	Localization	Enzymatic activity	Histone deacetylation target	Non-histone deacetylation target	Pathology
SIRT1	Nuclear/cytoplasmatic	Deacetylase	H3K9ac H1K26ac H4K16ac	Hif-1 $\alpha$ , Hif-2 $\alpha$ MYC	Neurodegenerative diseases. Cancer: acute myeloid leukemia, colon, prostate, ovarian, glioma, breast, melanoma, lung adenocarcinoma.
SIRT2	Nuclear/cytoplasmatic	Deacetylase	H3K56ac H4K16ac	Tubulin Foxo3a EIF5A P53, G6PD, MYC	Neurodegenerative diseases. Cancer: brain tissue, glioma.
SIRT3	Mitochondrial	Deacetylase	H3K56ac H4K14 ac	SOD2, PDMC1a, IDH2, GOT2, FoxO3a	Neurodegenerative diseases. Cancer: B cell chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, breast, gastric.
SIRT4	Mitochondrial	ADP-ribosyltransferase	Unknown	GDH, PDH	Cancer: breast, colorectal.
SIRT5	Mitochondrial	Malonyl, succinyl, glutaryl deacetylase	Unknown	CPS1	Cancer: pancreatic, breast, non-small cell lung carcinoma.
SIRT6	Nuclear	Deacetylase, ADP-ribosyltransferase, long-chain fatty acyl deacylase	H3K9ac H3K56ac	Unknown	Cancer: breast, colon.
SIRT7	Nuclear	Deacetylase	H3K18ac	Hif-1 $\alpha$ , Hif-2 $\alpha$	Cancer: liver, testis, spleen, thyroid, breast.

SIRT'ler bir NAD<sup>+</sup> bağlayıcı katalitik bölgeyi paylaşırlar ve dahil oldukları biyolojik süreçlere bağlı olarak farklı substratlar üzerinde spesifik olarak etki edebilirler. SIRT'ler, hem N- hem de C terminal alanlarında sekans ve uzunluk bakımından farklılık gösterir; sonuç olarak budurum, farklı lokalizasyonlarını ve işlevlerini açıklar (Carafa V. ve ark. 2016).

Benzer bir yapıya sahip olmanın yanı sıra, SIRT ailesinin üyeleri farklı enzimatik aktivitelere sahiptir. Örneğin, SIRT1–3 ve SIRT7 esas olarak lizin deasetilazlardır, SIRT4 hem ADP-ribosil-transferaz hem de lizin deasetilaz olarak hizmet eder. SIRT5, bir lizin demalonilaz, desüksinilaz ve deglutarilaz olarak görev yapar ve SIRT6, bir ADP-riboz transferaz ve deasetilazdır. Ayrıca bu proteinlerin hücre içindeki yerleri farklıdır. SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 çekirdeğin içinde, SIRT2 sitoplazmada ve SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondride bulunur. Yerlerindeki bu farklılıklar, farklı aile üyelerinin farklı işlevlere sahip olabileceğini düşündürmüştür. SIRT ailesi üyeleri stres direnci, genom stabilitesi, enerji metabolizması ve yaşlanmada önemli rol oynarlar. Ayrıca önceki çalışmalarda, SIRT ailesinin hemen hemen tüm üyelerinin tümörigenezde rol oynadığı gösterilmiştir (Huang G, ve ark. 2018).

Model organizmalarda yapılan ilk çalışmalarda, genomik bütünlüğün korunmasında sirtuinlerin rolü önerilmiştir. Örneğin, mayadaki (*S. Cerevisiae*) Sir2'nin ribozomal DNA'nın rekombinasyonunu inhibe ettiği ve DNA kırılma bölgelerine yeniden konumlandığı gösterilmiştir. Ayrıca maya sirtuin aile üyeleri de memeliler gibi, histon proteinlerini deasetile etme yeteneğine sahiptir ve bu aktivitenin yokluğu, susturma kusurları, artmış genomik kararsızlık ve DNA hasarına duyarlılıkla sonuçlanır (Finkel T, ve ark. 2009).

Memeli sirtuinlerinin ayrıca hücrel stres direncini düzenlemede önemli bir role sahip olduğu görülmektedir. Ek olarak, bir çalışmada SIRT1'in ısı şoku tepkisini düzenleyerek hücreleri strese karşı koruyabileceği bulunmuştur (Finkel T, ve ark. 2009, Westerheide S.D ve ark. 2009).

### **2.11.1. Sirtuin 4 (SIRT4)**

SIRT4, SIRT ailesinin nispeten az çalışılmış bir üyesidir. SIRT4, mitokondri içinde bulunmakla birlikte yetişkin ve fetal dokularda olduğu kadar yetişkin timus ve beyaz kan hücrelerinde de yaygın olarak bulunur (Huang G, ve ark. 2018).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, en önemli işlevi metabolizmayı düzenlemek olarak bilinmekteydi. Ancak son bulgular, SIRT4'ün besin açısından zengin koşullarda aktif olduğunu ve malonil CoA dekarboksilazı (MCD) deasetile edip inhibe ettiğini ileri sürmüştür. MCD, lipogenez için karbon iskeleti sağlayan ve yağ oksidasyonunu inhibe eden malonil CoA'dan asetil CoA üreten bir enzimdir (Huang G, ve ark. 2018). SIRT4'ten yoksun fareler, artmış MCD aktivitesi ve düzensiz lipid metabolizması göstermiştir, bu da artan egzersiz toleransı ve diyetle indüklenen obeziteye karşı koruma ile sonuçlanmıştır. Bu sonuç, SIRT4'ün lipid homeostazının önemli bir düzenleyicisi olduğunu öne sürmüştür (Huang G, ve ark. 2018).

SIRT4'ün önceki çalışmalarda bir glial protein olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, bir stres tepkisini indükleyerek ve SIRT4'ün glutamat alımı üzerindeki etkilerini ve eksitotoksistide bir rolü olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. SIRT4'ten yoksun farelerde, daha şiddetli nöbet fenotipleri ve glutamat taşıma fonksiyonunda, glutamat taşıyıcılarının hücre yüzeyi ifadesinde ve ATP seviyelerinde buna karşılık gelen düşüşler görülmüştür (Shih J. ve ark. 2014). Çalışmanın sonucu olarak SIRT4, beyinde glutamat taşınmasını teşvik ederek eksitotoksisteye karşı koruma sağlayabileceği ve SIRT4'ün kaybı, eksitotoksik olayların artışına sebep olabileceği bulunmuştur (Shih J. ve ark. 2014).

SIRT4'ün MSS (Merkezi Sinir Sistemi) içerisindeki astroglial gelişimdeki işlevsel rolünü incelemek için yapılan başka bir çalışmada ise SIRT4'ün gelişme ve yetişkinlik döneminde merkezi sinir sisteminde ifade edildiği bulunmuştur (Komlos D. 2013).

Ek olarak, karaciğerde, SIRT4 inhibisyonu, mitokondriyal ve yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili enzimlerin gen ifadesini arttırmıştır, bu nedenle SIRT4 inhibisyonunun yağ oksidatif kapasitesini artırdığını düşündürmüştür (Huang G, ve ark. 2018).

SIRT4, NAD<sup>+</sup>'a bağlı deasetilaz aktivitesi gösterir. Ayrıca SIRT4, mitokondriyal glutamat dehidrojenaz 1 (GDH1) aktivitesini inhibe ederek böylece amino asitlere yanıt olarak insülin salgısını azaltan bir ADP-ribosiltransferazdır (Haigis M. C. ve ark. 2006).

SIRT4'ün başlangıçta glutamat dehidrojenaz (GDH) aktivitesini azalttığı ve böylece pankreas hücrelerinde insülin sekresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. GDH'nin glutamin metabolizmasını ve ATP üretimini kolaylaştırdığı ve böylece insülin sekresyonunu indüklediği bilinmektedir. GDH, ADP ribosile edilir ve SIRT4 tarafından inhibe edilir,

ardından lösin aracılı insülin sekresyonunu baskılar. İnsülinoma hücrelerindeki SIRT4'ün tükenmesi, GDH'yi aktive edebilir, böylece amino asitle uyarılan insülin salgılanmasını artırabilir (Min Z, ve ark. 2019).

SIRT4, DNA hasarına bağlı glutamin katabolizmasının inhibisyonunu düzenleyerek DNA hasarına yanıtta önemli bir rol oynar. DNA hasarı, pentoz fosfat yolu boyunca akışı artırır ve glutamin alımını ve TCA döngüsü ara maddelerinin seviyelerini azaltır. Mitokondriyal glutaminaz, mitokondriyal GDH ve aspartat aminotransferaz aktivitesi yoluyla glutamat oluşturmak için glutamini katabolize edebilir (Min Z, ve ark. 2019).

SIRT4'ün, tümörjenezde mitokondriyal metabolizmanın önemi ile tutarlı olarak metabolik düzenleyici rolü sayesinde tümör baskılayıcı etkiye sahip olduğu bulunmuştur. (Li S. ve Zheng W. 2018). SIRT4'ün aşırı ifadesi, glutamin katabolizmasının inhibisyonu yoluyla kanser hücresi proliferasyonunu inhibe eder (Yoo H. C. ve ark. 2020).

SIRT4'ün son zamanlarda, DNA hasarına bağlı glutamin katabolizmasının inhibisyonuna aracılık ederek DNA hasarına verilen metabolik yanıtta önemli bir oyuncu olduğu keşfedildi (Li S. ve Zheng W. 2018). Glutamin, mitokondriyal glutaminaz tarafından glutamat oluşturmak üzere katabolize edilebildiğinden, ve arkasından mitokondriyal glutamat dehidrojenaz ve aspartat aminotransferaz tarafından katalize edilen reaksiyonlarla glutamattan sitrik asit döngüsü ara ürünü a-ketoglutarat üretilbildiğinden, SIRT4 aracılı glutamin katabolizmasının inhibisyonu, özellikle de sitrik asit döngüsünün anaplerotik ikmali, DNA hasar onarımının gerçekleşmesi için bir durum yaratacaktır. Bu SIRT4 aracılı glutamin katabolizması inhibisyonu, DNA hasarlarını barındıran hücrelere karşı antiproliferatif bir etkiye sahip olduğundan, tümör baskılayıcı bir etkiye de yol açacaktır (Li S. ve Zheng W. 2018).

Bir diğer çalışmada; transfeksiyon yöntemi kullanılarak SIRT4 ifadesi arttırılan hücrelerde, SIRT4'ün, glutamat metabolizmasını düzenleyerek potansiyel koruyucu etki gösterdiği ve hücre ölümünü azalttığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda, SIRT4'ün, eksitotoksisiteyi moleküler mekanizmasını düzenleyerek engellediği bulunmuştur (Çolak M. 2020).

