

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BETA GALAKTOZİD ALFA-2,6-SİYALİLTRANSFERAZ
(ST6Gal1)'İN SPORADİK İNKLÜZYON CİSİMCİK
MİYÖZİTİ (sIBM) PATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN
İN VİTRO MODEL OLUŞTURULARAK ARAŞTIRILMASI

Uzm. Burcu BALCI

Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2008

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BETA GALAKTOZİD ALFA-2,6-SİYALİLTRANSFERAZ
(ST6Gal1)'İN SPORADİK İNKLÜZYON CİSİMCİK
MİYOZİTİ (sIBM) PATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN
İN VİTRO MODEL OLUŞTURULARAK ARAŞTIRILMASI

Uzm. Burcu BALCI

Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Pervin DİNÇER

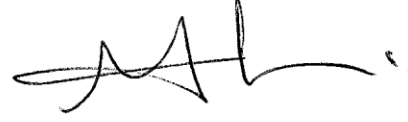
ANKARA

2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Şükriye Ayter
Hacettepe Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. Pervin Dinçer
Hacettepe Üniversitesi



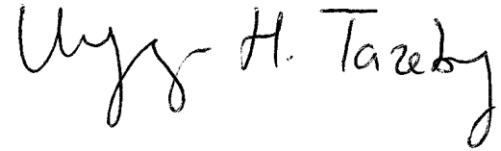
Üye: Prof. Dr. Meral Özgüç
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Sevim Erdem Özdamar
Hacettepe Üniversitesi

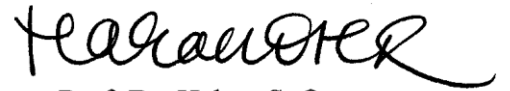


Üye: Yrd. Doç. Dr. Uygur Tazebay
Bilkent Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŐEKKÖR

Doktora eğitim süresince ve tez çalıőmamda bana her konuda destek olan, bilgisini ve değerli katkısını esirgemeyen danıőmanım Sayın Prof. Dr. Pervin Dinçer'e, tez çalıőmasının her aşamasında yol gősterici katkılarda bulunan tez izleme komitesindeki hocalarım Sayın Prof. Dr. Meral Özgüç ve Yrd. Doç. Dr. Uygur Tazebay'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapan tüm hocalarıma, arkadaşlarıma ve tez çalıőmalarım süresince sonsuz sevgi, anlayıő ve sabırla bana destek olan aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: 03.02.101.029) ve TÜBİTAK (Proje no: SBAG-3722, 107S228) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Balci, B. Beta galaktozid alfa-2,6-siyaliltransferaz (ST6Gal1)'ın Sporadik İnküzyon Cisimcik Miyoziti (sIBM) patogeneziindeki rolünün in vitro model oluşturularak araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2008. sIBM, 50 yaş ve üzerindeki bireylerde en sık karşılaşılan dejeneratif kas hastalığı olup, şu ana kadar nedenleri ve başarılı bir tedavi yaklaşımı bulunamamıştır. Kalıtsal formu olan hIBM ise, siyalik asit biyosentezinin ilk iki aşamasında görevli GNE enzimini kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır. Hem hIBM hem de sIBM'de dejenerasyon yolağını başlatan mekanizmalar aydınlatılamamış olsa da, anahtar patojenik rolü A β birikiminin oynadığı düşünülmektedir. Toksik A β , APP'nin sırasıyla β ve γ sekretazlar tarafından kesilmesi sonucunda oluşur. BACE1, β sekretaz olup APP'nin ilk kesim enzimidir. BACE1'in temel substratı ST6Gal1'dir. ST6Gal1 enzimleri, BACE1 enzimi tarafından proteolitik kesime uğrayarak katalitik bölgeleri ile birlikte çözünür formda vücut sıvılarına salgılanırlar. Salgılanan ST6Gal1'in hücre dışına salgılanan çözünür glikoproteinlere α -2,6 siyalik asit birimleri eklediği düşünülmektedir. IBM hastalığının her iki formunda da ST6Gal1 enziminin ifade düzeyi ve hücre dışına salgılanma seviyesi ile ilgili bir çalışma şu ana kadar yapılmamıştır. GNE genindeki mutasyonlara bağlı olarak siyalik asit biyosenteziindeki bozuklukların hIBM hastalığının patogeneziini oluşturduğu bilinmektedir. Ancak, sIBM'de siyalik asit biyosentezi doğru şekilde gerçekleştiğinden, ST6Gal1'in IBM patolojik yolağının herhangi bir noktasında işlevi olup olmadığı araştırılmamıştır. Tez çalışmamız kapsamında, sIBM hücre kültür modelinin oluşturulması ve bu modeli kullanarak ST6Gal1 enziminin sIBM patogeneziindeki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, C2C12 hücrelerinde APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlanarak sIBM hücre kültür modeli oluşturulmuştur. Transfekte edilmiş C2C12 hücrelerindeki ve hücre kültür ortamındaki proteinler izole edildikten sonra *Western Blot* analizine alınarak, ST6Gal1 enziminin hücre içi ve salgılanan formları kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Çalışmamız sonucunda APP'nin yüksek düzeyde ifadesinin sağlandığı C2C12 hücrelerinde, ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun ifade düzeyinin ve ST6Gal1 salgılanma seviyesinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: sIBM, A β , APP, ST6Gal1, hücre kültür modeli.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: 03.02.101.029) ve TÜBİTAK (Proje no: SBAG-3722, 107S228) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Balcı B. Identification of the role of beta galactoside alpha-2,6-sialyltransferase (ST6Gal1) in the pathogenesis of Sporadic Inclusion Body Myositis (s-IBM) by the use of an in-vitro culture model. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2008. Sporadic inclusion body myositis (s-IBM), the most common muscle disease of persons aged 50 years and older is of unknown cause and unconfirmed pathogenesis. No consistently successful treatment is available. Hereditary form of sIBM that is called h-IBM, results from mutations in the GNE gene which encodes a bifunctional enzyme that catalyses the first two steps committed toward sialic acid biosynthesis. Accumulation of A β plays a key pathogenic role in the development of both the sporadic and hereditary forms of this disease. Toxic A β is formed after sequential cleavage of the APP by β -secretases and γ -secretases. BACE1 is the major β -secretase for generation of toxic A β peptides. It has been implicated in the proteolytic processing of another physiological substrate other than APP, which is ST6Gal1. ST6Gal1 is secreted with its catalytic domain after proteolytic cleavage by BACE1. The biological significance and function of soluble ST6Gal1 in body fluid has been a mystery for many years. It has been suggested that cleavage and secretion of ST6Gal1 enhances the α -2,6 sialylation of soluble glycoprotein substrates. In both forms of IBM, the expression and secretion level of ST6Gal1 enzyme are not known. Loss of GNE activity in h-IBM is thought to impair sialic acid production and interfere with proper sialylation of glycoconjugates. But it remained unclear if ST6Gal1 enzyme affects sIBM pathogenesis since sialic acid biosynthesis is unaffected in s-IBM. In this study, our aim was to establish a cell culture model of s-IBM for investigation of the role of ST6Gal1 in the pathogenesis of s-IBM. For this purpose, we developed a cell culture model of s-IBM induced by overexpression of APP in C2C12 mouse myogenic cell line. We then analyzed the effect of overexpression of APP on expression and secretion of ST6Gal1. Control and transfected cell culture lysate and culture media were collected and the protein samples were subjected to Western Blot analysis. The results of our study shows that, APP overexpression in C2C12 cells increases the expression and the secretion of ST6Gal1 enzyme.

Key Words: sIBM, A β , APP, ST6Gal1, cell culture model.

Supported by Hacettepe University Research Fund (Project no: 03.02.101.029) and TÜBİTAK (Project no: SBAG-3722, 107S228).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar	1
1.2. Amaç ve Varsayımlar	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. sIBM	3
2.2. sIBM Hastalığının Histolojik ve Patolojik Özellikleri	3
2.3. sIBM Hastalığı ve Nedenleri	5
2.4. hIBM	6
2.5. IBM ve Toksik A β Birikimi	6
2.6. ST6Gal1 ve Önemi	9
2.7. ST6Gal1 ve sIBM Patolojik Yolağındaki Olası İşlevi	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	14
3.1.A. Hücre Kültürü	14
3.1.B. Rekombinant Gen İfade Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması	14
3.1.C. Transfeksiyon	15
3.1.D. İmmünfloresan Boyama	15
3.1.E. Kongo Kırmızısı Boyaması	16
3.1.F. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	16
3.1.G. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	17
3.1.H. <i>Western Blot</i> Analizi	17
3.2. Yöntemler	18
3.2.A. C2C12 Hücre Hattı	19

3.2.B. 751-APP cDNA'sını İçeren Rekombinant Gen İfade Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması	20
3.2.B.1. Tek Koloni Ekimi	21
3.2.B.2. Transforme Hücrelerin Çoğaltılması	21
3.2.B.3. <i>Mini-Prep</i> Plazmid Saflaştırması	21
3.2.B.4. 751-APP cDNA Dizisinin Kontrolü	22
3.2.C. 751-APP/pCMV-SPORT6 Gen İfade Vektörünün C2C12 Hücrelerine Transfeksiyonu	23
3.2.D. Transfeksiyon Sonrası Canlılık Oranının Tespit Edilmesi	24
3.2.D.1. <i>Propidium Iodide</i> Boyaması	24
3.2.D.2. DAPI Boyaması	25
3.2.E. Hücre Kültürü Ortamında sIBM Patolojisinin Saptanması	25
3.2.E.1. İmmünfloresan Boyama	25
3.2.E.2. Kongo Kırmızısı Boyaması	27
3.2.F. hST6Gal1 Antikorumun Fare ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi Formunu Tanıyıp Tanımadığının Test Edilmesi	28
3.2.F.1. Dokudan protein izolasyonu	28
3.2.F.2. <i>Western Blot</i> Analizi (Bkz. 3.2.H.4 ve 3.2.H.5)	28
3.2.G. hST6Gal1 Antikorumun Fare ST6Gal1 Enziminin Salgılanan Formunu Tanıyıp Tanımadığının Test Edilmesi	29
3.2.G.1. Fare Plazmasından Protein İzolasyonu	29
3.2.G.2. Plazma Protein Örneklerinden Albuminin Uzaklaştırılması	30
3.2.G.3. Aseton ile Plazma Protein Örneklerinin Çöktürülmesi	30
3.2.G.4. <i>Western Blot</i> Analizi (Bkz. 3.2.H.4 ve 3.2.H.5)	31
3.2.H. sIBM Hücre Kültür Modelinde ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi ve Salgılanan Formunun Analizi	31
3.2.H.1. C2C12 Hücrelerinden Protein İzolasyonu	31
3.2.H.2. Hücre Kültür Ortamından Protein İzolasyonu	31
3.2.H.3. Protein Konsantrasyonlarının Hesaplanması	32
3.2.H.4. SDS-PAGE	32
3.2.H.5. <i>Western Blot</i> Yöntemi	33
3.2.H.6. ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi ve Salgılanan Formunun Densitometrik Analizi	34

3.2.I. sIBM Hücre Kültür Modelinde GOLPH4 Golgi Belirteç Proteininin İmmünfloresan Boyama ile Analiz Edilmesi	34
4. BULGULAR	35
4.1. C2C12 fare miyoblast hücreleri için uygun transfeksiyon koşullarının bulunması ve transfeksiyon etkinliğinin saptanması	35
4.2. sIBM Hücre Kültür Modelinin Oluşturulması	36
4.3. Transfeksiyon Sonrası Canlılık Oranının Tespit Edilmesi	36
4.4. Hücre Kültür Modelinde sIBM Patolojisinin Gösterilmesi	36
4.4.A. İmmünfloresan Boyama ile APP ve A β ₄₀ / A β ₄₂ Peptidlerinin Birikiminin Gösterilmesi	36
4.4.B. Kongo Kırmızısı Boyaması ile Amiloid Birikiminin Gösterilmesi	40
4.5. hST6Gal1 Antikorumun Fare ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi ve Salgılanan Formunu Tanıyıp Tanımadığının Analizi	41
4.6. ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi Formunun Analizi	43
4.6.A. <i>Western Blot</i>	43
4.6.B. İmmünfloresan Boyama	44
4.7. ST6Gal1 Enziminin Salgılanan Formunun Analizi	46
4.8. GOLPH4 Golgi Belirteç Proteininin Analizi	47
5. TARTIŞMA	49
SONUÇ ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

sIBM	Sporadik İnküzyon Cisimcik Miyoziti
A β	Amiloid β
APP	<i>Amyloid beta A4 protein precursor</i>
APS	Amonyum Per Sülfat
BACE1	<i>Beta-site APP cleaving enzyme 1</i>
BACE2	<i>Beta-site APP cleaving enzyme 2</i>
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CMP-NeuNAC	<i>Cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ER	Endoplazmik Retikulum
GNE	UDP-N-asetilglukozamin-2-epimeraz/N-asetilmannozamin kinaz
hIBM	Kalıtsal İnküzyon Cisimcik Miyopatisi
HRP	<i>Horseradish</i> Peroksidaz
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
NMB	Nöromusküler Bileşke
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PHF	<i>Paired Helical Filament</i>
ST6Gal1	Beta galaktozidaz alfa-2,6-siyaliltransferaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. sIBM iskelet kas biyopsisinin karakteristik histolojik özellikleri	4
2.2. APP öncül peptidinin endoproteolitik olarak kesimi	8
2.3. ST6Gal1 enziminin topolojisi	10
2.4. BACE1 enzimi ve substratlarının hücre içerisindeki yerleşimleri	11
3.1. 751-APP/pCMV-SPORT6 vektör kaseti	20
4.1. C2C12 hücrelerinin transfeksiyon etkinliği	35
4.2. Transfeksiyon sonrasında $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ ve APP peptidlerine özgül antikorlar ile boyanmış olan füzyona girmiş miyoblastların floresan mikroskobu görüntüleri	38
4.3. Transfeksiyon sonrasında $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ ve APP peptidlerine özgül antikorlar ile boyanmış olan çok çekirdekli miyotüplerin floresan mikroskobu görüntüleri	39
4.4. Amiloid birikimi gösteren C2C12 hücrelerinin Kongo Kırmızısı boyaması sonrasındaki görüntüleri	40
4.5. Fare ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun <i>Western Blot</i> analizi	42
4.6. Farklı konsantrasyonlardaki fare plazma proteinlerinin <i>Western Blot</i> analizi	42
4.7. s IBM hücre kültür modelinde ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun <i>Western Blot</i> analizi	43
4.8. ST6Gal1 ve APP peptidlerine özgül antikorlar ile boyanan kontrol C2C12 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüleri	44
4.9. ST6Gal1 ve APP peptidlerine özgül antikorlar ile boyanan 751-APP transfekte edilmiş C2C12 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüleri	45
4.10. sIBM hücre kültür modelinde ST6Gal11 enziminin salgılanan formunun <i>Western Blot</i> analizi	47
4.11. 751-APP transfekte C2C12 hücrelerinin GOLPH4 ve $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ peptidlerine özgül antikorlar ile boyanması sonrasında floresan mikroskobu görüntüleri	48

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar

Sporadik İnküzyon Cisimcik Miyoziti (sIBM) ilerleyen yaşa bağlı olarak ortaya çıkan ve 50 yaş ve üzerindeki bireylerde en sık karşılaşılan dejeneratif kas hastalığıdır (9,13). Günümüze kadar sIBM hastalığının moleküler temelleri tam olarak açıklığa kavuşturulamadığından hastalık için başarılı bir tedavi yaklaşımı da bulunamamıştır (47).

sIBM'in kalıtsal formu olan Kalıtsal İnküzyon Cisimcik Miyopatisi (hIBM)'nin patolojik özellikleri sIBM ile benzer olmasına karşılık, hIBM'de hastalığın klinik bulguları daha erken yaşlarda (20-30 yaş) ortaya çıkmaktadır (12). Günümüze kadar hIBM'den sorumlu olduğu gösterilen tek gen, 9p12-13 kromozom bölgesinde bulunan ve "UDP-N-asetilglukozamin-2-epimeraz/N-asetilmannozamin kinaz" (GNE) enzimini kodlayan GNE genidir (26). GNE enzimi siyalik asit sentezinin ilk iki aşamasında görevlidir (37). GNE geninde görülen mutasyonlar sonucu, hIBM hastalığında siyalik asit biyosentezinin azalmış olduğu bilinmektedir (26). sIBM hastalığında ise siyalik asit biyolojisindeki herhangi bir değişikliğin patolojik tablonun oluşum basamaklarında rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

IBM kas dejenerasyonundaki temel mekanizmalar aydınlatılmamış olsa da, hastalığın oluşumundaki anahtar patojenik rolü toksik Amiloid β ($A\beta$) birikiminin ve bu birikimden sorumlu olan *Amyloid beta A4 protein precursor* (APP)'nin oynadığı düşünülmektedir (6,55). Toksik $A\beta$, APP'nin sırasıyla β ve γ sekretazlar tarafından kesilmesi sonucunda oluşur. APP'nin ilk kesim enzimi olan β sekretaz, *Beta-site APP cleaving enzyme 1* (BACE1)'dir (45,46,77). APP'nin olmadığı nekrotik sIBM kas liflerinde BACE1 ifade düzeyinin yüksek olduğunun saptanması bu enzimin APP dışında farklı substratları olabileceğini ortaya koymuştur (25). Yapılan araştırmalar, BACE1'in Golgi'de yerleşik bir glikoziltransferaz olan beta galaktozidaz alfa-2,6-siyaliltransferaz (ST6Gal1)'in proteolitik kesiminden sorumlu olduğunu göstermiştir (41). BACE1 enzimi tarafından proteolitik kesime uğrayan ST6Gal1 enzimleri,

çözünür formda vücut sıvılarına salgılanırlar (57,58). Salgılanan ST6Gal1'in çözünür glikoproteinlerin α -2,6 siyalasyonundan sorumlu olduğu bilinmektedir. IBM hastalığının her iki formunda da ST6Gal1 enziminin ifade düzeyi ve ST6Gal1 enziminin hücre dışına salgılanma seviyesi ile ilgili bir çalışma şu ana kadar yapılmamıştır.

1.2. Amaç ve Varsayımlar

GNE geninde görülen mutasyonlar sonucu, hIBM hastalığında siyalik asit biyosentezinin azalmış olduğu bilinmesine karşılık (26), sIBM hastalığında siyalik asit biyolojisindeki herhangi bir değişikliğin patolojik tablonun oluşum basamaklarında rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

Tez çalışması kapsamında Amiloid β plaklarının oluşumu ile karakterize dejeneratif bir kas hastalığı olan sIBM'in hücre kültür modelinin oluşturulması ve bu modeli kullanarak glikoproteinlere α -2,6 bağı ile siyalik asit birimlerinin eklenmesinden sorumlu ST6Gal1 enziminin sIBM patogenezindeki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, sIBM hücre kültür modelinde ST6Gal1 enziminin ifade düzeyi ve buna bağlı olarak ST6Gal1'in hücre dışına salgılanma seviyesinin değişip değişmediği araştırılmıştır.

Tez çalışması kapsamında geliştirmiş olduğumuz sIBM hücre kültür modeli; hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda kullanılabilecek bir model olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. sIBM

sIBM, klinik belirtileri yaşla beraber ilerleyen, yüksek derecede kas güçsüzlüğünün ortaya çıkmasıyla karakterize, ileri dönemde kas atrofisi ve nekrozun saptandığı, ileri yaştaki bireylerde en sık karşılaşılan dejeneratif kas hastalığıdır (9,13,80). sIBM hastalığının insidansı yaşa bağlı olarak artış göstermekte ve hastalık bulguları genellikle 50 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Prevelansı 4-9/1.000.000 olan sIBM için bu oran, 50 yaş üzerindeki bireylerde 35/1.000.000 olarak saptanmıştır (72).

Klinik bulgularına bakıldığında, kuadriseps kasları, bilekler ve parmak fleksörleri başta olmak üzere asimetrik proksimal ve distal kas güçsüzlüğü hastalığın tipik özelliğidir. Ön kolda gözlenen atrofi karakteristik bir özellik olmakla beraber parmak ve bileklerde gözlenen güçsüzlük tablosu da bu bulgularla birlikte gözlenmektedir. Hastaların serum kreatin kinaz (CPK) düzeyleri normal veya minimal düzeyde yükselmiş olarak gözlenir. Hastalık farklı yaş gruplarındaki bireylerde gözlenirse de, semptomlar genellikle 50 yaşından sonra başlar ve 5-10 yıl içerisinde bireylerin normal yaşam aktivitelerini etkileyecek düzeye gelir (5,10,64).

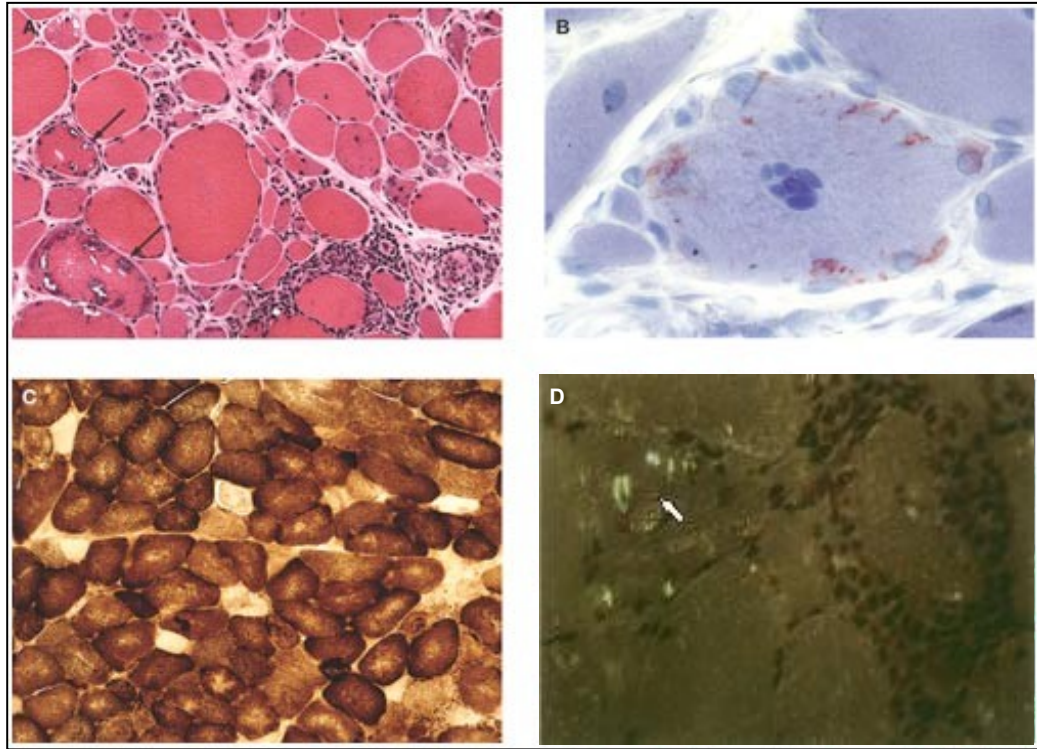
2.2. sIBM Hastalığının Histolojik ve Patolojik Özellikleri

sIBM hastalığının histopatolojik fenotipinde karakteristik olarak, bazofilik granüllü vakuoller, erken dönemde en fazla olacak şekilde farklı derecelerde CD8+ sitotoksik T hücreleri infiltrasyonu, A β plakları ve yüksek düzeyde fosforillenmiş Tau içeren *Paired Helical Filament* (PHF) kümeleri şeklinde iki tip inklüzyon gözlenmektedir (8-10).

sIBM kas biyopsisi ışık mikroskobu altında incelendiğinde farklı derecelerde lenfositik mononükleer hücre infiltrasyonu, kırmızı ve yeşil boyanmış vakuoller, *ragged-red* lifler, sitokrom c oksidaz içermeyen kas lifleri ve atrofik lifler en belirgin özellikler olarak gözlenmektedir (8,23) (Şekil 2.1). Kongo kırmızısı, *thioflavine S*

veya kristal viyole ile boyanma sonucunda ise vakuol içeren kas liflerinin %60-80'lik kısmının çözünmeyen fibril yapısındaki protein birikimleri olan amiloid yapılarını içerdiği saptanmaktadır. Vakuoller çok küçük ve sınırlı sayıdaki kas lifinde gözlemlendiğinden sIBM iskelet kas biyopsilerinde amiloid birikimi gözlemek her zaman mümkün değildir (48).

sIBM hastalığının tanısı, karakteristik klinik bulgulara eşlik eden nekrotik olmayan kas lifi infiltrasyonu ve kas biyopsisinde vakuollerin, Kongo kırmızısı, *thioflavine S* veya kristal viyole ile boyanma sonucunda amiloid birikimlerinin ya da elektron mikroskopunda tübülofilamentöz yapıların gösterilmesi esasına dayanır (23).



Şekil 2.1. sIBM iskelet kas biyopsisinin karakteristik histolojik özellikleri. **A)** Hematoksilen-eozin boyaması ile sağlıklı kas lifleri etrafında gözlenen inflamasyon odakları ve vakuoller içeren kas lifleri, **B)** kristal viyole boyaması sonucunda hücre içerisinde kırmızı renkte gözlenen amiloid birikimi, **C)** sitokrom c oksidaz ile boyama vermeyen kas lifleri, **D)** Kongo kırmızısı boyaması ile çift kırınımlı polarize ışık altında yeşil renk veren amiloid birikimleri (23).

sIBM hastalığının özgül özelliklerinden biri de toksik A β başta olmak üzere Alzheimer hasta beyninde karakteristik olan proteinlerin (APP ve farklı epitopları, yüksek düzeyde fosforillenmiş tau, α 1-antikimotripsin, apolipoprotein E, ubikütin, presenilin-1, hücrel prion proteini, vb.) inklüzyonlar içerisindeki birikimidir (8-10). Normal bir kas lifi gelişiminde yalnızca Nöromusküler Bileşke (NMB) bölgesindeki çekirdeklerde aktif olan genler, IBM kas lifleri boyunca bütün çekirdeklerde aktif haldedir. Bu nedenle, normalde NMB bölgesinde işlev gören özgül proteinler (Tau hariç), IBM hastalığında hücre içinde birikir (7).

2.3. sIBM Hastalığı ve Nedenleri

Erkeklerde kadınlara göre daha sık rastlanan sIBM kas hastalığının etiyolojisi ve patogenezi bilinmemekte fakat çok etmenli bir hastalık olan sIBM'in oluşumunda birçok gen ve çevresel faktörün (oksidatif stres, yaşlanmış hücrel ortam, virüsler, vb.) etkisinin olduğu düşünülmektedir (13).

sIBM hastalığının nedenine yönelik olarak iki farklı hipotez söz konusudur. Bunlardan ilki; bilinmeyen bir nedenle meydana gelmiş olan inflamasyonun hastalık tablosunun ortaya çıkma nedeni olup, kas lifi dejenerasyonu ve protein birikimlerinin inflamasyonun sonucu olduğu yönündedir (23). Kronik kas inflamasyonu tablosunda gözlenen T hücre cevabı sIBM hastalığını otoimmün hastalıklar grubuna dahil etse de diğer inflamatuvar miyopatilerden (Polimiyozit, Dermatomyozit, vb.) farklı olarak bu hastalık için etkin bir tedavi yaklaşımı şu ana kadar geliştirilememiştir. Bazı bireylerde kısa dönemde semptomlarda geriye dönüş gözlenmekle beraber, sIBM hastalığı için immün sistemi baskılayıcı ajanlarla (kortikosteroidler, metotreksat, azatiopürin, siklosporin, siklofosamid, vb.) uzun süreli bir tedavi söz konusu değildir (9,47). Bu nedenle araştırmacıların büyük bir kısmı sIBM hastalığını inflamatuvar miyopatiler grubuna dahil etmemektedir.