ER (endoplazmik retikulum) stresi oluşturulan glia hücre modeli ile yapılan bir çalışmada ise SIRT4'ün susturulmasının ER stresini azalttığı; bu nedenle SIRT4 inhibitörlerinin beyin hastalıkları için terapötik olarak geliştirilebileceği sonucuna varılmıştır (Akkulak A., Yalçın G. D. 2022).



## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihaz listesi:

+4 Buzdolabı (Samsung)

-20 Buzdolabı (Samsung)

-80 Buzdolabı (Nuaire)

Buz cihazı (Uğur buzaL60)

Sıcak su banyosu (Memmert)

Otoklav (Hirayama)

Santrifüj (Hettich zentrifugen EBA 20)

Soğutmalı santrifüj (Eppendorf centrifuge 5415 R)

Isı Bloğu (Biosan TS 100)

Vorteks (İsoLab)

Nanodrop (Nabi)

Thermal Cycler (BioRad T100)

Real-Time PCR (Thermo Fischer Step One Plus)

Pipet seti (10 µl, 100 µl, 1000 µl, Eppendorf)

#### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

PureLink FFPE Total RNA İzolasyon Kiti (İnvitrogen)

Etanol (Sigma)  
RNase içermeyen su (İnvitrogen)  
cDNA sentez kiti (WizScript)  
qPCR mastermix (SYBR) (WizPure)  
GDH, GS, SIRT4,  $\beta$ -actin forward / reverse primerleri

### 3.2. Yöntem

2012-2017 yılları arasında İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde (Türkiye) yatan hastalara ait cerrahi olarak çıkarılan 84 primer intrakraniyal tümör retrospektif olarak toplanmıştır. Tıbbi otopsi sırasında beynin korteks ve medullasından alınan 12 sağlıklı beyin dokusu kontrol olarak kullanılmıştır. WHO 2016 derecelendirme şeması, tümörleri tanımlamak ve derecelendirmek için kullanılmıştır (Şekil 2). Bu tanımlar Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasına göre glioblastoma, astrositoma, medulloblastoma, menengioma, oligodendroglioma ve ependimomadır. (Tablo 3B) Dahil edilen hastaların yaş aralığı 19 ve 77'dir. Medulloblastoma hastalarının yaş aralığı 2-39 yıldır. Hastalardan gerekli tüm bilgiler alınmıştır (Tablo 3A).

Temsili donör doku alanları, formalinle sabitlenmiş ve parafine gömülmüş 0,6 mm çaplı doku silindirleri ile delinmiştir. Doku mikrodizisi (TMA) lekeleri en az %50 tümör hücresi içerir.

Çalışmada kontrol olarak kullanılan normal beyin dokuları, tıbbi otopside esas olarak beyinlerin korteks ve medullasından elde edilmiştir. Bazıları, incelenmesi oldukça zor olan meninksler içermekte idi. Ek olarak, bu retrospektif bir çalışma olduğundan, toplam RNA, meninkslerin ayrılmasının mümkün olmadığı parafine gömülü doku bloklarından izole edilmiştir.

**Tablo 3.** Hasta Özellikleri **A.)** Tümör tiplerine göre hasta sayısı. **B.)** Her tümör evresine göre hasta sayıları

**A.)**

Hasta Özellikleri	Hasta Sayısı	%
Erkek	46	54.8
Dişi	38	45.2
Toplam	84	100
<b>Tip</b>		
GBM (Glioblastoma Multiforme)	33	39.3
Medulloblastoma	9	10.7
Astrocitoma	11	13.1
Pilositik	4	4.8
Diffuz	4	4.8
Anaplastik	3	3.6
Ependimoma	10	11.9
Oligodendroglioma	8	9.5
Menengioma	13	15.5

**B.)**

Evre 1		Evre 2		Evre 3		Evre 4	
Pilositik Astrocitoma	4	DiffüzAstrocitoma	4	Anaplastik Astrocitoma	3	GBM	33
Menengioma	13	Oligodendroglioma	3	Anaplastik Oligodendroglioma	5	Medulloblastoma	9
Ependimoma	1	Ependimoma	9				
<b>Toplam</b>	<b>18</b>		<b>16</b>		<b>8</b>		<b>42</b>

### 3.2.1. Gen İfadesi Değişim Analizleri

Parafin blok içinde bulunan primer tümörlü beyin dokularından, total RNA izole edildikten sonra cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA'lerden, Sirtuin 4 (SIRT4), Glutamin Sentetaz (GS) ve Glutamat Dehidrojenaz (GDH) primerleri kullanılarak qPCR reaksiyonu ile bu genlere ait mRNA seviyesi belirlenmiştir. Gen ifade düzeyinde oluşan değişiklikler, primer tümörlü beyin dokuları ve kontrol dokuları arasında karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

#### 3.2.1.1.Total RNA İzolasyonlarının Yapılması

Parafinli dokulardan, İnvitrogen PureLink FFPE Total RNA İzolasyon Kit'i kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

## **Deparafinizasyon ve Lizis**

- Her örnek için steril, RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne ~10mm'lik formalinle fikse edilmiş, parafine gömülü numuneler koyulmuştur.
- Tüplere 300 µl eritme solüsyonu eklenmiştir.
- Maksimum hızda 10-20 saniye santrifüj edilmiştir.
- Parafini eritmek için ısı bloğu 72°C'ye ayarlanıp tüpler koyuldu ve arada bir karıştırarak (vorteks ile) 10 dakika beklenilmiştir.
- Tüp kapağında kalan sıvıyı toplamak için kısa bir santrifüj yapılmıştır.
- Tüplere 20 µl proteinaz K eklenmiştir.
- Isı bloğu 60°C'ye ayarlanıp tüpler koyuldu ve arada bir karıştırarak (vorteks ile) 3 saat beklenilmiştir.
- Üstte lizattan ayrılmış ince bir parafin tabakası oluşturmak için maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra altta kalan lizat; 1mL pipet ucu ile girilip parafin dokusu alınmadan lizat yeni tüplere alınmıştır.

## **Saflaştırma Prosedürü**

### **Binding Step (Bağlama Adımı)**

- İçinde lizat olan yeni tüplere 400 µl bağlama solüsyonu ve 800 µl %100 etanol eklenip iyice karıştırılmıştır.
- Numune+bağlama solüsyonu+etanol bulunan tüplerden 700 µl alınmıştır ve kolon tüplerine koyulmuştur.
- Kolonlu tüpler 1 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Kolon tüpünün altındaki akışlar atılmıştır.
- Numune+bağlama solüsyonu+etanol tüpündekiler bitene kadar işlem tekrar edilmiştir.
- Kolonlar yeni tüplere yerleştirilmiştir.

### **Washing Step (Yıkama Adımı)**

- 20 ml yıkama solüsyonuna 80 ml %100 etanol eklenip iyice karıştırılmıştır.
- Kolon olan yeni tüplere 500 µl yıkama solüsyonu (etanollü) eklenmiştir. Tüpler 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Tüp dibindeki akışlar atılmıştır.
- Yıkama işlemi toplamda 3 kez yapıp tüp dibindeki akışlar atılmıştır.
- Daha sonra kolonlarda kalan solüsyonu atabilmek için boş olarak kolonlu tüpler 1 dakika 13.000 rpm'de tekrar santrifüj edilmiştir.

### **Elution Step (Elüsyon Adımı)**

- RNaz içermeyen su 65°C'de önceden ısıtılmıştır.
- Kolon altındaki tüpler atılmıştır. Kolonlar yeni tüpler (recovery tube) içerisine yerleştirilmiştir.
- Kolona değmeden tam ortasına ısıtılmış RNaz içermeyen sudan her bir örneğe 50 µl eklenmiştir.
- Kolonlu tüpler 65°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolonlar atılmıştır. Tüpler bir sonraki kullanıma kadar -80'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.1.2. RNA'nın Saflık ve Kalite Kontrolünün Yapılması**

Nanodrop cihazı kullanılarak izolasyonu yapılan RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri belirlenmiştir. Her RNA örneğinden 1µl alınarak cihaza koyularak ölçüm alınmıştır. Cihaz saflık değerlerini A260:A280 ve A260:A230 nanometre dalga boylarındaki absorbanlarda vermiştir. İzolasyonu yapılan RNA örneklerinin mRNA ifade analizlerinde kullanılabilmek için A260:A280 nanometre dalga boylarındaki absorbanının 1.8-2.0 aralığında olması, A260:A230 nanometre dalga boylarındaki absorbanının 1.7' den büyük olması gerekmektedir.

cDNA sentezi için her örnekten 100 ng / µl RNA olacak şekilde hacimler hesaplanmıştır.

### 3.2.1.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezinin Gerçekleştirilmesi

cDNA sentezi için WizScript kiti kullanılmıştır. Toplamda 10 µl master mix için gerekli malzemeler hazırlanmıştır;

- 10x Reaksiyon tamponu (1 örnek için: 2 µl)
- 20x dNTP karışımı (1 örnek için: 1 µl)
- Random hegzamer primer (1 örnek için: 2 µl)
- Revers transkriptaz (1 örnek için: 1 µl)
- RNAaz inhibitör (1 örnek için: 0,5 µl)
- RNAaz içermeyen su (1 örnek için: 3,5 µl)

Master mix kullanacağımız örnek sayısına göre hesaplanmıştır ve buz üstüne alınıp yavaşça karıştırılmıştır.

Master mix'ten 10 µl mikro santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Üzerine 10 µl RNA örnekleri eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Hava kabarcığı kalmaması için kısa bir santrifüj yapılmıştır ve tüpler buz üzerine alınmıştır.

Reaksiyon için BioRad T100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Aşağıdaki aşamalar için cihazda ayarlamalar yapılmıştır.

**Tablo 4.** Komplementer DNA (cDNA) reaksiyon şartları.

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dakika
37°C	85 dakika
85°C	5 dakika
4°C	∞

cDNA sentezinden sonra örnekler -80°C'de saklanmıştır.

### 3.2.1.4. Real Time PCR (RT-PCR)

RT-PCR reaksiyonu WizBio qPCR (quantitative PCR) kiti ile yapılmıştır.

Kit içindeki syber master mix, ROX boyası ve RNAaz içermeyen su oda sıcaklığında çözülmüş, santrifüj edilmiş ve buz üzerine koyulmuştur.

Primerler üretici firma tarafından belirtilen hacimlerde nükleaz içermeyen su ile çözümlenerek 100 µM konsantrasyonluk stoklar hazırlanmıştır. Reaksiyonlarda kullanılan primerlerin baz dizileri aşağıda verilmiştir.

**Tablo 5.** Deneyde kullanılan primer baz dizileri

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
GDH	ACAGGATATCGGGTGCATCT	GCTGTTCTCAGG TCCAATCC
GS	GGGAGGAGAATGGTCTGAAG	TCGTTGATGTTGGAGGTTTC
SIRT4	GATCATCCCTGCAGGTGTACTCT	GGGTCTATTAAGGCAGCAA
β-actin	AACTGGGACGACATGGAGAA	GAAGGTCTCAAACATGATCTGG

20 µl reaksiyon koşulları 96'lık qPCR plate'lerinde şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

- qPCR SYBR master mix (1 örnek için: 10 µl)
- ROX boyası (1 örnek için: 1 µl)
- 10 uM forward primer (1 örnek için: 1 µl)
- 10 uM reverse primer (1 örnek için: 1 µl)
- RNAaz içermeyen su (1 örnek için: 2 µl)
- cDNA (1 örnek için: 5 µl)

Tüm reaktifler hazırlandıktan sonra yavaşça pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Hızlı bir şekilde santrifüj edilmiştir.

96'lık qPCR plate'ine master mix ve örnekler koyulmuştur.

Plate RT-PCR cihazına alınmış ve qPCR döngüleri aşağıdaki gibi cihaz sistemine girilip reaksiyon başlatılmıştır.

**Tablo 6.** qPCR reaksiyon şartları.

Sıcaklık	Zaman	Döngü
95°C	5 dakika	1
95°C	15 saniye	50
60°C	20 saniye	50
72°C	30 saniye	50
4°C	∞	

mRNA ifadeleri,  $\beta$ -aktinmRNA seviyelerine oranlanarak hesaplanmıştır.

### 3.2.2. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizi yapmak için GraphPad Prism 5 (San Diego, ABD) uygulaması kullanılmıştır. Two Tailed, Unpaired t-test with Welch's Correction ve One Way ANOVA testleri yapılmıştır.  $p < 0,05$  anlamlı kabul edilmiştir ve şekiller üzerinde sembollerle gösterilmiştir. Ortalamanın standart hatası (SEM), hata çubukları ile gösterilmiştir.



## 4. BULGULAR

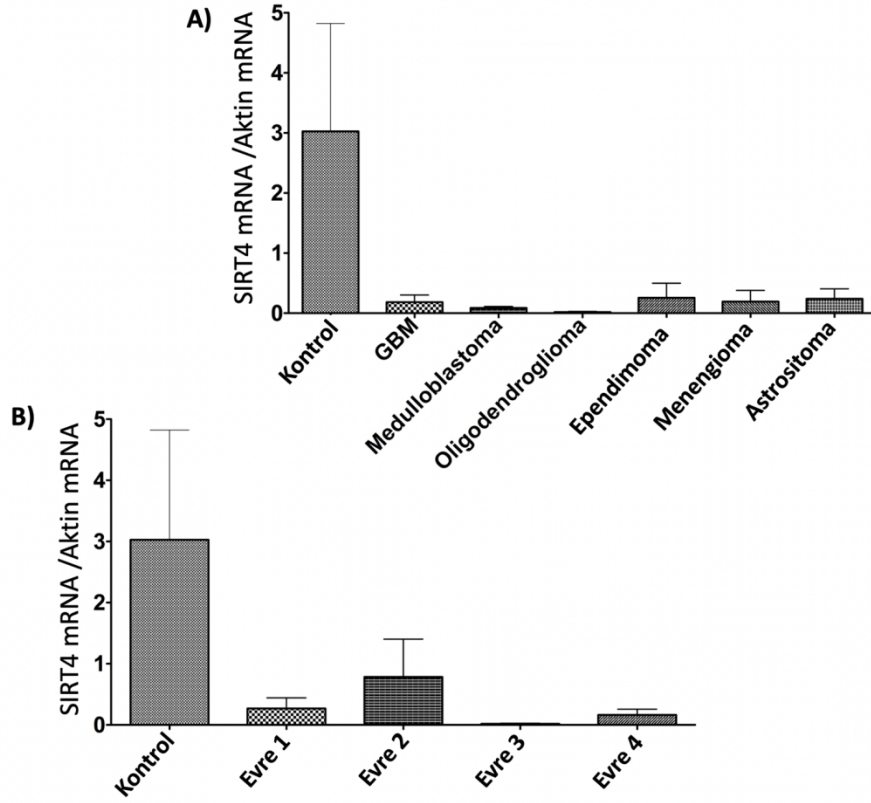
Bu çalışmada; intrakraniyel primer tümör dokularında ve kontrol beyin dokularında, GDH, GS ve SIRT4 gen ifadeleri kantitatif RT-PCR kullanılarak gösterilmiştir. Ayrıca, evre (Grade) 1, 2, 3 ve 4 tümörler arasında, belirlenen gen ifadeleri kıyaslanmıştır.

### 4.1. SIRT4'ün İntrakraniyel Primer Tümör Dokularındaki Gen İfadesinin Belirlenmesi

SIRT4 mRNA ifadeleri kantitatif PCR ile belirlenmiştir. Kontrol dokuları ve çeşitli intrakraniyel tümörlerdeki (GBM (glioblastoma multiforme), medulloblastoma, oligodendroglioma, ependimoma, menengioma ve astrositoma) SIRT4 mRNA ifadeleri, şekil 9A'da gösterilmiştir. Her grubun ortalaması ve standart hatası şekilde gösterilmiştir. Welch's Correction ile Two-Tailed Unpaired t-testi yapılmıştır. T-testte tüm tümör çeşitleri kontrol ile karşılaştırılıp P değerleri bulunmuştur (Astrositoma - Kontrol p=0,1505, GBM - Kontrol p=0,1426, Medulloblastoma - Kontrol p=0,1296, Menengioma - Kontrol p=0,1449, Oligodendroglioma - Kontrol p=0,122, Ependimoma - Kontrol p=0,1545) (Şekil 9A). T-test sonucu p değerleri 0,05'ten büyük olduğu için istatistiksel olarak anlamlı değildir. Grupların farklı olduğunu gösteren One Way ANOVA ile çoklu grup analizi yapılmıştır ve p<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir. P değeri 0.0162, R<sup>2</sup> =0.1590 olarak bulunmuştur. Yapılan One Way ANOVA analizi sonucunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 9A). Sonuç olarak GBM (glioblastoma multiforme), medulloblastoma, oligodendroglioma, ependimoma, menengioma ve astrositoma gibi çeşitli kafa içi tümörlerde, SIRT4 mRNA düzeylerinin kontrollere göre azaldığı bulunmuştur.

SIRT4 mRNA ifadesi, tümör evresinde (1, 2, 3, 4) de analiz edilmiş ve ifadesi şekil 9B'de gösterilmiştir. Welch's Correction ile Two-Tailed Unpaired t-testi yapılmıştır. T-testte tüm tümör evreleri kontrol ile karşılaştırılıp P değerleri bulunmuştur (Evre 1 - Kontrol p=0,1545, Evre 2 - Kontrol p=0,2589, Evre 3 - Kontrol p=0,1219 , Evre 4 - Kontrol p=0,1396). T-test sonucu p değerleri 0,05'ten büyük olduğu için istatistiksel olarak anlamlı değildir. Grupların farklı olduğunu gösteren One Way ANOVA ile çoklu grup analizi

yapılmıştır ve  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. P değeri 0.0102,  $R^2 = 0.1340$  olarak bulunmuştur. Yapılan One Way ANOVA analizi sonucunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 9B) Sonuç olarak kontrole karşı tüm tümör evrelerinde de SIRT4 mRNA ifadesinin azaldığı bulunmuştur.



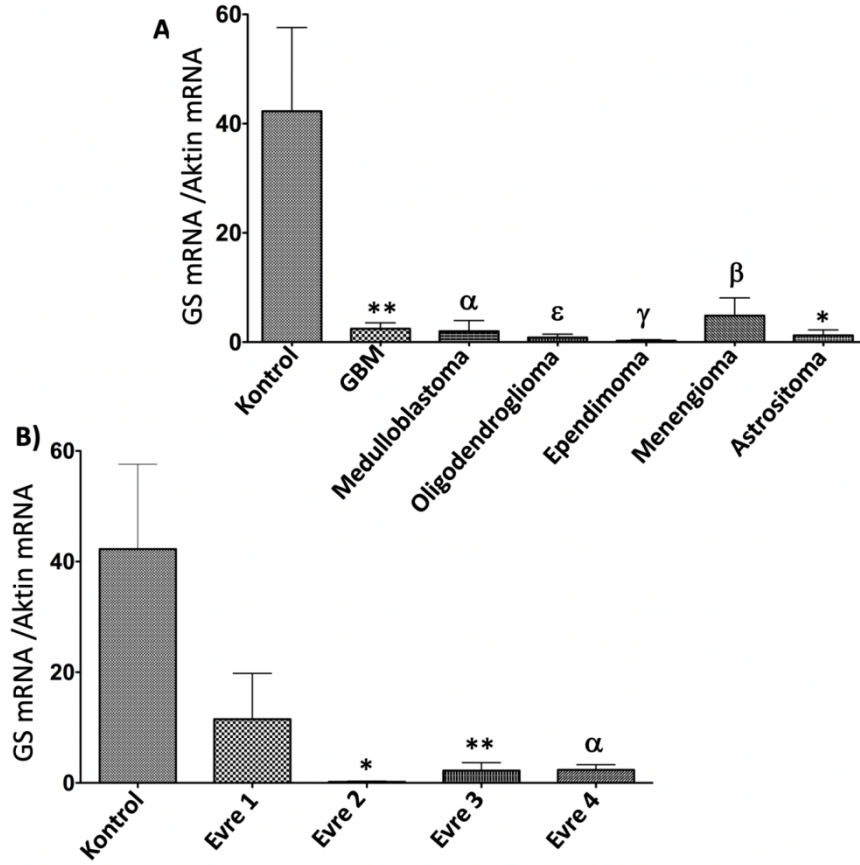
**Şekil 9.** İntrakraniyel primer tümör dokularında SIRT4 gen ifade analizi **A)** İntrakraniyel primer tümör dokularında (GBM (Glioblastoma Multiforme), Medulloblastoma, Oligodendroglioma, Ependimoma, Menengioma, Astrositoma) ve kontrol beyin dokularında SIRT4 mRNA ifadesi. **B)** Her tümör evresinde (1, 2, 3, 4) kontrole karşı SIRT4 mRNA ifadesi.