Hastalığın başlangıç yolağı bilinmese de ikinci ve en çok kabul gören hipotez ise; sIBM'in hücrel yaşlanmanın görüldüğü kas liflerinde meydana gelen dejeneratif bir hastalık olduğu ve hücrelerde gözlenen patojenik protein

birikimlerinin, proteozom inhibisyonunun ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin hastalığın ve inflamasyon tablosunun ortaya çıkış nedeni olduğu yönündedir (15).

sIBM hastalığında diğer kas hastalıklarından farklı olarak gözlenen klinik, histopatolojik ve immünolojik özellikler, son yıllarda bu hastalığın moleküler temellerini aydınlatma çalışmalarını hızlandırmıştır.

2.4. hIBM

sIBM'in kalıtsal formu olan hIBM, 1993 yılında tanımlanmıştır (1). hIBM hastalığının çoğu patolojik özelliği sIBM ile benzer olmasına karşılık, hIBM'de hastalığın klinik bulguları daha erken yaşlarda (20-30 yaş) ortaya çıkmakta ve bu hastaların iskelet kaslarında lenfositik inflamasyon gözlenmemektedir (12). Histopatolojik özelliklerine göre farklı alt gruplara ayrılabilen hIBM, otozomal resesif veya otozomal dominant olarak kalıtılmaktadır (5). Günümüze kadar hIBM'den sorumlu olduğu gösterilen tek gen, 9p12-13 kromozom bölgesinde bulunan ve GNE enzimini kodlayan GNE genidir (26). İki işlevli (kinaz ve epimeraz aktivitesi) bir enzim olan GNE, siyalik asit sentezinin ilk iki aşamasında görevlidir. GNE genindeki mutasyonlar sonucunda enzimin etkinliğinin azalması, siyalik asitin yeterli miktarda oluşamamasına ve glikokonjugatlarının çoğuna siyalik asit takılamamasına neden olur (37). Ancak, hIBM hastalarında GNE enziminin etkinliğinin azalmasının hastalığın patogenezinine ne şekilde etki ettiği bilinmemektedir (26).

2.5. IBM ve Toksik A β Birikimi

IBM hastalığının kalıtsal ve sporadik formlarının ortaya çıkmasında rol oynayan mekanizmalar ve rol alan proteinler tam olarak aydınlatılamamakla beraber her iki hastalıktaki farklı nedenlerin ortak bir patolojik yolağa neden olduğu ve bu yolağın vakuoler kas lifi dejenerasyonu ile sonuçlandığı bilinmektedir. Temel mekanizmalar aydınlatılamamış olsa da, her iki hastalıkta da anahtar patojenik rolü toksik A β birikiminin ve bu birikimden sorumlu olan APP'nin oynadığı

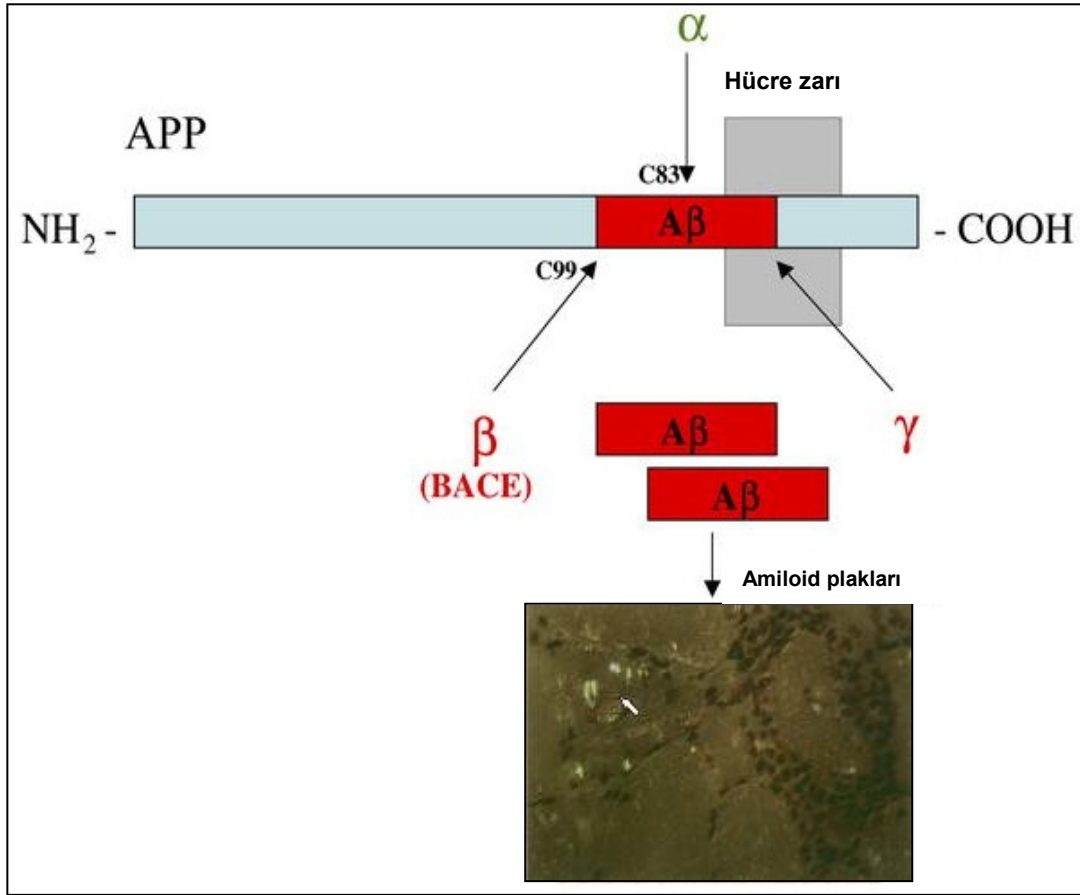
düşünülmektedir (6,55). Yapılan çalışmalarla, adenovirüsler aracılığıyla hücre kültür ortamındaki kas liflerine APP gen transferi yapıldığında IBM tipi patolojik birikimlerin ve vakuollerin oluşumu gözlenmiş, ayrıca yüksek düzeyde APP ifadesi görülen erişkin transgenik fare modelinde IBM fenotipinin ortaya çıktığı saptanmıştır (3,68).

IBM, merkezi sinir sistemi dışında APP'nin kesim ürünü olan A β peptidinin patolojik birikiminin gözlendiği tek hastalıktır (48). APP, tip I zar proteinidir ve 21. kromozomdaki APP geninden sentezlenmektedir. *Alternatif splicing* ile APP mRNA'sından 670-770 amino asit içeren sekiz izoform oluşmaktadır. Kas liflerinde A β , 751 aminoasit içeren, *trans* Golgi ve endozomda yerleşik olan APP'nin endoproteolitik kesimi sonucunda oluşur (76).

Yeni sentezlenen APP bir siyaloproteindir ve translasyon sonrası değişiklikler için ER ve Golgi'ye gider. Bu aşamadan sonra APP, plazma zarına yerleşir ve burada α ve γ sekretazlar ile endoproteolitik kesime uğrar. Kesim sonrasında elde edilen ürünler toksik olmayan sAPP α ve CT₈₃ parçacıklarıdır. APP'nin fizyolojik işlevi tam olarak aydınlatılamamakla beraber, akson gelişimi, sinaptik oluşum, sinyal iletimi, kas gelişimi, NMB oluşumu, hücre adhezyonu, hücreler arası iletişim ve nöron hasarına yönelik tamirde çeşitli işlevleri olduğu düşünülmektedir (19,38,56,60). Ayrıca yapılan bir çalışmada plazma zarında APP'nin α ve γ sekretazlar ile kesilmesinden sonra ortaya çıkan sAPP α 'nın in vitro koşullarda nöral kök hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir (17).

APP üç proteolitik enzim tarafından kesilmektedir. Bu enzimler α , β ve γ sekretaz enzimleridir. Sağlıklı hücrelerde APP, sırasıyla α ve γ sekretazlar tarafından amino (NH₂) ve karboksil (COOH) uçlarından işleme yolunu seçerken (45), AD ve IBM'de ilk kesim β sekretazlar (BACE1/BACE2) tarafından gerçekleşir (46,76) (Şekil 2.2.). BACE1 ve BACE2 aspartil proteaz ailesine dahil glikozillenmiş transmembran proteinleri olup Golgi ve endozomda yerleşiktirler. BACE1 enzimi, toksik A β parçacıklarının temel üreticisidir (76). APP'nin BACE1 enzimi tarafından kesime uğraması sonucunda CT₉₉ adı verilen parçacık ve takiben γ sekretaz enzimi

ile gerçekleşen kesimi sonucunda $A\beta_{40}$ ya da $A\beta_{42}$ ürünleri oluşmaktadır. Oluşan $A\beta_{42}$ ürünü $A\beta_{40}$ ürününe oranla daha hidrofobiktir ve fibril oluşumuna daha eğilimlidir (39). Ayrıca yapılan araştırmalarda Alzheimer hastalığına yol açan β ve γ sekretazların kesim bölgelerine yakın bölgelerde yerleşim gösteren APP mutasyonlarının da $A\beta_{42}$ ürününün oluşumunu, β sekretaz kesim bölgesine yakın mutasyonların ise hem $A\beta_{40}$ hem de $A\beta_{42}$ üretimini arttırdığı gösterilmiştir (18,20).



Şekil 2.2. APP öncül peptidinin endoproteolitik olarak kesimi (45,46).

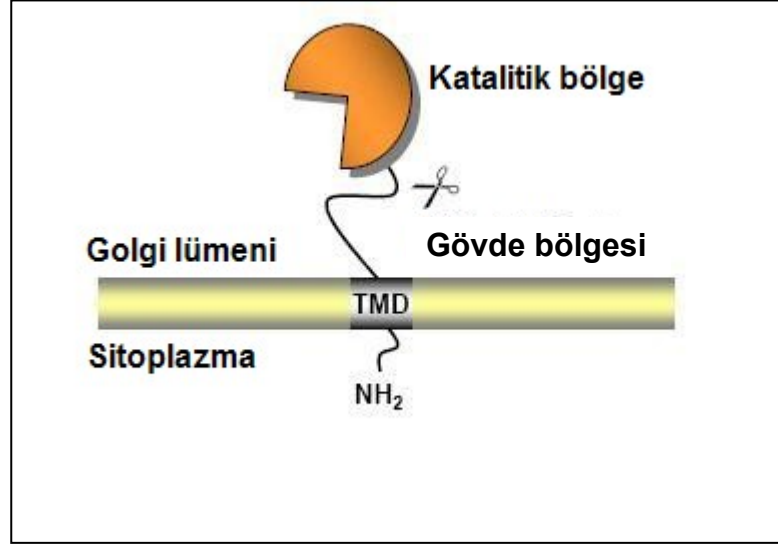
2.6. ST6Gal1 ve Önemi

BACE1 normal kas liflerinde düşük seviyede ifade edilirken, IBM hastalığında gen ifadesinin arttığı saptanmış ve yapılan çalışmalarda hücre içinde A β ve APP ile beraber yerleşim gösterdiği tespit edilmiştir. BACE1, toksik A β 'nın oluşumunda kritik rol oynayan ilk kesim enzimi olduğundan, bu proteazın inhibisyonuna neden olan faktörlerin saptanması ve geliştirilmesi Alzheimer ve IBM hastalıkları için popüler tedavi yaklaşımları haline gelmiştir (77).

1995 yılında De Strooper ve grubunun yapmış olduğu çalışma sonucunda, APP'nin olmadığı nekrotik sIBM kas liflerinde BACE1 ifade düzeyinin yüksek olduğu saptanmış ve bu enzimin APP dışında farklı substratları olduğu düşüncesi doğmuştur (25). 2001 yılında ise BACE1 enziminin Golgi'de yerleşik olarak bulunan bir glikoziltransferaz olan ve tip II zar proteinleri ailesine dahil ST6Gal1'in proteolitik kesiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (41).

ST6Gal1, ilk kez 1990 yılında Grundmann ve diğ. (35) tarafından klonlanmıştır. 406 aminoasitten oluşan, 46,6 kDa. ağırlığında olan ve iki *N* glikolizasyon bölgesi içeren ST6Gal1 enzimi, şeker vericisi olarak CMP-NeuNAC (*Cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid*)'yi kullanır. Siyalik asitlerin α -2,6 bağı ile tip II disakkaritlerin ucunda bulunan galaktoz birimlerine aktarılmasından sorumludur. Bu disakkaritler ise *N*- veya *O*-bağlı oligosakkaritlerin ucunda *N*-asetilgalaktozamin ünitesi olarak bulunurlar.

ST6Gal1 enzimleri Golgi aparatının *trans* sisterna ve *trans* Golgi ağında yerleşik olarak bulunurlar (Şekil 2.3). Diğer siyaliltransferaz protein ailesi üyelerine benzer şekilde; 3-11 aminoasitlik kısa NH₂ ucunun bulunduğu sitoplazmik bölge, 16-20 aminoasitlik zara yerleşim sinyalini içeren bölge, 30-200 aminoasitlik gövde bölgesi ve 300-350 aminoasitlik COOH ucunun bulunduğu katalitik bölgeden oluşur (43,74). ST6Gal1 enzimleri, BACE1 enzimi tarafından gövde bölgesinden proteolitik kesime uğrayarak katalitik bölgeleri ile birlikte çözünür formda vücut sıvılarına salgılanırlar (57,58).



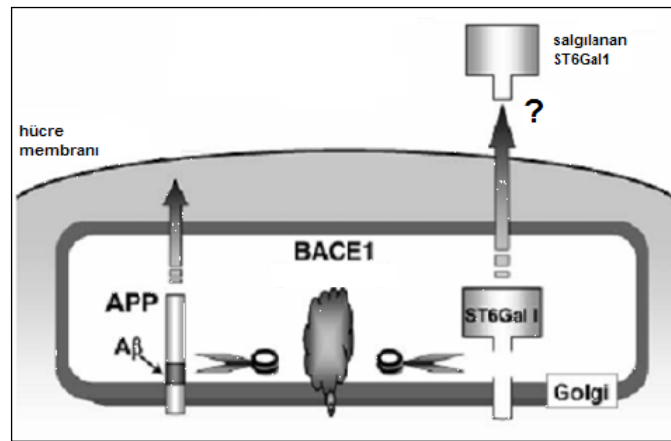
Şekil 2.3. ST6Gal1 enziminin topolojisi (TMD: *transmembrane domain*) (79).