#### 4.2. Glutamin Sentetaz (GS)'nin İntrakraniyel Primer Tümör Dokularındaki Gen İfadesinin Belirlenmesi

GS mRNA ifadeleri kantitatif PCR ile belirlenmiştir. Kontrol beyin dokuları ve çeşitli intrakraniyel tümörlerdeki (GBM (glioblastoma multiforme), medulloblastoma, oligodendroglioma, ependimoma, menengioma ve astrositoma) GS mRNA ifadeleri şekil

10A'da gösterilmiştir. Her grubun ortalaması ve standart hatası şekilde gösterilmiştir. Welch's Correction ile Two-Tailed Unpaired t-testi yapılmıştır. T-testte tüm tümör çeşitleri kontrol ile karşılaştırılıp P değerleri bulunmuştur (Astrositoma - Kontrol  $p^*=0.0217$ , GBM - Kontrol  $p^{**}=0.0251$ , Medulloblastoma - Kontrol  $p^{\alpha}=0.0244$ , Menengioma - Kontrol  $p^{\beta}=0.0360$ , Oligodendroglioma - Kontrol  $p^{\epsilon}=0.0207$ , Ependimoma - Kontrol  $p^{\gamma}=0.0192$ ). T-test sonucu p değerleri 0,05'ten küçük olduğu için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Grupların farklı olduğunu gösteren One Way ANOVA ile çoklu grup analizi yapılmıştır. P değeri  $<0.0001$ ,  $R^2=0.3330$  olarak bulunmuştur. Yapılan One Way ANOVA analizi sonucunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 10A). Sonuç olarak GBM (glioblastoma multiforme), medulloblastoma, oligodendroglioma, ependimoma, menengioma ve astrositoma gibi çeşitli kafa içi tümörlerde GS mRNA ifadesinin kontrole karşı azaldığı bulunmuştur.

GS mRNA ifadesi, tümör evresinde (1, 2, 3, 4) de analiz edilmiş ve ifadesi şekil 10B'de gösterilmiştir. Welch's Correction ile Two-Tailed Unpaired t-testi yapılmıştır (Şekil 10B). T-testte tüm tümör evreleri kontrol ile karşılaştırılıp P değerleri bulunmuştur (Evre 1 - Kontrol  $p=0,0956$ , Evre 2 - Kontrol  $p^*=0.0191$ , Evre 3 - Kontrol  $p^{**}=0.0247$ , Evre 4 - Kontrol  $p^{\alpha}=0.0247$ ). T-test sonucu 1.evre hariç diğer evrelerde p değeri 0,05'ten küçük olduğu için istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen tümör dereceleri arasında önemli ölçüde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 1.evrede ise p değeri 0,05'ten büyük olduğu için sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir. Grupların farklı olduğunu gösteren One Way ANOVA ile çoklu grup analizi yapılmıştır ve  $p<0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. P değeri  $<0.0001$ ,  $R^2=0.2389$  olarak bulunmuştur. Yapılan One Way ANOVA analizi sonucunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 10B) Sonuç olarak kontrole karşı tüm tümör evrelerinde de GS mRNA ifadesinin azaldığı bulunmuştur.



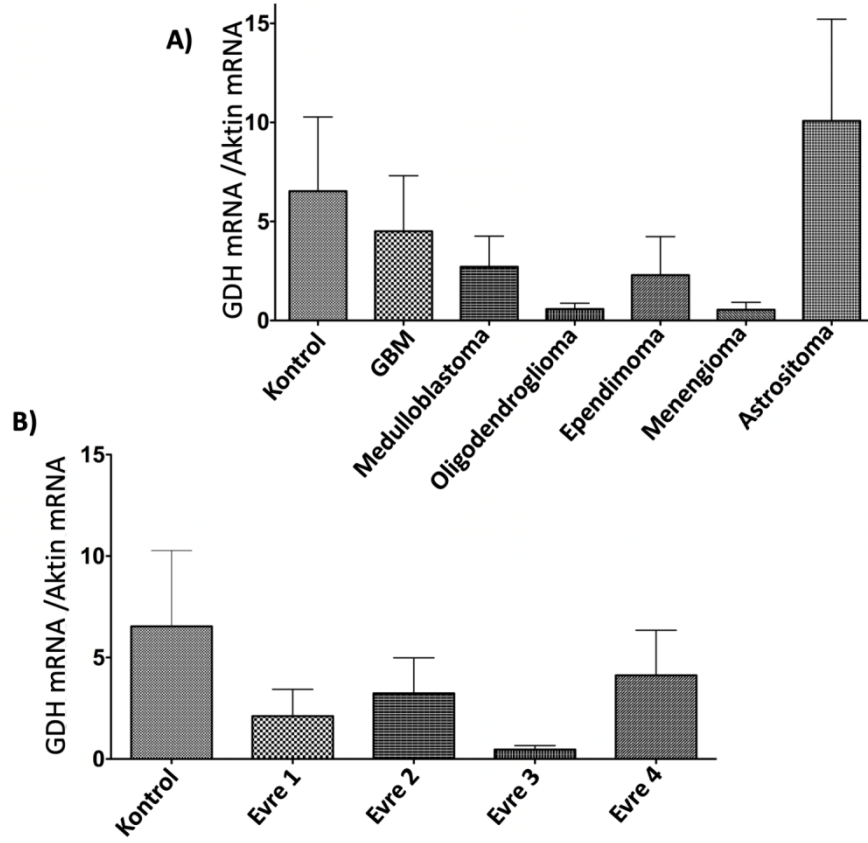
**Şekil 10:** İntrakraniyel primer tümör dokularında GS gen ifade analizi **A)** İntrakraniyel primer tümör dokularında (GBM (Glioblastoma Multiforme), Medulloblastoma, Oligodendroglioma, Ependimoma, Menengioma, Astrositoma) ve kontrol beyin dokularında GS mRNA ifadesi. **B)** Her tümör evresinde (1, 2, 3, 4) kontrole karşı GS mRNA ifadesi.

#### 4.3. GDH'ın İntrakraniyel Primer Tümör Dokularındaki Gen İfadesinin Belirlenmesi

GDH mRNA ifadeleri kantitatif PCR ile belirlenmiştir. Kontrol beyin dokuları ve çeşitli intrakraniyal tümörleri (GBM (glioblastoma multiforme), medulloblastoma, oligodendroglioma, ependimoma, menengioma ve astrositoma) mRNA ifadeleri şekil 11A'da gösterilmiştir. Her grubun ortalaması ve standart hatası şekilde gösterilmiştir. Welch's Correction ile Two-Tailed Unpaired t-testi yapılmıştır. T-testte tüm tümör çeşitleri kontrol ile karşılaştırılıp P değerleri bulunmuştur (Astrositoma - Kontrol p=0,5839, GBM - Kontrol p=0,6685, Medulloblastoma - Kontrol p=0,3613, Menengioma - Kontrol p =0.1393, Oligodendroglioma - Kontrol p=0.1407, Ependimoma - Kontrol p=0.3291). T-test sonucu p

değerleri 0,05'ten büyük olduğu için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Grupların farklı olduğunu gösteren One Way ANOVA ile çoklu grup analizi yapılmıştır. P değeri 0,5557,  $R^2 = 0,05367$  olarak bulunmuştur. Yapılan One Way ANOVA analizi sonucunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 11A). Sonuç olarak GBM (glioblastoma multiforme), medulloblastoma, oligodendroglioma, ependimoma, menengioma ve astrositoma gibi çeşitli tümörlerdeki GDH mRNA seviyeleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

GDH mRNA ifadesi, tümör evresinde (1, 2, 3, 4) de analiz edilmiş ve ifadesi şekil 11B'de gösterilmiştir. Welch's Correction ile Two-Tailed Unpaired t-testi yapılmıştır (Şekil 11B). T-testte tüm tümör evreleri kontrol ile karşılaştırılıp P değerleri bulunmuştur (Evre 1 - Kontrol  $p=0.2850$ , Evre 2 - Kontrol  $p=0.4367$  Evre 3 - Kontrol  $p=0.330$ , Evre 4 - Kontrol  $p=0.5860$ ). P değerleri 0,05'ten büyük olduğu için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Grupların farklı olduğunu gösteren One Way ANOVA ile çoklu grup analizi yapılmıştır ve P değeri 0,7874,  $R^2 = 0,01912$  olarak bulunmuştur. Yapılan One Way ANOVA analizi sonucunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 10B). Farklı dereceler kontrollerle karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark bulunamamıştır.



**Şekil 11.** İntrakraniyel primer tümör dokularında GDH gen ifade analizi **A)** İntrakraniyel primer tümör dokularında (GBM (Glioblastoma Multiforme), Medulloblastoma, Oligodendroglioma, Ependimoma, Menengioma, Astrositoma) ve kontrol beyin dokularında GDH mRNA ifadesi. **B)** Her tümör evresinde (1, 2, 3, 4) kontrole karşı GDH mRNA ifadesi.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, kafatası içinde bulunan çeşitli tümörlerde, SIRT4, GS ve GDH enzimlerinin mRNA ifade seviyeleri, RT-PCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir ve kontrol olarak sağlıklı beyin dokusu ile karşılaştırılmıştır (Şekil 9, 10, 11). Ayrıca, çeşitli tümör evrelerinde de bu enzimlerin mRNA ifadeleri belirlenerek kıyaslamalar yapılmıştır.

SIRT4 ve GS mRNA seviyelerinin, intrakraniyal tümörlerde kontrollere göre daha düşük olduğu, GDH mRNA seviyelerinin ise anlamlı bir farklılık göstermediği gözlemlenmiştir. SIRT4 mRNA seviyeleri, tüm intrakraniyal tümörlerde ve ayrıca tüm tümör evrelerinde kontrollere göre daha düşük bulunmuştur; ancak t-testine göre istatistiksel anlamlılık görülmemiştir. SIRT4 mRNA ifadeleri için, One Way ANOVA yapılan çoklu grup analizlerinde, grupların birbirinden farklı olduğunu gösteren anlamlı p değerleri bulunmuştur. GS mRNA ifadeleri için ise hem t-testte hem de One Way ANOVA testinde sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda SIRT4 ve GS'nin protein ifadeleri glioblastoma hücrelerinde arttığı için hücrelerden elde edilen verilerle bu sonuçlar çelişmektedir. (Akkulak A. ve ark. 2021). İn vivo ve in vitro deneylerden elde edilen sonuçların farklı olmasının çeşitli nedenleri vardır. Örneğin; tümör mikroçevresi hücre mikroçevresinden çok farklıdır ve bu nedenle SIRT4, GS ve GDH mRNA ifadelerini farklı şekilde etkileyen faktör ve yollar vardır. Ayrıca U87 ve İHA birbirlerinden farklı büyüme ve bölünme karakterlerine sahip hücre dizileridir (Akkulak A. ve ark. 2021). İki hücre hattı bile birbirinden farklı özellikler gösterirken tümör dokularında farklı sonuçlar görmemiz olası bir durumdur. Glutamat metabolizması modülatörlerinin gen veya protein ifadeleri farklı hücre dizilerinde de çalışılmalıdır. Aynı genlerin protein ifadeleri ve mRNA ifadeleri farklı şekillerde düzenlendiğinden bize farklı sonuçlar verebilir.

mRNA ile protein ifadelerinin farklı değişim göstermesinde rol oynayabilecek mekanizmalardan biri de miRNA'lardır (Gurtan A. M. ve Sharp P. A. 2013). SIRT4, GS ve GDH'ı hedefleyen miRNA'lar, hücre hatları ve tümörlerde farklı şekilde ifade edilebilir. Bu yüzden aynı genlerin mRNA ve protein ifadeleri hücreler ve dokular arasında farklılık gösterebilir (Gurtan A. M. ve Sharp P. A. 2013).

Çalışmamızda incelediğimiz kafatası tümörler arasında; WHO 2016 derecelendirme sistemine göre evre 1 tümör olan menengioma, beyindeki meninkslerden kaynaklanır (Maggio I. ve ark. 2021). Çalışmada kontrol olarak kullanılan normal beyin dokuları, tıbbi otopside genel olarak beyinlerin korteks ve medullasından elde edilmiştir. Bazıları, incelemesi oldukça zor olan meninksleri içermekte idi. Ek olarak, bu retrospektif bir çalışma olduğundan, toplam RNA, meninkslerin ayrılmasının mümkün olmadığı parafine gömülü doku bloklarından izole edildi. Bazıları meninks içeren bu normal beyin dokularının menengiomalar için en iyi kontrol olmayabileceğinin farkındayız. Ancak menengiomalar pilositik astrositoma ve ependimoma ile birlikte Evre 1 tümörlere aittir (Maggio I. ve ark. 2021).

Bu çalışmada, tümörlü dokular ve kontrol dokuları üzerinde yapılan karşılaştırmalı incelemeler, nörodejeneratif hastalıklarında ve beyin tümörlerinde ortak mekanizma olan eksitotoksitenin anlaşılmasında yol gösterici olacaktır.

Önceki çalışmalarda, SIRT4'ün MEF hücrelerinde ve farelerde tümör baskılayıcı aktivite gösterdiği ve nöroblastoma tümör büyümesini önlediği gösterilmiştir (Jeong SM. ve ark. 2013, Wang Y. ve ark. 2018). Mide tümör hücrelerinde SIRT4 ifadesinin azalmış olduğu gösterilmiştir (Sun H. ve ark. 2018). Ek olarak, SIRT6'nın glioma hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Feng J. ve ark. 2016). Çeşitli kafa içi tümör tiplerinde SIRT4 gen ifadesinde azalma gözlemlediğimiz için SIRT4'ün merkezi sinir sistemi tümörlerinin çoğunluğunu baskılayabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, SIRT4'ün kafa içi tümörlerde tümör baskılayıcı işlevinin altında yatan mekanizmaları ortaya çıkaran gelecekteki çalışmaları yürütmek, mekanizmaları anlamamızda daha önemli olacaktır.

Birlikte ele alındığında, kontrollere kıyasla çeşitli kafa içi tümörlerde hem SIRT4 hem de GS mRNA ifadelerinin azaldığının gösterilmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Kafa içi tümörlerin moleküler mekanizmalarını anlamak için glutamat metabolizması ve eksitotoksitesi hakkında daha fazla çalışma yapılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir. SIRT4, GS ve GDH'nin modülatörü olduğundan dolayı SIRT4'ün küçük molekül aktivatörleri de terapötik olarak glioblastoma alanında araştırılabilir.

Başka bir çalışmada, glutaminaz protein ifadesi, yedi primer GBM'nin hepsinde eksprese edilmiştir, ancak her tümör tipi farklı ifade seviyeleri sergilenmiştir (Thomas ve ark. 2009). Günümüzde AH ve demans tedavisinde kullanılan NMDA reseptör antagonisti



olan Memantine, glutamat eksitotoksitesini hedefleyen bir ilaçtır (Thomas ve ark, 2009). ALS (Amyotrofik Lateral Skleroz) tedavisinde kullanılan Riluzole (Rilutek) ise Merkezi Sinir Sistemi'nde glutamaterjik nörotransmisyonu engellemektedir (Doble, 1996). GDH ve GS'nin modülatörü olan SIRT4 ile yapılan çalışmaların, glutamat ve eksitotoksiste mekanizmalarının anlaşılmasında etkili olacağı düşünülmektedir. Ayrıca nörodejenaratif hastalıkların hücresel düzeyde anlaşılması yeni ilaç ve tedavi yöntemleri geliştirilmesinde önemli bir rol oynayacaktır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Glioblastoma (GBM) en yaygın kötü huylu beyin tümörüdür. GBM'lerin sadece beyinde oluştuğu bilinmesine rağmen beyin sapı ya da omurilikte de görülebilmektedir (Davis M. E. 2016). Glioblastomanın ve diğer nörodejeneratif hastalıkların ortak mekanizması olan eksitotoksisite, aşırı glutamat salınımı ve bozulmuş geri alım nedeniyle oluşup nöron ölümüne ve hasarına neden olur. Bu yüzden, sinaptik boşluktan glutamatın geri alınması bu hastalıkların riskini azaltmaktadır.

Bu çalışmada; ilk olarak parafine gömülü intrakraniyel primer tümör dokularından RNA izolasyonu yapıp daha sonra cDNA elde edilmiştir. RT-PCR yöntemi ile glutamin sentetaz (GS), glutamat dehidrojenaz (GDH) ve SIRT4'ün mRNA ifadeleri belirlenmiştir. Sonuçlar analiz edilmiştir. SIRT4 ve GS mRNA ifadelerinde kontrol dokulara göre tüm intrakraniyel tümörlü dokularda bir azalma görülürken, GDH mRNA ifadesinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. Ayrıca kontrole karşı tüm tümör evrelerinde de GS ve SIRT4 mRNA ifadesinin azaldığı bulunmuştur. GDH mRNA ifadesinde de kontrole karşı tüm tümör evrelerinde anlamlı bir farklılık göstermediği gözlemlenmiştir. SIRT4 mRNA seviyeleri, tüm intrakraniyel tümörlerde ve ayrıca tüm tümör evrelerinde kontrollere göre daha düşük bulunmuştur; ancak t-testine göre istatistiksel anlamlılık görülmemiştir. SIRT4 mRNA ifadeleri için, One Way ANOVA yapılan çoklu grup analizlerinde, grupların birbirinden farklı olduğunu gösteren anlamlı p değerleri bulunmuştur. GS mRNA ifadeleri için ise hem t-testte hem de One Way ANOVA testinde sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Bulduğumuz sonuçlar ve gelecek çalışmalar ile GS, GDH ve SIRT4'ün beyin tümörlerinde ve diğer beyin hastalıklarındaki rolü daha iyi anlaşılacaktır. SIRT4'ün GS ve GDH gibi eksitotoksisite mekanizmasında rol alan enzimlerin modülatörü olduğunu anlaşılması ve üzerinde yeni çalışmalar yapılması ilaç ve tedavi geliştirilmesinde önemli olacaktır.

## KAYNAKLAR

- A Brassai , R-G Suvanjeiev , E-Gy Bán , M Lakatos** (2015) “Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced neurotoxicity”112:1-6.
- A. Castegna, L. Palmieri, I. Spera, V. Porcelli, F. Palmieri, MJ Fabis-Pedrini, RB Kean, DA Barkhouse, MT Curtis, DC Hooper** (2011) “Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis” *Neuroscience* Volume 185, Pages 97-105.
- A Castegna, L.Palmieri, I.Spera, V. Porcelli, F. Palmieri, M. J. Fabis-Pedrini, R.B. Kean, D.A. Barkhouse, M.T. Curtis, D.C. Hooper** (2011) “Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis” *Neuroscience* Volume 185, , Pages 97-105.
- Abderrahmane Hamlat <sup>1</sup>, Stephan Saikali, Jacques Chaperon, Michele Le Calve, Daniel Gedouin, Mohamed Ben-Hassel, Yvon Guegan** (2005) “Oligodendroglioma: clinical study and survival analysis correlated with chromosomal anomalies” 19(5):E15.
- Ahuja N., Schwer B., Carobbio S., Waltregny D., North B.J., Castronovo V., Maechler P., Verdin E.** (2007) “Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase.”
- Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T, Yamada S, Tomura H, Yamada Y, Inoue I, Kojima I, Takeda J** (2000). “Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter”. *J Neurochem.* 74 (6): 2622–5.
- Alex Hirtz, Fabien Rech, H el ene Dubois-Pot-Schneider, H el ene Dumond** (2020) “Astrocytoma: A Hormone-Sensitive Tumor”
- Alfred Csibi, Sarah-Maria Fendt, Chenggang Li, George Pouligiannis, Andrew Y. Choo, Douglas J. Chapski, Seung Min Jeong, Jamie Dempsey, Andrey Parkhitko, Tasha Morrison, Elizabeth Henske, Marcia Haigis, Lewis C. Cantley, Gregory**

- Stephanopoulos, Jane Yu, and John Blenis.** (2013) “The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4” *Cell*. 153(4): 840–854. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.023.
- Allan M Gurtan , Phillip A Sharp,** (2013) “The role of miRNAs in regulating gene expression networks” ;425(19):3582-600.
- Andreas Plaitakis, Helen Latsoudis, Cleanthe Spanaki** (2011) “The human GLUD2 glutamate dehydrogenase and its regulation in health and disease” *Neurochemistry International* Volume 59, Issue 4, Pages 495-509.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG** (1997). “Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (8): 4155–60.
- B S Meldrum** (2000) “Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology” 130(4S Suppl):1007S-15S.
- C Steinhäuser, V Gallo** (1996) “News on glutamate receptors in glial cells” (8):339-45.
- Camille Peri** (2022) “What Is Astrocytoma?” Medically Reviewed by Melinda Ratini, DO, MS on
- Carafa V., Rotili D., Forgione M., Cuomo F., Serretiello E., Hailu G.S., Jarho E., Kakkonen M.L., Mai A. and Altucci L.** (2016) “Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic”
- Choi D.W.** (1988) “Glutamate Neurotoxicity and Diseases of the Nervous System” *Neuron*. Vol. 1, 623-634,
- Colleen de Bellefonds** (2020) “Ependymoma” Medically Reviewed by Hansa D. Bhargava, MD
- Constantinos Alifieris, Dimitrios T.Trafalis.** (2015) “Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment” *Pharmacology & Therapeutics* Volume 152, Pages 63-82.
- Costantinos Alifieris, Dimitrios T Trafalis** (2015). “Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment”. *Pharmacology & Therapeutics*. 152: 63–82.