Çözünür glikoproteinlerin biyolojik önemi halen tartışılmaktadır. Fakat, 2007 yılında Sugimoto ve diğ. (70) tarafından yapılan bir çalışma ile salgılanan ST6Gal1'in çözünür glikoproteinlerin α -2,6 siyalasyonundaki rolü ortaya konmuştur. Hücre dışında şeker verici substratlar bulunmadığından, ST6Gal1 enziminin hücre dışına salgılandıktan sonra katalitik olarak işlev görmesi mümkün değildir. Kesim sonrası salgılanan formun Golgi'de, *trans* Golgi ağında ve salgı keseciklerinde tespit edilmesi ile, ST6Gal1 enziminin salgılanan formunun hücre içerisinde işlev gösterdiği ortaya konulmuştur. Tam olarak işlevi ve substratları bilinmemekle birlikte çeşitli immünolojik reaksiyonları düzenlemek amacıyla akut faz hepatik reaksiyonlarda ST6Gal1'in hücre dışına salgılanmasının arttığı bilinmektedir (21,24,27). Ancak yapılan çalışma ile; Hep3B (insan karaciğer karsinoma hücre hattı) hücrelerinde BACE1 ve ST6Gal1'in yüksek düzeyde ifade ettirilmesiyle hücre yüzeyinde bulunan glikoproteinlerin siyalasyonu etkilenmezken, hücre dışına salgılanan çözünür glikoproteinlerin α -2,6 siyalasyonunun arttığı gözlenmiştir. BACE1 *knock-out* fare modelinde ise plazma proteinlerinde düşük seviyede α -2,6 siyalasyonun gözlenmesi, salgılanan ST6Gal1'in çözünür glikoproteinlerin siyalasyonundan sorumlu olduğunu desteklemiştir (70).

2.7. ST6Gal1 ve sIBM Patolojik Yolağındaki Olası İşlevi

BACE1 enziminin iki substratı olan ST6Gal1 ve kalıtsal Alzheimer'a neden olan mutasyonu içeren APPsw (*Swedish type familial Alzheimer's disease mutation*) aynı anda COS-7 (insan embriyonik böbrek hücre hattı) hücrelerinde yüksek düzeyde ifade ettirildiğinde, hücrelerden ST6Gal1 salgılanması azalmıştır. Bu çalışmada enzimin öncelikli substrat olarak ifade düzeyi artmış olan APPsw'yi seçebileceği, bu nedenle ST6Gal1'in kesilememesine bağlı olarak hücre dışına salgılanma seviyesinin azalmış olabileceği önerilmiştir (41).

ST6Gal1'in BACE1 enzimi tarafından kesilmemesi ve oligosakkaritlerin son şekeri olan siyalik asidi substratı olan glikokonjugatlara takamaması; hücre-hücre tanınması, hücre-matris etkileşimi, serum glikoproteinlerinin dolaşımı, karbohidrat gruplarının maskelenmesi ile hücre tanınmasının önlenmesi, almaç işlevi, vb. hücredeki birçok önemli biyolojik işlevin gerçekleşmemesine neden olacaktır (61,63). IBM hastalığında, BACE1'in hangi substratını işleme yolunu seçeceği ve salgılanan ST6Gal1'in işlevi olup olmadığının araştırılması ile ilgili olarak şu ana kadar bir çalışma yapılmamıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. BACE1 enzimi ve substratlarının hücre içerisindeki yerleşimleri (42).

2006 yılında Tadokoro ve diğ. (71) tarafından yapılan bir araştırmada, insan diploid fibroblast hücrelerinin in vitro ortamdaki yaşlanma süreçlerine bağlı olarak ST6Gal1 ifade düzeyinin ve hücre yüzeyindeki glikoproteinlerin α -2,6 siyalasyon düzeylerinin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Fakat, sIBM hastalığında ST6Gal1 ifadesinin ne şekilde değiştiği ile ilgili bir bilgi mevcut değildir. İn vitro ortamda yapılan bir başka çalışmada ise APP'nin α -2,6 siyalasyonunun, öncül proteinin metabolik döngüsünü hızlandığı yönünde önemli bulgular elde edilmiştir. Neuro2A (albino fare nöroblastom hücre hattı) hücrelerinde ST6Gal1 ifadesinin artışının APP'nin α -2,6 siyalasyonunu arttırdığını ve bu artışın APP'nin BACE1 enzimi tarafından işlenmesini hızlandırıp toksik metabolitlerin birikimini kolaylaştırdığı saptanmıştır (53). Bu bulgular ışığında, normal hücre yaşlanması sürecinde azalması gereken ST6Gal1 ifadesinin, sIBM patolojik yolağında ne şekilde bir değişim gösterdiği ve bununla birlikte BACE1 enziminin hangi substratını işleme yolunu seçeceği, soru işaretleri olarak karşımıza çıkmaktadır.

GNE genindeki mutasyonlara bağlı olarak siyalik asit biyosentezindeki bozuklukların sIBM hastalığının patogenezi oluşturduğu bilinmektedir (26). Fakat, sIBM'de siyalik asit biyosentezi doğru şekilde gerçekleştiğinden, siyalik asitin sIBM patolojik yolağının herhangi bir noktasında işlevi olup olmadığı araştırılmamıştır.

sIBM kas liflerinde başta APP olmak üzere birçok proteinin ifade düzeyinin arttığı bilinmektedir (8-10). Bu tez çalışmasında, ST6Gal1'in de ifade düzeyinin arttığını fakat patolojik süreçte BACE1'in öncelikli substrat olarak ST6Gal1 yerine ifade düzeyi artmış olan APP'yi işleme yolunu seçtiğini, bu nedenle ST6Gal1'in işlenememesine bağlı olarak hücrelerden salgılanamadığını düşünüyoruz. Bu hipotezden yola çıkarak, Amiloid β plaklarının oluşumu ile karakterize dejeneratif bir kas hastalığı olan sIBM'in hücre kültür modelinin oluşturulması ve bu modeli kullanarak ST6Gal1'in ifade düzeyi ve hücre dışına salgılanma seviyesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, ilk adım olarak vektör sistemleri aracılığıyla C2C12 (fare miyoblast hücre hattı) hücrelerinde lipozomal transfeksiyon ile APP'nin yüksek

düzyeyde ifadesi sağlanarak sIBM hücre kültür modeli oluşturulmuş ve sIBM kas liflerine özgül proteinlerin ($A\beta_{PP}$ ve $A\beta_{40}/A\beta_{42}$) immünfloresan boyamalarla birikiminin saptanmasıyla modelin oluşturulduğu gösterilmiştir. İkinci adım olarak, APP'nin yüksek düzeyde ifadesinin görüldüğu sIBM hücre kültür modelinde fare ST6Gal1 enziminin ifade düzeyi araştırılmıştır. Son aşamada ise, sIBM hücre kültür ortamındaki total proteinler izole edilerek *Western Blot* analizi yapılmış ve hücrelerden salgılanan ST6Gal1 miktarı, APP transfeksiyonunun yapılmadığı kontrol hücrelerle, protein düzeyinde karşılaştırılmıştır. Bu verilerden yararlanılarak ST6Gal1'in sIBM patogenezindeki rolü ortaya çıkartılmaya çalışılmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.A. Hücre Kültürü

C2C12 fare miyoblast hücre hattı (*American Type Culture Collection*)

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (Biochrom)

Fötal Dana Serumumu (Biochrom)

At serumu (Sigma)

Tripsin EDTA, (Biochrom)

L-Glutamin, 200 mM (Biochrom)

Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Applichem)

Hücre bölünmesini sağlayan hücre kültür ortamı: %20 fötal dana serumu ve

2mM. L-Glutamin içeren DMEM

Hücre farklılaşmasını sağlayan hücre kültür ortamı: %2 at serumu ve

2mM. L-Glutamin içeren DMEM

Hücre dondurma ortamı: %90 fötal dana serumu ve %10 DMSO

3.1.B. Rekombinant Gen İfade Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması

Plazmid vektör: 751-APP/pCMV-SPORT6 (Invitrogen, Cat. No: FL1002)

Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease), transcript variant 2, mRNA (cDNA clone MGC:75167 IMAGE:6152423), complete cds.

Sıvı Bakteri Besiyeri pH 7.5 :10 g. Tripton (Applichem)

5 g. Maya özütü (Applichem)

5 g. NaCl (Sigma)

12.5 ml. (1 M.) MgCl₂ (Sigma)

12.5 ml. (1 M.) MgSO₄ (Sigma)

10 ml. (2 M.) Glukoz (Sigma)

dH₂O ile toplam hacim 1 L.'ye tamamlanır.

Katı Bakteri Besiyeri :10 g. Tripton (Applichem)
 5 g. Maya özütü (Applichem)
 5 g. NaCl (Sigma)
 12.5 ml. (1 M.) MgCl₂ (Sigma)
 12.5 ml. (1 M.) MgSO₄ (Sigma)
 10 ml. (2 M) Glukoz (Sigma)
 15 g. Agar (Sigma)
 1 ml. (50 µg/ml.) Kanamisin
 dH₂O ile toplam hacim 1 L.'ye tamamlanır.

Kanamisin antibiyotik solüsyonu 100X (Gibco)

Mini-prep plazmid saflaştırma kiti (Promega)

3.1.C. Transfeksiyon

Fugene HD transfeksiyon reaktifi (Roche, Cat. No: 4709705001)

Minimum Essential Medium (MEM) (Biochrom)

Propidium Iodide (Sigma)

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (Sigma)

3.1.D. İmmünfloresan Boyama

Triton X-100 (Sigma) : 0.2% /PBS (v/v)

Keçi serumu (Sigma) : 10% /PBS (v/v)

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma) : 10% /PBS (w/v)

Tween 20 (Sigma) : 0.1% /PBS (v/v)

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (Sigma)

Kapama ortamı (*ProLong Gold antifade reagent*, Molecular Probes, Cat. No: 36930)

1X PBS (*Phosphate buffered saline*) (pH 7.4) :

NaCl (Carlo Erba)	140 mM.
KCl (Carlo Erba)	3 mM.
KH ₂ PO ₄ (Carlo Erba)	0.9 mM.
NaHPO ₄ (Merck)	6.4 mM.

Birincil antikorlar: fare anti-A β ₄₀/A β ₄₂ (Sigma)
 tavşan anti-APP (Zymed)
 fare anti-hST6Gal1 (Abnova)
 tavşan anti-GOLPH4 (Abcam)

İkincil antikorlar: Keçi anti-tavşan AF 488 (Molecular Probes)
 Keçi anti-fare AF 568 (Molecular Probes)
 Keçi anti-tavşan AF 568 (Molecular Probes)
 Keçi anti-fare AF 488 (Molecular Probes)

3.1.E. Kongo Kırmızısı Boyaması

Kongo Kırmızısı Kiti (*Amyloid Stain Congo Red Kit*, Sigma, Cat. No: HT60)

3.1.F. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Albumin uzaklaştırma kiti (*ProteoExtract Albumin Removal Kit*, Merck, Cat. No: 122640)

Amicon Ultra-4 santrifüj filtreleri (10.000 MWCO) (Millipore)

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Cat. No. 23225)

Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Roche, Cat. No: 11836170001) : 1 tablet/10 ml.

hücre lizati

Lizis tampon (pH 7.4)	: Tris HCl (Merck)	10 mM.
	NaCl (Merck)	300 mM.
	EDTA (Merck)	2 mM.
	<i>Triton X-100</i> (Sigma)	% 0,5 (v/v)

3.1.G. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (PAGE)

% 12'lik <i>Resolving</i> Jel :	% 30 akrilamid/bisakrilamid	3.13 ml.
	Tris 1M. pH: 8.8	2.50 ml.
	dH ₂ O	1.90 ml.
	% 20 SDS pH: 7.2	37.5 µl.
	% 10 APS	50 µl.
	TEMED	5 µl.
% 3'lük <i>Stacking</i> Jel :	% 37.5 akrilamid/bisakrilamid	250 µl.
	Tris 1M. pH: 6.8	312 µl.
	dH ₂ O	1.9 ml.
	% 20 SDS pH: 7.2	12.5 µl.
	% 10 APS	20 µl.
	TEMED	5 µl.

% 10'luk Amonyum Persülfat (APS) (Amersham) : 0.1 g./ml. (w/v)

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Amersham)

Tris Baz (Sigma)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)

3.1.H. *Western Blot* Analizi

Yürütme tamponu (pH 8.6) : Tris baz (Sigma) 0.124 M.

Glisin (Sigma) 1.250 M.

dH₂O

Örnek yükleme tamponu: 4X Yükleme tamponu

(*NuPAGE Sample Buffer*, Invitrogen, Cat. No: NP0007)

10X *Dithiothreitol* (DTT) içeren indirgeme tamponu

(*NuPAGE Sample Reducing Agent*, Invitrogen, Cat. No:

NP0004)

Transfer tamponu (pH 8.3) :	Tris-HCl 1M. pH: 6.8 60mM.
	Gliserol %25
	dH ₂ O
Yıkama tamponu (TBS, pH 7.4) :	Tris baz 20 mM.
	NaCl 137 mM.
TBS yıkama tamponu (TBSxT):	% 0.1 Tween 20 (v/v) (Sigma)
Bloklama tamponu :	süt tozu 1 g. (%10)
	TBS-T 10 ml.
Birincil ve ikincil antikor sulandırma solüsyonu :	süt tozu 0.5 g (%5)
	TBS-T 10 ml.