- Csibi A., Fendt S.M., Li C., Pouligiannis G., Choo A.Y., Chapski D.J., Jeong S.M., Dempsey J.M., Parkhitko A., Morrison T., Henske E.P., Haigis M.C., Cantley L.C., Stephanopoulos G., Yu J., Blenis J.** (2013) “The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4.”
- Çolak M.** (2020) “Hücre Modelinde SIRT4 (Sirtuin4)’ün Eksitotoksisiteye Karşı Koruyucu Etkinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın
- Daniel Komlos, Kara D. Mann, Yue Zhuo, Christopher L. Ricupero, Ronald P. Hart, Alice Y.-C. Liu ve Bonnie L. Firestein** (2013) “Glutamate Dehydrogenase 1 and SIRT4 Regulate Glial Development” *Glia*. Mar; 61(3): 394–408.
- David A. Reardon , Jeremy N. Rich , Henry S. Friedman , Darell D. Bigner** Show Less (2006) “Recent Advances in the Treatment of Malignant Astrocytoma” From the Departments of Surgery, Pediatrics, and Pathology, Duke University Medical Center, Durham, NC
- David E. Featherstone** (2010) “Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond” *ACS Chem Neurosci.* ; 1(1): 4–12.
- David N. Louis, Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, David W. Ellison** (2016) “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary” volume 131, pages 803–820
- Davis M.E.** (2016) “Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment”
- Derek R. Johnson & Brian Patrick O’Neill** (2012) “Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era” *Journal of neuro oncology* volume 107, pages 359-364
- Dönmez Yalçın G. and Colak M.** (2020) “SIRT4 prevents excitotoxicity via modulating glutamate metabolism in glioma cells”
- Elizabeth R Gerstner , Kristian W Pajtler** (2018) “Ependymoma” 38(1):104-111.
- Erika Mariana Palmieri, Iolanda Spera, Alessio Menga, Vittoria Infantino, Vito Iacobazzi, Alessandra Castegna** (2014) “Glutamine synthetase desensitizes differentiated adipocytes to proinflammatory stimuli by raising intracellular glutamine levels” *FEBS Letters* Volume 588, Issue 24, Pages 4807-4814.

- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG (1995).** “An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel”. *Nature*. 375 (6532): 599–603.
- Fei Li, ve Joe Z. Tsien (2009)**”Memory and the NMDA Receptors” *N Engl J Med*. 361(3): 302–303.
- Feng J, Yan PF, Zhao HY, Zhang FC, Zhao WH, Feng M (2016)** “SIRT6 suppresses glioma cell growth via induction of apoptosis, inhibition of oxidative stress and suppression of JAK2/STAT3 signaling pathway activation” *Oncol Rep* 35:1395–1402
- Fremeau RT, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH (2002).** “The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (22): 14488–93.
- Fritsch B, Reis J, Gasior M, Kaminski RM, Rogawski MA (2014).** “Role of GluK1 kainate receptors in seizures, epileptic discharges, and epileptogenesis”. *The Journal of Neuroscience*.
- Fulya Tosun (2008)** “Substantia Nigra’daki Dopamin Nöronlarında Kainat Reseptör Alt Birimlerinin Ekspresyonu.” Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa, 2008.
- Gallego O (2015).** “Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma”. *Current Oncology*. 22 (4): e273–81.
- Ganel R, Rothstein JD (1999)** “Chapter 15, Glutamate transporter dysfunction and neuronal death”. In Monyer, Hannah, Gabriel A. Adelman, Jonas, Peter (eds.). *Ionotropic glutamate receptors in the CNS*. Berlin: Springer. pp. 472–493.
- Go woon kim, Dong hoon lee, Yu hyun jeon, Jung yoo, So yeon kim, Sang wu lee, Ha young Cho, So Hee Kwon (2021)** “Glutamine Synthetase as a Therapeutic Target for Cancer Treatment” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(4), 1701
- Gözen O. (2008)** “Glutamat Taşıyıcısı EAAT2’nin Transkripsiyonu ve Regülasyonunun Kontrolü” Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 103.

- Grabowska A, Nowicki M, Kwinta J** (2011). “Glutamate dehydrogenase of the germinating triticale seeds: gene expression, activity distribution and kinetic characteristics”
- Guoyu Huang and Guanbao Zhu.** (2018) “Sirtuin-4 (SIRT4), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive activity in cancer” *Onco Targets Ther.* 11: 3395–3400.
- H Tapiero, G Mathé, P Couvreur, K.D Tew.** (2002) “II. Glutamine and glutamate” *Biomedicine & Pharmacotherapy* Volume 56, Issue 9, Pages 446-457.
- Häberle J., Görg B., Rutsch F., Schmidt E., Toutain A., Benoist J.F, Gelot A., Suc A.L, Höhne W., Schliess F., Häussinger D., Koch H.G.** (2005) “Congenital Glutamine Deficiency with Glutamine Synthetase Mutations”
- Haigis M.C., Mostoslavsky R., Haigis K.M., Fahie K., Christodoulou D.C., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Karow M., Blander G., Wolberger C., Prolla T.A., Weindruch R., Alt F.W., Guarente L.** (2006) “SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells.”
- Hee Chan Yoo , Ya Chun Yu , Yulseung Sung , Jung Min Han** (2020) “Glutamine reliance in cell metabolism” ;52(9):1496-1516.
- Hiroko Ohgaki, Paul Kleihues** (2005) “Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas “ *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 64, Issue 6, Pages 479–489,
- Hiroko Ohgaki, Paul Kleihues** (2013) “The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma”
- Hiroyasu Furukawa, Satinder K Singh, Romina Mancusso, Eric Gouaux** (2005) “Subunit arrangement and function in NMDA receptors” 10;438(7065):185-92.
- Hong Q. Smith, Changhong Li, Charles A. Stanley & Thomas James Smith** (2019) “Glutamate Dehydrogenase, a Complex Enzyme at a Crucial Metabolic Branch Point” *Neurochemical Research* volume 44, pages 117–132
- Hong Q. Smith, Changhong Li, Charles A. Stanley, and Thomas James Smith** (2019) “Glutamate Dehydrogenase, a Complex Enzyme at a Crucial Metabolic Branch Point” *Neurochem Res.* 44(1): 117–132.

- Huang G. Zhu G.** (2018) “Sirtuin-4 (SIRT4), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive activity in cancer.”
- Ida M. Washington, Gerald Van Hoosier** (2012) “Clinical Biochemistry and Hematology” Chapter 3. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents, American College of Laboratory Animal Medicine, Pages 57-116.
- Ilaria Maggio, Enrico Franceschi, Alicia Tosoni, Vincenzo Di Nunno, Lidia Gatto, Raffaele Lodi, Alba A Brandes** (2021) “Menengioma: not always a benign tumor. A review of advances in the treatment of menengiomas” 10(2): CNS72.
- Ingo H. Greger, Jake F. Watson, Stuart G. Cull-Candy.** (2017) “Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins.” Volume 94, Issue 4, P713-730.
- Jayne Cartmell Darryle D. Schoepp.** (2002) “Regulation of Neurotransmitter Release by Metabotropic Glutamate Receptors.”
- Jennifer Shih, Lei Liu, Andrew Mason, Haruki Higashimori, Gizem Donmez** (2014) “Loss of SIRT4 decreases GLT-1-dependent glutamate uptake and increases sensitivity to kainic acid” Journal of Neurochemistry Volume 131, Issue 5 p. 573-581
- Jeong S.M., Xiao C., Finley L.W., Lahusen T., Souza A.L., Pierce K., Li Y.H., Wang X., Laurent G., German N.J., Xu X., Li C., Wang R.H., Lee J., Csibi A., Cerione R., Blenis J., Clish C.B., Kimmelman A., Deng C.X., Haigis M.C.** (2013) “SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism.”
- Jeong SM, Xiao C, Finley LWS, Lahusen T, Souza AL, Pierce K, Li YH, Wang X, Laurent G, German NJ, Xu X, Li C, Wang RH, Lee J, Csibi A, Cerione R, Blenis J, Clish CB, Kimmelman A, Deng CX, Haigis MC** (2013) “SIRT4 has tumor suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism” Cancer Cell 23(4):450–463
- Jian Y Zou , Fulton T Crews** (2005) “TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition” 1034(1-2):11-24.



- Jian Zou, Yan-Xia Wang, Hui-Jun Mu, Jie Xiang, Wei Wu, Bin Zhang, Ping Xie** (2011) “Down-regulation of glutamine synthetase enhances migration of rat astrocytes after in vitro injury” *Neurochemistry International* Volume 58, Issue 3, Pages 404-413.
- Joanna Wang, Chetan Bettegowda** (2015) “Genomic discoveries in adult astrocytoma”
- Johannes Häberle, Boris Görg, Frank Rutsch, Eva Schmidt, Annick Toutain, Jean-François Benoist, Antoinette Gelot, Annie-Laure Suc, Wolfgang Höhne, Freimut Schliess, Dieter Häussinger, and Hans G. Koch** (2005) “Congenital Glutamine Deficiency with Glutamine Synthetase Mutations” *N Engl J Med* 2005; 353:1926-1933.
- Jones DT, Jäger N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, et al.** (2012). “Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma”. *Nature*. 488 (7409): 100–5.
- Julia E. Neumann, Michael Spohn, Denise Obrecht, Martin Mynarek, Christian Thomas, Martin Hasselblatt, Mario M. Dorostkar, Annika K. Wefers, Stephan Frank, Camelia-Maria Monoranu, Arend Koch, Hendrik Witt, Marcel Kool, Kristian W. Pajtler, Stefan Rutkowski, Markus Glatzel ve Ulrich Schüller** (2020) “Molecular characterization of histopathological ependymoma variants” *Acta Neuropathologica* volume 139, pages 305–318
- K P Lehre , L M Levy, O P Ottersen, J Storm-Mathisen, N C Danbolt** (1995) “Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations” *15(3 Pt 1):1835-53.*
- Kamila M. Bond, Joshua D. Hughes, Amanda L. Porter, Josiah Orina, Shanna Fang, Ian F. Parney** (2017) “Adult Pilocytic Astrocytoma: An Institutional Series and Systematic Literature Review for Extent of Resection and Recurrence”,
- Kanai Y, Hediger MA** (2004). “The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects”. *Pflügers Archiv*. 447(5): 469–79.
- Karaca M., Frigerio F., Maechler P.** (2011) “From pancreatic islets to central nervous system, the importance of glutamate dehydrogenase for the control of energy homeostasis” *Neurochemistry International* Volume 59, Issue 4, Pages 510-517