Birincil antikor : fare anti-hST6Gal1 (Abnova)

İkincil antikor : Horseradish peroksidaz (HRP) ile işaretli anti-fare (Sigma)

Nitroselüloz mambran (Sigma)

Protein molekuler ağırlık belirleyicisi (BioLabs)

Coomassie brilliant blue R-250 (Amersham)

Ponceau S. solüsyonu (Sigma)

ECL-Plus kemilüminesans işaretleyici (Amersham, Cat. No: RPN 2132)

3.2. Yöntemler

Tez çalışması kapsamında C2C12 hücrelerinde geçici (*transient*) transfeksiyon ile APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlanarak sIBM hücre kültür modeli oluşturulmuştur. Transfekte edilmiş C2C12 hücrelerindeki ve hücre kültür ortamındaki proteinler izole edildikten sonra *Western Blot* analizine alınarak, ST6Gal1 enziminin hücre içi ve salgılanan formları kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

3.2.A. C2C12 Hücre Hattı

sIBM hücre kültür modelinin oluşturulması amacıyla C2C12 fare miyoblast hücre hatları kullanıldı. Hücre kültür modellerinin oluşturulabilmesi için iyi tanımlanmış hücre sistemleri ile çalışmak gereklidir. İskelet kası gibi farklılaşması çok karışık ve çok aşamalı süreç gerektiren hücrelerle yapılan çalışmalarda genellikle primer kültürler ve hücre hatları kullanılmaktadır. Tez çalışması kapsamında yapılan ön çalışmalar ile kurmuş olduğumuz insan primer miyoblast kültürlerinde düşük oranlarda dahi fibroblast hücrelerinin bulunmasının, hipotezimize yönelik olarak salgılanan ST6Gal1'in hangi hücre kaynaklı olduğunun belirlenmesinde sorun yaratabileceği düşünüldü. Bu nedenle, sIBM hücre kültür modelinin oluşturulması için primer kültür yerine saf miyoblastlardan oluşan ticari hücre hatlarının kullanılmasına karar verildi.

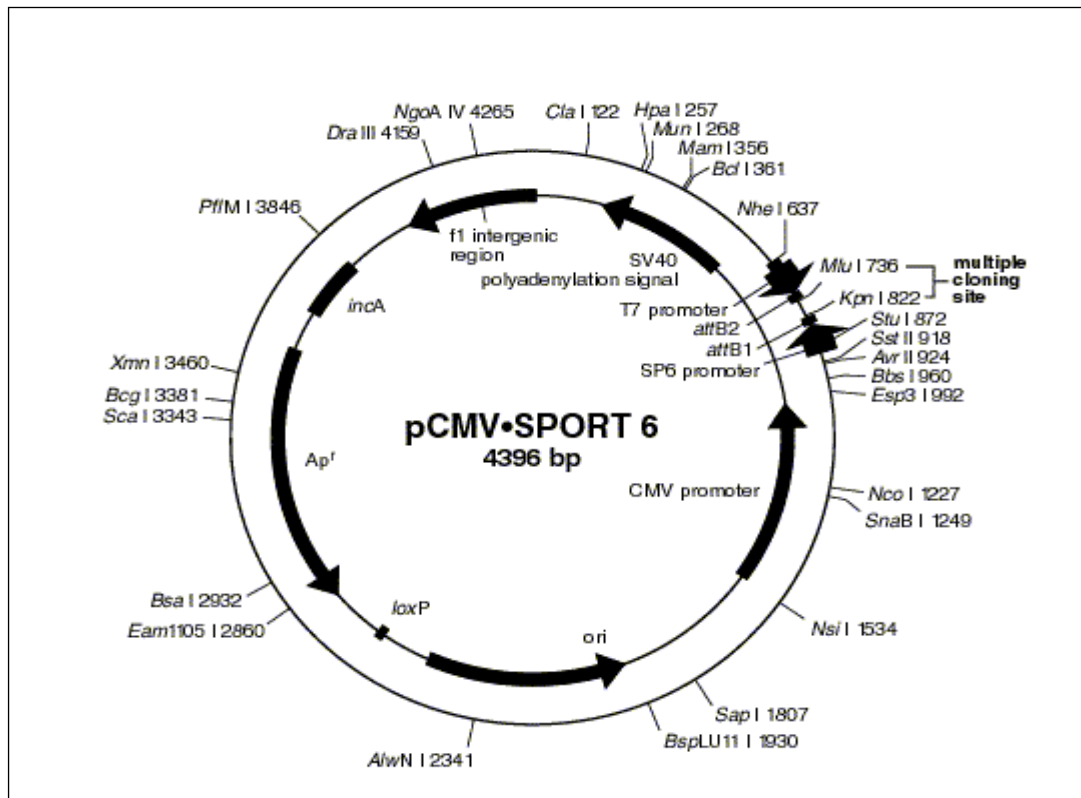
Ticari olarak sadece fare ve sıçan miyoblast hücre hatları mevcuttur. Bu nedenle çalışmalarımızda kullanılacak olan ve insan ST6Gal1 proteininin hücre içi formunu tanıyan antikorun, fare ve sıçan ST6Gal1 proteinini tanıyıp tanımadığı *Western Blot* analizi ile kontrol edildi ve antikorun fare ST6Gal1 enziminin hücre içi ve salgılanan formunu tanıdığına saptanması ile, hipotezimize yönelik olarak sIBM hücre kültür modelinin oluşturulabilmesi için C2C12 fare miyoblast hücre hattının uygun olabileceği sonucuna varıldı.

1. C2C12 fare miyoblast hücre hatları (*American Type Culture Collection*) temin edildi.
2. Hücreler %10 oranında fetal dana serumu ve 2 mM. L-glutamin içeren *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) hücre kültür ortamı içinde %80 yoğunluğa ulaşana kadar, %5 oranında CO₂ içeren, 37°C'deki etüvde inkübe edildi.
3. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinize edildi ve 1x10⁶ hücre/ml. dondurma ortamı (%90 fetal dana serumu, %10 DMSO) olacak şekilde donduruldu. 48 saat

-80°C’de saklanan hücreler transfeksiyon aşamasına kadar sıvı azot (-196°C) tanklarına alınarak depolandı.

3.2.B. 751-APP cDNA’sını İçeren Rekombinant Gen İfade Vektörünün Transfeksiyon İçin Hazırlanması

C2C12 hücre hattında APP'nin yüksek düzeyde ifade ettirilebilmesi için insan 751-APP cDNA’sını içeren ve geçici ekspresyon sağlayan rekombinant plazmid vektör temin edildi. 3550 bç. uzunluğunda gen içeren vektör kasetinin şeması Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 751-APP/pCMV-SPORT6 vektör kaseti. (Invitrogen, Cat. No: FL1002)

751-APP genini içeren vektör; E.coli DH10B TonA suşlarına transforme edilmiş olarak %8 gliserol, amfisilin, 500ul. LB ortamı içerisinde bulunmaktadır. Bu tür klonlama çalışmalarında, ana stoktaki bakterilerin tek koloni halinde çoğaltılması ve vektör DNA’sının dizi analizi yapılarak içerdiği klonun doğruluğunun kontrol

edilmesi gereklidir. Uygun dizinin klonlanmış olduğu plazmid vektörünü içeren bakteri kolonisinin seçilerek daha sonraki çalışmalar için saklanması gerekmektedir.

Bu amaçla aşağıda belirtilen çalışmalar yapıldı.

3.2.B.1. Tek Koloni Ekimi

751-APP/pCMV-SPORT6 vektörünün transforme edildiği E.coli hücreleri ile LB-amfisilin katı bakteri besiyerine ekim yapıldı ve 16-18 saat 37°C'deki etüvde inkübe edildi.

3.2.B.2. Transforme Hücrelerin Çoğaltılması

İnkübasyon sonrası amfisilin direnç özelliğine göre uygun cDNA'ları taşıyan tek koloniler seçilerek plazmid saflaştırması için sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 16-18 saat 37°C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi.

3.2.B.3. Mini-Prep Plazmid Saflaştırması

Sıvı besiyerinde çoğaltılan transforme bakterilerden *mini-prep* plazmid saflaştırması yapıldı.

1. Çoğalan bakteriler 50 ml.'lik tüplere aktarıldı ve 2500 rpm.'de 10 dk. santrifüj yapıldı.
2. Hücre pelleti üzerine 250 µl. resüspanسیون solüsyonu eklendi ve pipet yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra 250 µl. lizis solüsyonu eklenerek alt üst edildi.
3. Karışımın üzerine 10 µl. alkalın proteaz solüsyonu eklendi ve alt üst edilerek 3 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonrası 350µl. nötralizasyon solüsyonu ilave edilerek tüp alt üst edildi ve karıştırıcı yardımıyla tüp içeriğinin tamamen homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra oda sıcaklığında 14.000 rpm.'de 10 dk. santrifüj yapıldı.
5. Süpernatant rezin bağlı kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında 14.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj yapıldı.
6. Kolona bağlanan plazmid DNA'sını izole etmek amacıyla, kolon yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 750 ve 250 µl. olacak şekilde iki kez etanol içeren yıkama solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Kolon yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 100 µl. nükleaz içermeyen distile su ilave edildi. 14.000 rpm.'de 1 dk. santrifüj sonrası kolondan tüpe geçmiş olan plazmid DNA'sının konsantrasyonu 260 nm. dalga boyunda ölçüldü (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*).
8. Saflaştırılan plazmid DNA'ları agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, 8kb. (plazmid vektör ve ilgilenilen genin toplam uzunluğu) uzunlukta olanlarının DNA dizi analizi yapıldı.

3.2.B.4. 751-APP cDNA Dizisinin Kontrolü

700 ng./µl. konsantrasyondaki plazmid DNA'ları SP6 promotör primeri (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3') ile DNA dizi analizine alındı. Analiz sonucunda 3550 bp. uzunluğundaki 751-APP cDNA'sının doğru baz dizilimine sahip olduğu kanıtlandı. Uygun dizinin klonlanmış olduğu vektörü içeren tek koloni bakteri kültürü 1/4 oranında gliserol ile karıştırıldı ve -80°C'deki derin dondurucuda saklandı. Transfeksiyon amacıyla kullanılacağı zaman; hazırlanan plazmid ara stoğundan 20 µl. alınarak sıvı besiyerine ekim yapıldı ve bakteriler 16-18 saat 37°C'deki çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Ekim sonrası çoğaltılan bakterilerden *Mini-prep* plazmid saflaştırılması yapıldı ve DNA konsantrasyonu 260 nm. dalga boyunda ölçüldü.

3.2.C. 751-APP/pCMV-SPORT6 Gen İfade Vektörünün C2C12 Hücrelerine Transfeksiyonu

C2C12 fare miyoblast hücre hatları antibiyotiksiz hücre kültür ortamında çoğaltılarak transfekte edildi. Transfeksiyon amacıyla; yüksek transfeksiyon etkinliği ve düşük sitotoksik yan etkisi olduğu bilinen, lipozom yapısındaki *Fugene HD* transfeksiyon reaktifi kullanıldı. C2C12 hücreleri için en uygun transfeksiyon koşullarının bulunabilmesi ve transfeksiyon etkinliğinin saptanabilmesi için pCMV3.1-GFP gen ifade vektörü kullanıldı. Bu şekilde hücreler, transfeksiyon sonrası floresan mikroskop altında incelendi.

1. 60 mm. çapındaki petri kapları içine steril cam lameller yerleştirildi ve 2.5×10^5 hücre, 4ml hücre kültür ortamı içerisine konuldu. Hücreler 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi.
2. 24 saat sonunda hücre kültür ortamı yenisi ile değiştirilerek hücreler etüv içerisinde 1 saat inkübe edildi.
3. Eş zamanlı olarak hazırlanan transfeksiyon karışımı 45dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
Transfeksiyon karışımı: MEM hücre kültür ortamı (350 μl)
Plasmid (751-APP/pCMV-SPORT6)
Fugene HD
Plasmid (x1000ng.) / Transfeksiyon reaktifi (μl .) oranı: 3:10
4. Transfeksiyon karışımı hücreler üzerine pipet yardımıyla ilave edildi ve hücreler 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi.
5. 24 saatin sonunda hücrelerin ~%80 çoğunluğa ulaşmasından sonra hücre kültür ortamı, çok çekirdekli miyotüplerin oluşumu için gerekli olan ve hücrelerin farklılaşması amacıyla kullanılan kültür ortamı ile değiştirildi ve 37°C 'de %5 CO_2 içeren etüvde farklı sürelerde (12, 24, 48 ve 72 saat) inkübe edildi.

751-APP/pCMV-SPORT6 ifade vektörünün transfekte edilmediği C2C12 hücreleri kontrol amaçlı kullanıldı.

3.2.D. Transfeksiyon Sonrası Canlılık Oranının Tespit Edilmesi

Hücre kültürlerinde transfeksiyon çalışmaları sırasında kullanılan transfeksiyon reaktifleri hücrelerde toksik etki yaratabilmekte ya da fazla miktarda ifade edilen proteinler hücre ölümüne neden olabilmektedir. Özellikle kültür ortamında hastalık modeli oluşturmak amacıyla yapılan çalışmalar sonrasında, bu modelin kullanımı ile farklı araştırmaların yapılabilmesi için, hücrelerin transfeksiyon sonrası canlılık oranının yüksek olması gerekmektedir.

3.2.D.1. Propidium Iodide Boyaması

Propidium Iodide DNA yapısındaki bazlar arasına kelasyon yapabilen floresan bir moleküldür. Canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırmaya yarar. Floresan mikroskobu altında FITC filtresi kullanımı ile ölü hücreler kırmızı floresan renk verir.

1. Transfeksiyondan 24 saat sonra yaklaşık olarak 5×10^5 hücre sayısına ulaşmış olan hücreler tripsinize edilmiş ve tripsinin etkisiz olması için %20 fetal dana serumu içeren DMEM hücre kültür ortamı ile karıştırıldı.
2. Hücreler 1 mg/ml oranında hazırlanmış olan *propidium iodide* boyası ile 1 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrasında, floresan mikroskobu altında FITC filtresinde kırmızı floresan veren (ölü) ve vermeyen (canlı) hücreler sayıldı ve transfeksiyon sonrası hücrelerin canlılık oranı hesaplandı.

3.2.D.2. DAPI Boyaması

DAPI, DNA yapısındaki bazlar arasına kelasyon yapabilen floresan bir boya olup, hücre zarından kolaylıkla geçebilmesi nedeniyle hem canlı hem de ölü hücrelerin çekirdeklerinin boyanmasını sağlar. Floresan mikroskopunda DAPI filtresi (maksimum uyarım: 358 nm., maksimum yayılım: 461 nm.) kullanımı ile hücre çekirdekleri mavi renkte görünür. Transfeksiyon sonrası lamel üzerindeki hücreler, %4'lük paraformaldehit solüsyonu ile sabitlendi ve 1:1000 oranında distile su ile seyreltilen DAPI solüsyonu ile boyandı. Boyama sonrası transfekte olmuş ölü hücreler sayılarak, hücrelerde saptanmış olan ölüm oranının hangi oranda transfeksiyon kaynaklı olduğu saptandı.

3.2.E. Hücre Kültürü Ortamında sIBM Patolojisinin Saptanması

sIBM hastalarına ait iskelet kas biyopsilerinde; APP öncül proteininin ve toksik A β peptidinin ifade düzeylerinin arttığı ve amiloid birikimlerinin gözleendiği bilinmektedir. Bu nedenle, hücre kültürü ortamında sIBM patolojisinin oluştuğunun kanıtlanması için, sIBM kas liflerinde biriken özgül proteinlerin (APP, A β ₄₀, A β ₄₂) immünfloresan boyama teknikleri ile gösterilmesi gerekmektedir. Ayrıca, çözünmeyen fibriler yapıdaki amiloid birikimlerinin, sIBM hücre kültür modelindeki hücrelerde Kongo Kırmızısı boyaması ile gösterilebilmesi, hastalık modeli oluşumunun diğer önemli bir kanıtıdır.

3.2.E.1. İmmünfloresan Boyama

Hücre ve dokulardaki proteinlerin florofor adı verilen renk verici kimyasallarla işaretlenerek görünür hale getirildiği immün boyama tekniğine immünfloresan boyama adı verilir.

1. Transfeksiyonu takiben farklı saatlerde (12, 24, 48, 72 saat) petri kapları içerisindeki lameller alındı ve lamel üzerindeki hücreler %4'lük paraformaldehit solüsyonunda fikse edildi.

2. Hücreler 1XPBS solüsyonunda yıkama sonrasında, %0.2 Triton X-100/1XPBS solüsyonu ile 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edilerek, hücre zarının geçirgenliği artırıldı.
3. Lamel üzerindeki hücreler 1XPBS solüsyonunda yıkandı ve birincil antikorun özgül olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla 1 saat %10 keçi serumu ve %10 *bovine serum albumin* (BSA) içeren %0.1 Tween20/1XPBS solüsyonu ile inkübe edildi.
4. Hücreler sırasıyla birincil antikor ile 1 saat ve yıkama sonrasında ikincil antikor ile 20 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi (Antikorları sulandırmak amacıyla kullanılan solüsyon: %10 keçi serumu içeren %0.1 Tween20/1XPBS). Birincil antikor olarak 1:500 dilüsyon ile fare anti-A β_{40} /A β_{42} (Sigma), 1:100 dilüsyon ile tavşan anti-APP (Zymed) ve 1:10 dilüsyon ile fare anti-hST6Gal1 (Abnova) kullanıldı. İkincil antikor olarak 1:500 dilüsyon ile anti-tavşan AF 488 ve anti-fare AF 568 (Molecular Probes) kullanıldı. Birincil ve ikincil antikorla boyama sonrasında distile su ile 1:1000 oranında seyreltilen DAPI ile çekirdek boyaması yapıldı. C2C12 hücrelerinde aynı örnek üzerinde eş zamanlı olarak iki farklı proteini tanıyan antikorların kullanılmasıyla eş boyama yapıldığında, birincil antikorların farklı canlılarda üretilmiş olmasına dikkat edildi. Eş boyama sonucunda her protein farklı floroforlarla işaretlendiğinden, floresan mikroskopunda farklı filtreler altında bu proteinler görüntülendi. Farklı renklerde olan proteinlerin aynı preparatta gösterilebilmesi için, farklı filtrelerden alınan görüntüler karşılaştırıldı.
5. Lameller kapama ortamı kullanılarak lam üzerine yapıştırıldı ve kuruması için karanlıkta 10-12 saat bekletildi.
6. Boyama sonrası lamlar, floresan ataçmanlı *inverted* mikroskop (Trinoküler Floresan Ataçmanlı Inverted Mikroskop, Leica DMIL) kullanılarak incelendi.

3.2.E.2. Kongo Kırmızısı Boyaması

Kongo Kırmızısı boyaması; dokularda biriken ve fibril yapısı gösteren amiloid birikimlerinin, ışık mikroskobunda çift kırınımlı (polarize) ışık altında parlak sarı/yeşil ve floresan mikroskobunda DAPI filtresi (maksimum uyarım: 358 nm., maksimum yayılım: 461 nm.) kullanımı ile kırmızı renkte görülmesini sağlayan histokimyasal boyama tekniğidir.

1. Transfeksiyon sonrası C2C12 hücreleri, miyoblastların füzyona girerek çok çekirdekli miyotüpleri oluşturması amacıyla, 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 72 saat inkübe edildi.
2. 72. saatin sonunda petri kapları içerisindeki lameller alındı ve lamel üzerindeki hücreler %4'lük paraformaldehit solüsyonu ile fiksasyon sonrası, 3 defa 1XPBS solüsyonunda yıkandı.
3. Lameller 3 dk. hematoksilen solüsyonu içinde inkübe edilerek hücre çekirdeklerinin boyanması sağlandı ve fazla hematoksilen boyasının uzaklaştırılması amacıyla çeşme suyu ile yıkama yapıldı.
4. Alkalin sodyum klorür çözeltisinde 30 dk. bekletilen lameller, Kongo Kırmızısı çözeltisine alınarak 45 dk. inkübe edildi.
5. Sırasıyla %98'lik etanol ve ksilolden geçirilen lameller kapama ortamı kullanılarak lam üzerine yapıştırıldı ve ışık mikroskobunda çift kırınımlı (polarize) ışık altında incelendi.

3.2.F. hST6Gal1 Antikorunun Fare ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi Formunu Tanıyıp Tanımadığının Test Edilmesi

3.2. F. 1. Dokudan protein izolasyonu

Çeşitli fare dokularından protein izolasyonu yapıldı. Kullanılan fare dokuları, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul raporu alınmış olan 2005/40-8 karar numaralı “Deneysel kas dejenerasyonu oluşturmaya yönelik tendon kesisi modeli standardizasyonu” başlıklı araştırmada canlılığı sona erdirilmiş olan farelerden elde edildi.

Hücre zar sistemlerinin parçalanmasını sağlayan farklı deterjanların ve fiziksel yöntemlerin denenmesi sonucunda; hücre içerisinde Golgi zarında yerleşik bir protein olan ST6Gal1’in fare dokularından izolasyonu için en uygun koşullar standardize edildi. -80°C’de bekletilen doku örnekleri; 2 µl./µg. olacak şekilde proteaz inhibitörleri ve hücre zarlarının parçalanmasını sağlayan deterjan içeren lizis tamponu içerisine alındı. Örnekler homojenizatör yardımıyla 3 kez homojenize edildikten sonra, 4°C’de 30 dk. inkube edildi. 1 dakika kuru buz ve metanol içinde ve 1 dk. 37°C’deki su banyosunda bekletilerek şoklama yapıldı. Bu işlem iki defa tekrarlandı, bu sayede hücre ve organel zarlarının parçalanması sağlandı. Örnekler 14.000 rpm’de 10 dk. 4°C’de santrifuj edilerek süpernatanda bulunan proteinler toplandı.

3.2.F.2. Western Blot Analizi (Bkz. 3.2.H.4 ve 3.2.H.5)

ST6Gal1 enzimin yüksek düzeyde ifade olduğu bilinen fareye ait farklı dokulardan elde edilen proteinler *Western Blot* analizine alındı ve insan ST6Gal1 enziminin hücre içi formuna karşı oluşturulmuş bu antikorun, fare ST6Gal1 enziminin hücre içi formunu tanıyıp tanımadığı araştırıldı.

3.2.G. hST6Gal1 Antikorumun Fare ST6Gal1 Enziminin Salgılanan Formunu Tanıyıp Tanımadığının Test Edilmesi

sIBM hücre kültür modelinde fare ST6Gal1 enziminin hücre dışına salgılanma seviyesinin değişip değişmediğini araştırmak için ikinci adım olarak; hST6Gal1 antikorumun fare ST6Gal1 enziminin salgılanan formunu tanıyıp tanımadığının test edilmesi gerekmektedir.

ST6Gal1 enziminin hücre içinde BACE1 enzimi tarafından kesime uğradıktan sonra hücre dışındaki sıvılara (süt, plazma vb.) bol miktarda salgılandığı bilinmektedir. Bu amaçla, hST6Gal1 antikorumun fare ST6Gal1 enziminin salgılanan formunu özgül olarak tanıyıp tanımadığının analiz edilebilmesi için fare plazmasından protein izole edilerek *Western Blot* analizi yapıldı. Fakat, plazma örneklerinde çok yoğun olarak bulunan albumin proteini, jeldeki protein örneklerinin yürümesini ve fare ST6Gal1'in salgılanan formunun moleküler ağırlığını doğru olarak tespit etmemizi engeller. Ayrıca, memeli plazmasındaki birçok protein albumine bağlı olarak bulunmaktadır. Bu nedenle, albuminin tamamının uzaklaştırılmasına bağlı olarak ST6Gal1 enziminin miktar kaybı olabileceğinden, plazmadaki albumini ≥ 72 oranında uzaklaştırabilen bir sistem yardımıyla albuminin uzaklaştırılması sağlandı. Uygulama sonrasında protein örnekleri aseton ile çöktürülerek konsantre hale getirildi ve *Western Blot* analizi gerçekleştirildi.

3.2.G.1. Fare Plazmasından Protein İzolasyonu

Kan alma sırasında ve sonrasında plazmada bulunan proteinler ve endojen peptidler yıkılmakta ya da değişime uğrayabilmektedirler. Bu nedenle, içerisinde jel olmayan mekanik ayırıcının, antikoagülan ajan olarak K₂EDTA'nın ve proteinlerin dayanıklılığını artırmak amacıyla proteaz inhibitörlerinin bulunduğu özel tüpler (BD P100 kan alma tüpleri) kan alma sırasında kullanıldı.

1. ~3ml. kan tüp içerisine alındı ve tüp içerisinde bulunan maddelerle karışması için tüp alt üst üst edildi.

2. Tüpler 4000 rpm. hızda ve oda sıcaklığında 15 dk. santrifüj edildi.
3. Mekanik ayırıcının üst kısmında kalan plazma, pipet yardımıyla 1.5 ml.'lik tüplere aktarılarak -80°C'deki derin dondurucuda saklandı.

3.2.G.2. Plazma Protein Örneklerinden Albuminin Uzaklaştırılması

1. Fare plazma proteinleri üzerlerine 10 katı kadar hacimde kolona albuminin bağlanmasını sağlayan bağlanma tamponu ile karıştırılarak seyreltik hale getirildi.
2. Seyreltik hale getirilmiş olan plazma proteinleri rezin içeren kolonlara aktarıldı ve kolonun altındaki tüpe albuminden uzaklaştırılmış olan plazma proteinlerinin aktarılması sağlandı.

3.2.G.3. Aseton ile Plazma Protein Örneklerinin Çöktürülmesi

1. Albuminin uzaklaştırılması sonucunda seyreltik hale gelmiş olan plazma protein örnekleri ependorf tüpleri içerisine aktarıldı ve üzerlerine dört katı kadar hacimde -20°C'de soğutulmuş olan aseton ilave edildi.
2. 1 saat -20°C'deki derin dondurucuda bekletildi.
3. 1 saatin sonunda tüpler 10dk. 14.000 rpm.'de santrifüj edildi.
4. Süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı ve pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
5. Kuruyan protein pelleti lizis tamponunda çözüldü ve miktar tayini sonrası *Western Blot* yöntemi ile analiz edildi.

3.2.G.4. Western Blot Analizi (Bkz. 3.2.H.4 ve 3.2.H.5)

Fare plazmasından elde edilen ve albuminden uzaklaştırılan proteinler *Western Blot* analizine alındı ve insan ST6Gal1 enziminin hücre içi formuna karşı oluşturulmuş bu antikorun, fare ST6Gal1 enziminin salgılanan formunu tanıyıp tanımadığı test edildi.

3.2.H. sIBM Hücre Kültür Modelinde ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi ve Salgılanan Formunun Analizi

sIBM kültür modeli oluşturulmuş C2C12 hücrelerindeki ve hücre kültür ortamındaki proteinler izole edildi ve miktar tayini sonrasında *Western Blot* analizine alınarak, ST6Gal1 enziminin hücre içi ve salgılanan formu kontrol hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edildi.

3.2.H.1. C2C12 Hücrelerinden Protein İzolasyonu

$\sim 1 \times 10^6$ hücre üzerine 24. saatin sonunda, 200 μ l. lizis tamponu ilave edildi. Toplanan hücreler 4°C’de 30 dk. inkube edildi. Hücreler, 1 dakika kuru buz ve metanol içinde ve 1 dk. 37°C’deki su banyosunda bekletilerek sıcaklık şoku uygulandı. Bu işlem iki defa tekrarlandı, bu sayede hücre ve organel zarlarının parçalanması sağlandı. Örnekler 14.000 rpm’de 10 dk. 4°C’de santrifuj edilerek süpernatanda bulunan proteinler toplandı.