- Kasper B. Hansen, Feng Yi, Riley E. Perszyk, Hiro Furukawa, Lonnie P. Wollmuth, Alasdair J. Gibb, Stephen F. Traynelis.** (2018) “Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors.” *J Gen Physiol.* 150(8): 1081–1105.
- Kenneth Aldape, Gelareh Zadeh, Sheila Mansouri, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling** (2015) “Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers” *Acta Neuropathologica* volume 129, pages 829–848
- Lesley C. Anson, Philip E. Chen, David J. A. Wyllie, David Colquhoun ve Ralf Schoepfer** (1998) “Identification of Amino Acid Residues of the NR2A Subunit That Control Glutamate Potency in Recombinant NR1/NR2A NMDA Receptors” 18(2): 581–589.
- Lightfoot DA** (2009). “Genes for use in improving nitrogen use efficiency in crops.”
- Lightfoot DA, Bernhardt K, Mungur R, Nolte S, Ameziane R, Colter A, Jones K, Iqbal MJ, Varsa E, Young B** (2007). “Improved drought tolerance of transgenic Zea mays plants that express the glutamate dehydrogenase gene (gdhA) of E. coli”.
- M P Murphy** (1999) “Nitric oxide and cell death”;1411(2-3):401-14.
- M Reni** (2003) “Guidelines for the treatment of adult intra-cranial grade II-III ependymal tumours” 13(1):90-8.
- Malin Blomstrand <sup>1</sup>, N Patrik Brodin, Per Munck Af Rosenschöld, Ivan R Vogelius, Gaspar Sánchez Merino, Anne Kiil-Berthlesen, Klas Blomgren, Birgitta Lannering, Søren M Bentzen, Thomas Björk-Eriksson** (2012) “Estimated clinical benefit of protecting neurogenesis in the developing brain during radiation therapy for pediatric medulloblastoma” 14(7):882-9.
- Marcia C Haigis , Raul Mostoslavsky, Kevin M Haigis, Kamau Fahie, Danos C Christodoulou, Andrew J Murphy, David M Valenzuela, George D Yancopoulos, Margaret Karow, Gil Blander, Cynthia Wolberger, Tomas A Prolla, Richard Weindruch, Frederick W Alt, Leonard Guarente** (2006) “SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells” ;126(5):941-54.
- Martin J. Van den Bent, Michele Reni, Gemma Gatta, Charles Vecht** (2008) “Oligodendroglioma” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* Volume 66, Issue 3, Pages 262-272

- Martine F Roussel , Mary E Hatten** (2011) “Cerebellum development and medulloblastoma” 94:235-82.
- Mary Elizabeth Davis.** (2016) “Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment” Clin J Oncol Nurs.; 20(5): S2–S8. doi: 10.1188/16.CJON.S1.2-8.
- Mathias R.A., Greco T.M., Oberstein A., Budayeva H.G., Chakrabarti R., Rowland E.A., Kang Y., Shenk T., Cristea I.M.** (2014) “Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity.”
- Matt McMillen** (2021) “Meningioma” Medically Reviewed by Carmelita Swiner, MD
- McKenna and Ferreira** (2016) “Enzyme complexes important for the glutamate-glutamine cycle” Adv Neurobiol 13:59-98.
- Meldrum BS** (2000). “Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology”
- Michael B. Robinson, Joshua G. Jackson** (2016) “Astroglial Glutamate Transporters Coordinate Excitatory Signaling and Brain Energetics”Neurochem Int. 98: 56–71.
- Michael C., Joseph M.K., Safaee M., Kaur G., Matthew Z.S., Kaur R., Celli A., Theodora M.M., Andrew T.P.** (2012) “Overexpression of Calcium-Permeable Glutamate Receptors in Glioblastoma Derived Brain Tumor Initiating Cells”
- Michael R. Duchen** (2012) “Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease” 464(1): 111–121.
- Michele Reni, Gemma Gatta, Elena Mazza, Charles Vecht** (2007) “Ependymoma”
- Min Z., Gao J. and Yu Y.** (2019) “The Roles of Mitochondrial SIRT4 in Cellular Metabolism”
- Ming Li, Changhong Li, Aron Allen, Charles A. Stanley, and Thomas J. Smith** (2013) “Glutamate Dehydrogenase: Structure, Allosteric Regulation, and Role in Insulin Homeostasis”
- Mungur R, Glass AD, Goodenow DB, Lightfoot DA** (2005). “Metabolite fingerprinting in transgenic *Nicotiana tabacum* altered by the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene”. Journal of Biomedicine & Biotechnology.

- Ni B, Du Y, Wu X, DeHoff BS, Rosteck PR Jr, Paul SM** (1996). “Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter”. *J Neurochem.* 66 (6): 2227–38.
- Nicholas J. Maragakis, Jeffrey D. Rothstein** (2001) “Glutamate Transporters in Neurologic Disease” *Basic Science Seminars in Neurology*
- Noch E. and Khalili K.** (2015) “Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: The role of glutamate excitotoxicity”
- Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI** (1992). “Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter”. *Nature.* 360 (6403): 464–7.
- Q R Smith** (2000) “Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier” *130(4S Suppl):1016S-22S.*
- R Dingledine , K Borges, D Bowie, S F Traynelis** (1999) “The glutamate receptor ion channels” *51(1):7-61.*
- Rao P, Yallapu MM, Sari Y, Fisher PB, Kumar S** (J2015). “Designing Novel Nanoformulations Targeting Glutamate Transporter Excitatory Amino Acid Transporter 2: Implications in Treating Drug Addiction”. *J. Pers. Nanomed.* 1 (1): 3–9.
- Rogawski MA** (2013) “AMPA receptors as a molecular target in epilepsy therapy”. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum.* 127 (197): 9–18.
- Roshan S Prabhu, Christopher D Corso, Matthew C Ward, John H Heinzerling, Reshika Dhakal, Zachary S Buchwald, Kirtesh R Patel, Anthony L Asher, Ashley L Sumrall ve Stuart H Burri** (2019) “The effect of adjuvant radiotherapy on overall survival in adults with intracranial ependymoma” *Neurooncol Pract.* Jul; 7(4): 391–399
- Sakine Atila, Zeynep Ateş Alagöz.** (2010) “NMDA Reseptör Antagonistlerinin Nöropatik Ağrıdaki Rollerini.” *Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06100, Tandoğan, Ankara*
- Sarah-Maria Fendt, Patrik Verstreken.** (2017) “Neurons eat glutamate to stay alive.” *J Cell Biol.;* 216(4): 863–865.

- Shengchao Li , Weiping Zheng**, (2018) “Mammalian Sirtuins SIRT4 and SIRT7” ;154:147-168.
- Shigetada Nakanishi, Yoshiaki Nakajima, Masayuki Masu, Yoshiki Ueda, Kiyoshi Nakahara, Dai Watanabe, Shun Yamaguchi, Shigeki Kawabata, Masamichi Okada.** (1998) “Glutamate receptors: brain function and signal transduction.” Brain Research Reviews Volume 26, Issues 2–3, Pages 230-235.
- Shih J., Liu L., Mason A., Higashimori H., Donmez G.** (2014) “Loss of SIRT4 decreases GLT-1-dependent glutamate uptake and increases sensitivity to kainic acid.”
- Sith Sathornsumetee, Jeremy N. Rich, David A. Reardon** (2007) “Diagnosis and Treatment of High-Grade Astrocytoma”
- Smith CP, Weremowicz S, Kanai Y, Stelzner M, Morton CC, Hediger MA** (1994). “Assignment of the gene coding for the human high-affinity glutamate transporter EAAC1 to 9p24: potential role in dicarboxylic aminoaciduria and neurodegenerative disorders”. Genomics. 20 (2): 335–6.
- Smith H.Q., Li C., Stanley C.A., and Smith T.J** (2019) “Glutamate Dehydrogenase, a Complex Enzyme at a Crucial Metabolic Branch Point”
- Sontheimer H.** (2008) “A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors.” J Neurochem, 105(2), 287-295.
- Stephen B Tatter** (2002) “Recurrent malignant glioma in adults” Curr Treat Options Oncol. 3(6):509-24.
- Stewart SE, Mayerfeld C, Arnold PD, Crane JR, O'Dushlaine C, Fagerness JA, et al.** (2013). “Meta-analysis of association between obsessive-compulsive disorder and the 3' region of neuronal glutamate transporter gene SLC1A1” (PDF). American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics. 162B (4): 367–79.
- Sun H, Huang D, Liu G, Jian F, Zhu J, Zhang L** (2018) “SIRT4 acts as a tumor suppressor in gastric cancer by inhibiting cell proliferation, migration, and invasion” OncoTargets and Therapy 11:3959–3968
- T. Vermeulen B. Görg, T. Vogl, M. Wolf, G. Vargac, A. Toutain, R. Paul, F. Schliess, D. Häussinger, J. Häberle** (2008) “Glutamine synthetase is essential for proliferation of fetal skin fibroblasts” Archives of Biochemistry and Biophysics Volume 478, Issue 1, Pages 96-102.

- Takaaki Miyaji, Noriko Echigo, Miki Hiasa, Shigenori Senoh, Hiroshi Omote, ve Yoshinori Moriyama** (2008) "Identification of a vesicular aspartate transporter" *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; 105(33): 11720–11724.
- Thomas E Merchant, Chia-Ho Hua, Hemant Shukla, Xiaofei Ying, Simeon Nill, Uwe Oelfke** (2008) "Proton versus photon radiotherapy for common pediatric brain tumors: comparison of models of dose characteristics and their relationship to cognitive function" 51(1):110-7.
- Toren Finkel, Chu-Xia Deng, and Raul Mostoslavsky** (2009) "Recent progress in the biology and physiology of sirtuins" *Nature.* 460(7255): 587–591. doi: 10.1038/nature08197.
- Underhill SM, Wheeler DS, Li M, Watts SD, Ingram SL, Amara SG** (2014). "Amphetamine modulates excitatory neurotransmission through endocytosis of the glutamate transporter EAAT3 in dopamine neurons". *Neuron.* 83 (2): 404–416.
- Vahid Rezaei, Amir Rabiee ve Farzaneh Khademi** (2020) "Glioblastoma multiforme: a glance at advanced therapies based on nanotechnology" *Journal of Chemotherapy* Volume 32, 2020 - Issue 3 Pages 107-117
- Vermeulen T., Görg B., Vogl T., Wolf M., Vargac G., Toutain A., Paul R., Schliess F., Häussinger D., Häberle J.** (2008) "Glutamine synthetase is essential for proliferation of fetal skin fibroblasts"
- Vincenzo Carafa, Dante Rotili, Mariantonietta Forgione, Francesca Cuomo, Enrica Serrettiello, Gebremedhin Solomon Hailu, Elina Jarho, Maija Lahtela-Kakkonen, Antonello Mai & Lucia Altucci** (2016) "Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic" *Clinical Epigenetics* volume 8, Article number: 61
- Violetta Barbashina , Paulo Salazar, Eric C Holland, Marc K Rosenblum, Marc Ladanyi** (2005) "Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene" 11(3):1119-28.
- Wang Y, Guo Y, Gao J, Yuan X** (2018) "Tumor-suppressive function of SIRT4 in neuroblastoma through mitochondrial damage" *Cancer Management and Research* 10:5591–5603