3.2.H.2. Hücre Kültür Ortamından Protein İzolasyonu

Transfeksiyon sonrası APP’nin yüksek düzeyde ifadesinin sağlandığı C2C12 hücreleri üzerine hücre farklılaşması amacıyla ilave edilen hücre kültür ortamı farklı saatlerde (12, 24, 48, 72 saat) toplandı. Toplanan hücre kültür ortamları içerisine 50 μ l./ml. olacak şekilde proteaz inhibitörü içeren tampon çözeltisi ilave edildi. Örnekler 2000 rpm.’de 10 dk. santrifuj edilerek ölü hücrelerin hücre kültür ortamından uzaklaşması sağlandı. Süpernatant toplandı ve proteinler Amicon Ultra-4

(10.000 MWCO) filtreleri yardımı ile 4500 rpm.'de 20 dk. santrifüj edilerek konsantre edildi.

3.2.H.3. Protein Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Western Blot analizi öncesinde hücrelerden ve hücre kültür ortamından izole edilen protein örneklerindeki toplam protein konsantrasyonu BCA (*bicinchoninic acid*) tekniği (67) ile 280 nm. dalga boyunda ölçüldü (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*).

3.2.H.4. SDS-PAGE

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrışmalarını sağlamak için SDS-PAGE kullanıldı. Bu amaçla *resolving* ve *stacking* olacak şekilde iki katmanlı jel sistemi hazırlandı.

Dikey jel sisteminin (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell BIO-RAD) iki camı arasına 0.75 mm. kalınlığında *spacer*lar yerleştirildi ve ilk olarak pipet yardımıyla %12 oranında akrilamid içeren *resolving* jel döküldü. Bu işlem sırasında ikinci katmanı oluşturan ve %5 oranında akrilamid içeren *stacking* jelin dökülmesi için 3 cm. boşluk bırakıldı. *Resolving* jel solüsyonu döküldükten hemen sonra üzerine bir miktar dH₂O eklenerek jel yüzeyinin kuruması önlendi. *Resolving* jel polimerize olduktan sonra, üzerine *stacking* jel dökülerek 0.75 mm. kalınlığında 10 kuyucuklu tarak yerleştirildi.

Protein örnekleri, % 10 oranında DTT içeren indirgeme tamponu ve %4 oranında yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra 90°C'de 4 dk. denature edildi ve 100'er µg. protein kuyucuklara yüklenerek jel, 80 voltta 30 dk. boyunca yürütüldü. Örnekler ayrıştırıcı olan % 12 akrilamid jele ulaştınca voltaj 120 volta çıkartılarak 2 saat elektroforez gerçekleştirildi.

3.2.H.5. *Western Blot* Yöntemi

SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılan proteinlerin nitroselüloz membrana transferi için 4 adet 3M *Whatman* kağıdı ve 1 adet nitroselüloz membran, 8 cm eninde ve 10 cm boyunda olacak şekilde kesildi. Nitroselüloz membran öncelikle dH₂O ile ıslatıldıktan sonra Tris-glisin transfer tamponu içinde 5 dk. bekletildi. *Elektroblotting* (Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell From BIO-RAD) aleti içine 2 adet *Whatman* kağıdı, membran, jel ve son olarak tekrar 2 adet *Whatman* kağıdı yerleştirildi. Bu işlemler sırasında hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Protein örneklerinin jel üzerinden nitroselüloz membrana transferi 16-18 saat boyunca 30 volt, 372 mA'de gerçekleştirildi.

Transfer tamamlandıktan sonra jel, *Coomassie brilliant blue* R-250 solüsyonu ile boyanarak protein örneklerinin tamamının jel üzerinden nitroselüloz membrana transfer edildiği anlaşıldı.

C2C12 hücrelerinden saflaştırılan protein örneklerinin eşit miktarda yüklendiğinin kontrol edilebilmesi için nitroselüloz membran *Ponceau S.* solüsyonu ile boyandı ve tüm kuyucuklarda yüklemenin eşit olduğu gözlemlendi.

Hücre kültür ortamından saflaştırılan proteinlerin eşit yüklendiğinin kontrol edilebilmesi amacıyla transfer öncesi jelin 175-220 kDa. civarındaki proteinlerin bulunduğu üst kısmı kesildi ve *Coomassie brilliant blue* R-250 solüsyonu ile boyanarak jel görüntülendi.

Nitroselüloz membran bloklama tamponu ile 1 saat inkübe edilerek birincil antikorun özgül olmayan bağlanmaları önleildi. Daha sonra membran gece boyunca +4°C'de fare anti-hST6Gal1 (1:800, Abnova) birincil antikoruna ile inkübe edildi. Tris-baz ve Tween 20 içeren solüsyonla yıkamalar yapılarak bağlanmayan antikor uzaklaştırıldı.

Bunu takiben membran, birincil antikora karşı hazırlanmış ve horseradish peroksidaz (HRP) ile işaretli anti-fare (1:2000, Sigma) ikincil antikoru ile 1 saat muamele edildi. *ECL-Plus* kemilüminesans işaretleyici kullanılarak bantlar film üzerinde otoradyografik olarak görüntülendi.

3.2.H.6. ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi ve Salgılanan Formunun Densitometrik Analizi

Protein kantitasyonu için densitometrik inceleme programı olan *Scion Image* kullanıldı (www.scioncorp.com). ST6Gal1 protein bantlarının görüntülediği filmler taranarak TIFF formatında kaydedildi. *Scion Image* programı kullanılarak işaretlenen her bandın yüzey alanı hesaplandı. ST6Gal1 enziminin hücre içi ve salgılanan formu transfekte ve kontrol hücreler arasında karşılaştırılmalı olarak analiz edildi.

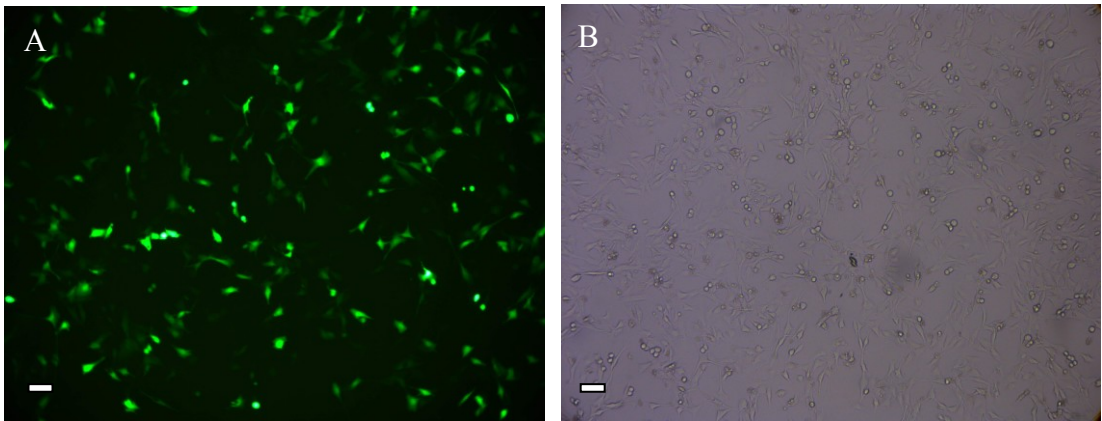
3.2.I. sIBM Hücre Kültür Modelinde GOLPH4 Golgi Belirteç Proteininin İmmünfloresan Boyama ile Analiz Edilmesi

sIBM hücre kültür modelinde GOLPH4 (Golgi fosfoprotein 4) Golgi belirteç proteininin ifade düzeyi immünfloresan boyama tekniği ile araştırıldı. Hücreler transfeksiyondan 24 saat sonra sırasıyla birincil antikor ile 1 saat ve yıkama sonrasında ikincil antikor ile 20 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Birincil antikor olarak 1:500 dilüsyon ile fare anti-A β ₄₀/A β ₄₂ (Sigma) ve 1:400 dilüsyon ile tavşan anti-GOLPH4 (Abcam) kullanıldı. İkincil antikor olarak 1:500 dilüsyon ile anti-tavşan AF 488 ve anti-fare AF 568 (Molecular Probes) kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. C2C12 fare miyoblast hücreleri için uygun transfeksiyon koşullarının bulunması ve transfeksiyon etkinliğinin saptanması

Miyoblast hücre hatları ve primer miyoblast kültürler ile yapılan çalışmalarda, iskelet kas hücrelerine yabancı DNA'nın transfekte edilmesi aşamasında zorluklar yaşanmakta ve transfeksiyon etkinliği %30'larda kalmaktadır. Farklı parametrelerin (antibiyotikli ve antibiyotiksiz hücre kültür ortamı, farklı transfeksiyon reaktifleri: *Fugene HD* (Roche) ve *Fugene 6* (Roche), başlangıç hücre sayıları: 1.5×10^5 / 2.5×10^5 / 1.5×10^5 , farklı plazmid (x1000 ng.)/transfeksiyon reaktif (µl.) oranları: 1:1,5/ 1:2/ 1:3/ 1:4/ 1:6/ 2:8/ 2:10/ 2:12/ 3:10/ 3:12/ 3:14) denenmesi sonucunda aşağıdaki koşulda en yüksek transfeksiyon etkinliğine ulaşıldı. 60 mm. çapındaki petri kapları içerisinde antibiyotiksiz ortamda üretilen 2.5×10^5 hücrede *Fugene HD*'nin, plazmidin *Fugene HD* transfeksiyon reaktifine oranının 3:10 olacak şekilde kullanılması durumunda transfeksiyon etkinliği yaklaşık %40-50 olarak saptandı (Şekil 4.1). C2C12 hücreleri için en uygun transfeksiyon koşullarının bulunabilmesi ve transfeksiyon etkinliğinin saptanabilmesi için yapılan standardizasyon çalışmalarında pCMV3.1-GFP gen ifade vektörü kullanıldı ve hücreler, transfeksiyon sonrası floresan mikroskop altında incelendi.



Şekil 4.1. C2C12 hücrelerinin transfeksiyon etkinliği (pCMV3.1-GFP: 3000ng./*Fugene HD*: 10 µl., 24.saat). **A)** Floresan mikroskopi görüntüsü, **B)** Işık mikroskopi görüntüsü. Çubuk: 0.1 mm.

4.2. sIBM Hücre Kültür Modelinin Oluşturulması

Yapılan çalışmalar sonucunda C2C12 fare miyoblast hücreleri için en etkin transfeksiyon koşulları saptandı. sIBM hücre kültür modelinin oluşturulabilmesi için aynı koşullar kullanılarak, 751-APP/pCMV-SPORT6 gen ifade vektörü C2C12 fare miyoblast hücre kültür sistemine transfekte edildi ve CMV promotörü kontrolünde APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlandı.

4.3. Transfeksiyon Sonrası Canlılık Oranının Tespit Edilmesi

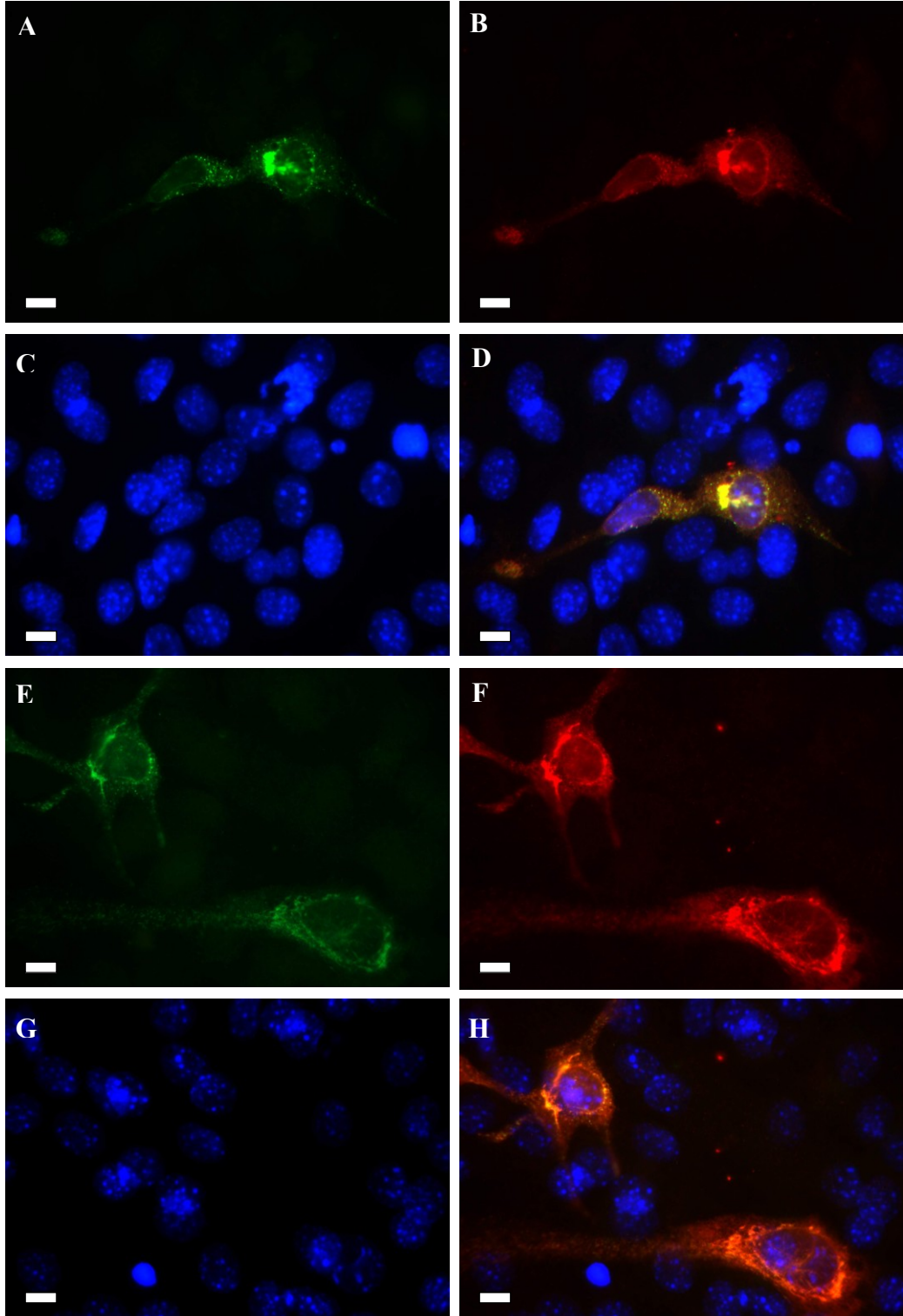
751-APP/pCMV-SPORT6 vektörünün C2C12 fare miyoblast hücre hattına transfekte edilmesi sonrasında *propidium iodide* boyası kullanılarak hücrelerin canlılık oranının yaklaşık olarak %90 olduğu belirlendi. Bununla birlikte, transfekte ölü hücreler DAPI çekirdek boyaması sonrasında sayılmış olup transfeksiyon sonrası hücrelerdeki ~%10 olan ölüm oranının %2-2,5'lik kısmını transfekte hücrelerin oluşturduğu sonucuna varıldı. Saptamış olduğumuz ölüm oranı, transfeksiyon yapılmayan kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında çok düşük bir farklılık gözlemlendi. Bu düşük ölüm oranının, hücre kültür modeli oluşumu ve bu model kullanılarak gerçekleştirilecek olan hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar için göz ardı edilebilir olduğuna karar verildi.