- Wendy Xin, Yevgeniya A.Mironova, Hui Shen, Rosa A.M. Marino, Ari Waisman, Wouter H. Lamers, Dwight E. Bergles, Antonello Bonci** (2019) “Oligodendrocytes Support Neuronal Glutamatergic Transmission via Expression of Glutamine Synthetase” *Cell Reports* Volume 27, Issue 8, Pages 2262-2271.
- Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Jr, Sistonen L, Morimoto RI.** (2009) “Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1.” *Science*.323:1063–1066
- Willemieke M. Kouwenhoven, Guillaume Fortin, Anna-Maija Penttinen, Clélia Florence, Benoît Delignat-Lavaud, Marie-Josée Bourque, Thorsten Trimbuch, Milagros Pereira Luppi, Alix Salvail-Lacoste, Pascale Legault, Jean-François Poulin, Christian Rosenmund, Raj Awatramani, ve Louis-Éric Trudeau** (2020) “VGLUT2 Expression in Dopamine Neurons Contributes to Postlesional Striatal Reinnervatio” *J Neurosci.* 40(43): 8262–8275.
- Wirth M., Karaca S., Wenzel D., Ho L., Tishkoff D., Lombard DB, Verdin E, Urlaub H., Jedrusik-Bode M., Fischle W.** (2013) “Mitochondrial SIRT4-type proteins in *Caenorhabditis elegans* and mammals interact with pyruvate carboxylase and other acetylated biotin-dependent carboxylases.”
- Xiao-xia Dong , Yan Wang, Zheng-hong Qin** (2009) “Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases” 30(4):379-87.
- Xiudong Guan, Md Nabiul Hasan, Shelly Maniar, Wang Jia ve Dandan Sun** (2018) “Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme” *Molecular Neurobiology* volume 55, pages 6927–6938
- Yamashita, M. M., Almassy, R. J., Janson, C. A., Cascio, D. and Eisenberg, D.** (1989) “Refined Atomic Model of Glutamine Synthetase at 3.5 Å Resolution”
- Yasushi Shigeri , Rebecca P Seal, Keiko Shimamoto** (2004) “Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs” 45(3):250-65.
- Yasushi Shigeri Rebecca P Seal Keiko Shimamoto** (2004) “Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs” *Brain Research Reviews* Volume 45, Issue Pages 250-265

**Zheyang Min, Jiangman Gao and Yang Yu.** (2019) “The Roles of Mitochondrial SIRT4 in Cellular Metabolism” *Front. Endocrinol.*



## EKLER

### Ek 1. Etik Kurul Karar Formu

Bu tez çalışması, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. (Onay Numarası 2018/1519).

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU					
Sayı: 2018/21	Tarih: 22.11.2018				
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glioblastoma hücre kültürü modellerinde ve primer beyin tümörlerinde SIRT4'un glutamat metabolizması ile ilişkisinin incelenmesi ve potansiyel tümör baskılayıcı özelliğinin araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	2018/1519			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı - AYDIN			
	DESTEKLEYİCİ	TÜBİTAK			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	TÜBİTAK			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Tüm gözlemsel çalışmalar (gözlemsel tıbbi cihaz ve gözlemsel ilaç çalışmaları hariç) <input type="checkbox"/> Anket çalışmaları <input type="checkbox"/> Dosya ve görüntü kayıtları kullanılarak yapılan retrospektif arşiv taramaları ve benzeri gözlemsel çalışmalar <input type="checkbox"/> Kan, idrar, doku, görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene, tetkik, tahil ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle yapılacak çalışmalar <input checked="" type="checkbox"/> Hücre veya doku kültürü çalışmaları <input type="checkbox"/> Gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan ve tanımlamaya yönelik olarak genetik materyalle yapılacak araştırmalar <input type="checkbox"/> Hemşirelik faaliyetlerinin sınıri içerisinde yapılacak araştırmalar <input type="checkbox"/> Gıda katkı maddeleriyle yapılacak diyet çalışmaları <input type="checkbox"/> Egzersiz gibi vücut fizyolojisi ile ilgili araştırmalar <input type="checkbox"/> Antropometrik ölçümlere dayalı yapılan çalışmalar <input type="checkbox"/> Yaşam alışkanlıklarının değerlendirilmesi araştırmaları gibi insana bir hekimin doğrudan müdahalesini gerektirmeyen yapılacak olan tüm araştırmalar <input type="checkbox"/>			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/> - ADÜTF - İzmir Tepecik EAHast.	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>
	DEĞERLENİRLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		-	-	Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>			
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>			
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>			
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>			
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/> 21.11.2018 tarihli dilekçesi				
Sayfa 43					
Adres : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü - Kepez Meykii- AYDIN					
Tel : 256- 225 31 66					
Faks : 256-212 31 69					
Web : <a href="http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/">http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/</a>					
e-posta: <a href="mailto:goetik@adu.edu.tr">goetik@adu.edu.tr</a>					



I.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU



Sayı: 2018/21

Tarih: 22.11.2018

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 22	Tarih: 22.11.2018
	Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN'ın "Glioblastoma hücre kültürü modellerinde ve primer beyin tümörlerinde SIRT4'un glutamat metabolizması ile ilişkisinin incelenmesi ve potansiyel tümör baskılayıcı özelliğinin araştırılması" başlıklı klinik araştırmasının 08.11.2018 tarihli kurul kararında eksiklikler saptanmıştır. 21.11.2018 tarihli gelen dilekçesi ve ekleri görüldü. Sonuçta, klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir. Yine sorumlu araştırmacıya; Form 2'nin 14.1.'in son bölümünde taahhüt edilen çalışma bittikten sonra nihai raporun, [Sonuç Raporu (web'te) ve ORF (Olgu Rapor Formu/Anket)] gönderilmesi gerektiğinin hatırlatılmasına ve sorumlu yürütücülerinin bu hususa özen göstermesi gerektiğinin bir kez daha vurgulanmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.	

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu								
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.M. Selim ÖZKÖK								
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	İmza	
1. Prof.Dr. M.Selim ÖZKÖK /Başkan	Adli Tıp	ADÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
2. Doç.Dr. Tolga ÜNÜVAR /Başkan Yardımcısı	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	ADÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
3. Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR	Parazitoloji	ADÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
4. Doç.Dr.Aylin ERYILMAZ	KBB Hastalıkları	ADÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>		Mazeretli
5. Dr.Öğr. Üyesi Sibel ŞEKER	Ebelik	ADÜ Sağ.Bil.F.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
6. Dr.Öğr. Üyesi Onur YAZICI	Göğüs Hastalıkları	ADÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
7. Dr. Öğr.Üyesi Çağdaş Öykü MEMİŞ	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	ADÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
8. Dr. Öğr.Üyesi Yasemin ÖZKAN	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	ADÜTF	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
9. Dr.Öğr.Üyesi Serkan Fazlı ÇELİK/Raportör	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	ADÜTF	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		

\*Toplantıda bulunma

Sayfa 44

Adres : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN

Tel : 256- 225 31 66

Faks : 256-212 31 69

Web : <http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/>

e-posta: [goetik@adu.edu.tr](mailto:goetik@adu.edu.tr)

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“Glioblastoma Primer Beyin Tümörlerinde SIRT4’ün Glutamat Metabolizması İle İlişkisinin İncelenmesi ve Potansiyel Tümör Baskılayıcı Özelliğinin Araştırılması” başlıklı Yüksek Lisans tezimdeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Ayşenur AKKULAK

... / ... /2022

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : AKKULAK Ayşenur  
**Uyruk.** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : Aydın / 05.11.1997  
**Telefon** : 0 534 854 84 02  
**E-posta** : aysenurakkulak97@gmail.com  
**Yabancı dil** : İngilizce

## EĞİTİM

### BURSLAR

“SIRT4 ve Calreticulin'in Glia Hücrelerinde ER Stresi Sırasında Etkileşimi” adlı ve 120S698 numaralı TÜBİTAK projesi için bursiyer olundu.

“Kainik Asite Bağlı Hücrel Eksitotoksisite Modelinde HSF1(Heat Shock Factor 1) Ribonükleoprotein Kompleksinin Aktivasyonunun Araştırılması” adlı ve 220S739 numaralı TÜBİTAK projesi için bursiyer olundu.

### İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2021	Atlas CRO	Saha Görevlisi

### YAYINLAR

#### 1. MAKALELER

**Düriye Nur Dağdelen, Ayşenur Akkulak, Gizem Dönmez Yalçın** (18 May 2021) “The invesigation of glutamate transporter 1 (GLT-1) degradation pathway in glioblastoma cells” *Moleculer Biology Reports* (2021) 48:3495-3502

**Ayşenur Akkulak, Düriye Nur Dağdelen, Abdullah Yalçın, Esin Oktay, Gülden Diniz, Dudu Solakoğlu Kahraman, Mehmet Şenoğlu, Gizem Dönmez Yalçın** (13 November 2021) “The expression of glutamate metabolism modulators in the intracranial tumors and glioblastoma cell line” *Molecular Biology Reports* (2022) 49:1077–1083

**Ayşenur Akkulak, Gizem Dönmez Yalçın** (20 December 2021) “The interaction of SIRT4 and Calreticulin during ER stress in glia cells” *Gene* 814 (2022) 146135

## **2. PROJELER**

“SIRT4 ve Calreticulin'in Glia Hücrelerinde ER Stresi Sırasında Etkileşimi” – TÜBİTAK 1002 PROJESİ

“Kainik Asite Bağlı Hücrel Eksitotoksisite Modelinde HSF1(Heat Shock Factor 1) Ribonükleoprotein Kompleksinin Aktivasyonunun Araştırılması” – TÜBİTAK 1001 PROJESİ

## **3. BİLDİRİLER**

### **A) Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler**

"Kainik Asite Bağlı Hücrel Eksitotoksisite Modelinde HSF1 (Heat Shock Factor 1) Ribonükleoprotein Kompleksinin Aktivasyonunun Araştırılması - The investigation of the activation of HSF1 (Heat Shock Factor 1) ribonucleoprotein complex in kainic acid-induced cellular excitotoxicity model" - 17. Uluslararası Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Sözlü Sunum