4.4. Hücre Kültür Modelinde sIBM Patolojisinin Gösterilmesi

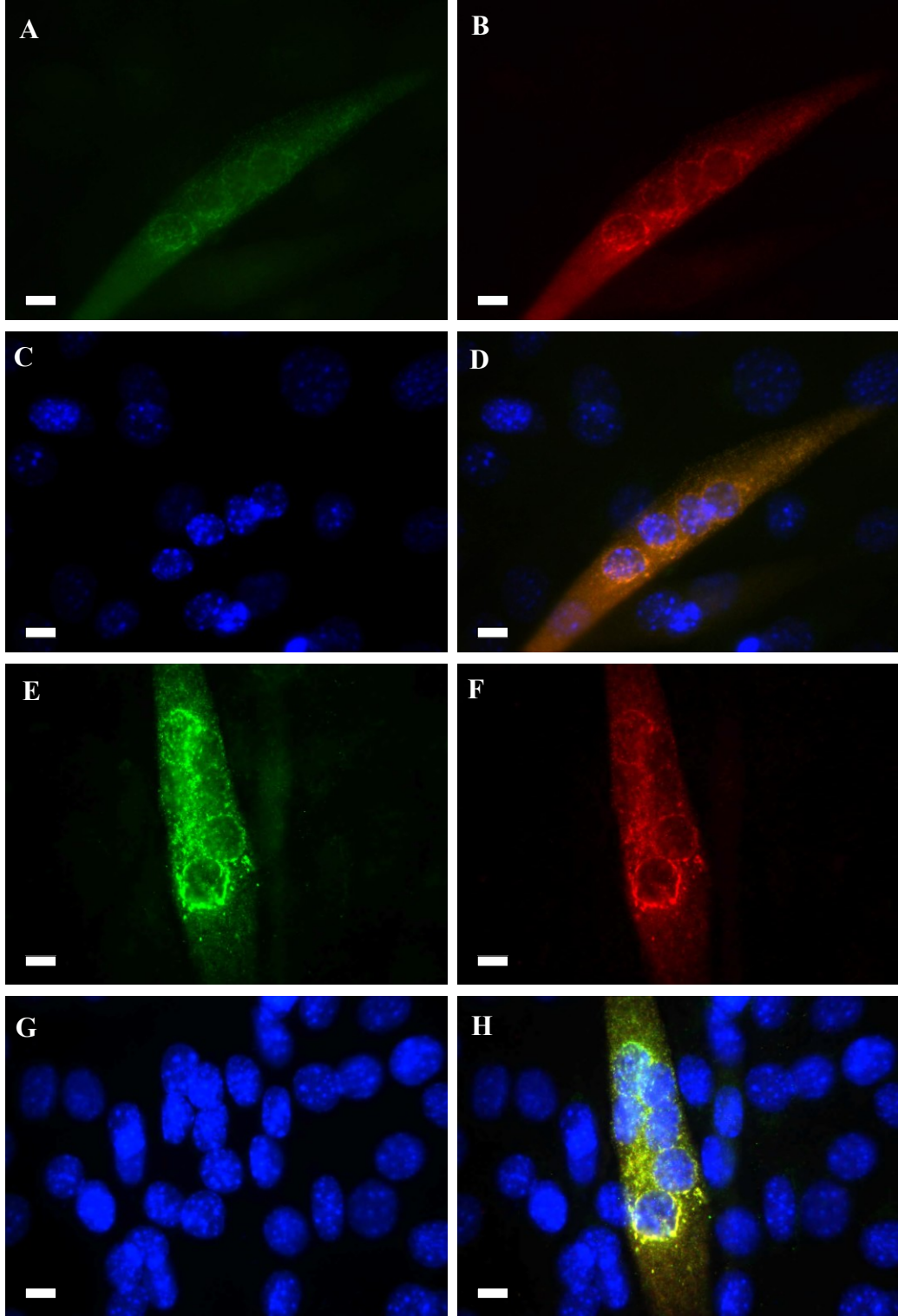
4.4.A. İmmüno Floresan Boyama ile APP ve A β ₄₀/ A β ₄₂ Peptidlerinin Birikiminin Gösterilmesi

sIBM hastalığının özgül özelliklerinden biri APP ve toksik A β başta olmak üzere yüksek düzeyde fosforillenmiş tau, α 1-antikimotripsin, apolipoprotein E, ubikütin, presenilin-1, hücresel prion proteini, vb. kas lifleri içerisinde birikimidir (8-10). 751-APP/pCMV-SPORT6 vektörünün C2C12 fare miyoblast hücre hattına transfekte edilmesi sonrasında amacımız, APP'nin yüksek düzeyde ifadesini sağlayarak sIBM hücre kültür modelini oluşturmaktır. sIBM patolojisinin

oluşumunun kanıtlanması için, hastalığa özgül protein birikimlerinin kültür ortamındaki hücrelerde gözlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, transfeksiyon sonrası C2C12 hücreleri APP ve $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ peptidlerine özgül antikorlar ile boyandı ve bu proteinlerin miyoblastlarda (Şekil 4.2) ve miyotüplerde (Şekil 4.3) birikimi floresan mikroskobu altında görüntülenerek hücre kültür modelinde sIBM patolojisi gözlemlendi. İmmüno floresan boyamalar sonucunda, APP'nin ve kesim ürünü olan toksik $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ peptidlerinin hücre çekirdeği etrafında aynı bölgede yerleşim gösterdikleri saptandı.



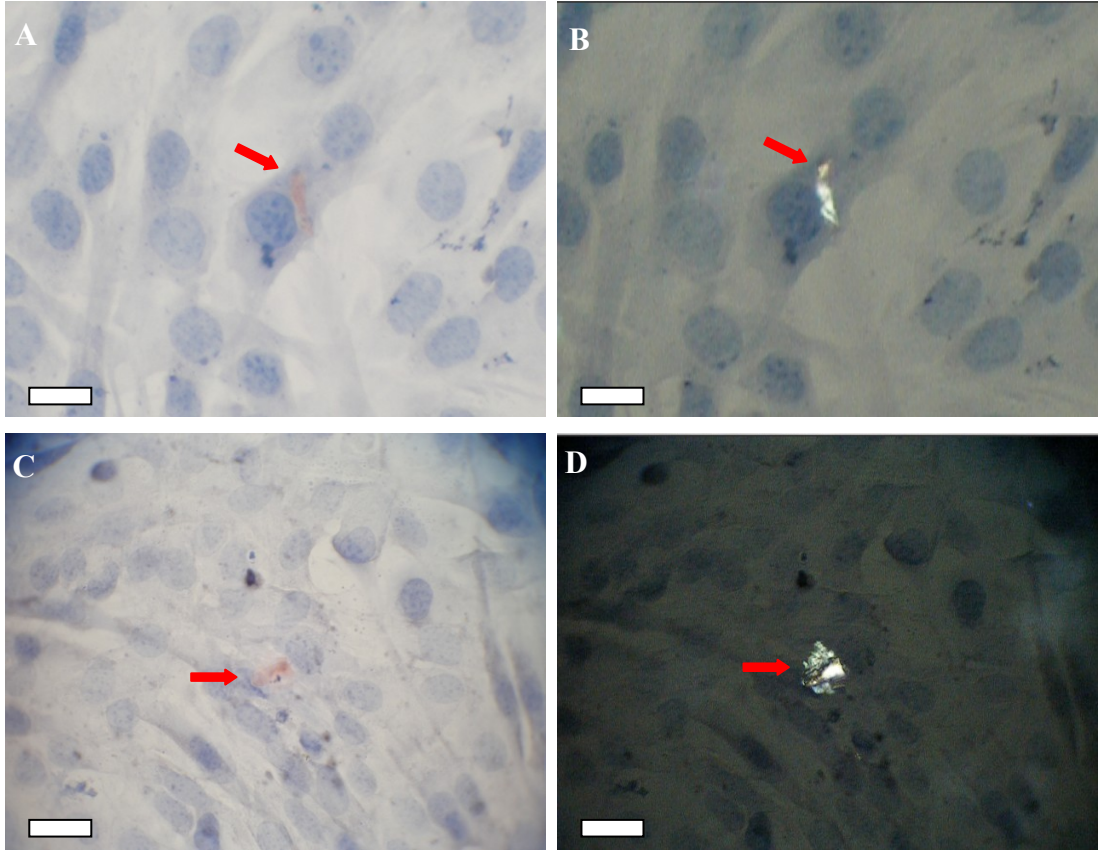
Şekil 4.2. Transfeksiyon sonrasında $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ ve APP peptidlerine özgül antikorlar ile boyanmış olan füzyona girmiş miyoblastların floresan mikroskobu görüntüleri, (751-APP/pCMV-SPORT6: 3000ng./*Fugene HD*: 10 μ l., 48.saat). **A ve E**); Yeşil-FITC: APP peptidi, **B ve F**) Kırmızı-*Texas Red*: toksik $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ peptidleri, **C ve G**) Mavi-DAPI: hücre çekirdekleri, **D ve H**) Çakıştırılmış filtre görüntüleri. Çubuk: 10 μ m.



Şekil 4.3. Transfeksiyon sonrasında $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ ve APP peptidlerine özgül antikorlar ile boyanmış olan çok çekirdekli miyotüplerin floresan mikroskopu görüntüleri, (751-APP/pCMV-SPORT6: 3000ng./*Fugene HD*: 10 μ l., 72.saat). **A ve E**); Yeşil-FITC: APP peptidi, **B ve F**) Kırmızı-*Texas Red*: toksik $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ peptidleri, **C ve G**) Mavi-DAPI: hücre çekirdekleri, **D ve H**) Çakıştırılmış filtre görüntüleri. Çubuk: 10 μ m.

4.4.B. Kongo Kırmızısı Boyaması ile Amiloid Birikiminin Gösterilmesi

sIBM hücre kültür modelindeki hücrelerde çözünmeyen fibriler proteinlerin oluşturduğu amiloid birikimleri araştırıldı. Kongo kırmızısı ile boyama sonrasında kültür ortamındaki hücrelerde sınırlı sayıda (2-3 adet) amiloid birikiminin gözlemlendiği hücre tespit edildi (Şekil 4.4).

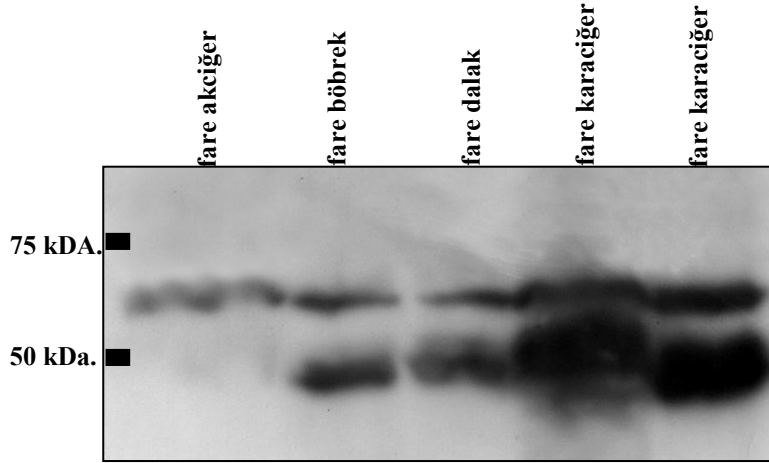


Şekil 4.4. Amiloid birikimi gösteren C2C12 hücrelerinin Kongo Kırmızısı boyaması sonrasındaki görüntüleri. **A ve C)** Işık mikroskobu altında kırmızı renkte amiloid birikimi, **B ve D)** Çift kırınımlı ışık altında parlak yeşil renkte amiloid birikimi; **A ve B)** Çubuk: 50 µm., **C ve D)** Çubuk: 100 µm. (751-APP/pCMV-SPORT6: 3000ng./*Fugene HD*: 10 µl., 72.saat).

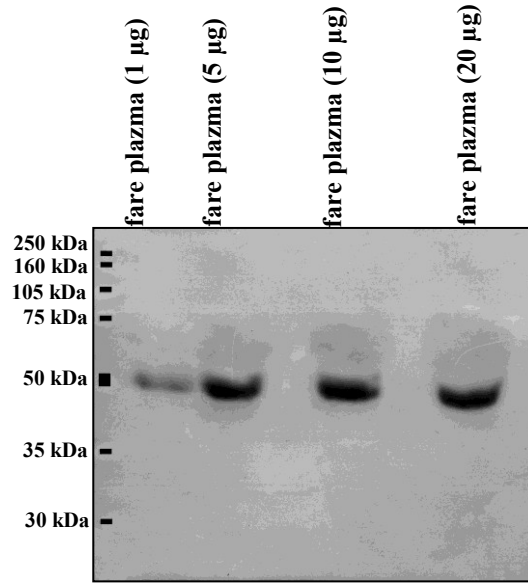
4.5. hST6Gal1 Antikorumun Fare ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi ve Salgılanan Formunu Tanıyıp Tanımadığının Analizi

Ticari olarak sadece fare (C2C12) ve sıçan (L6) miyoblast hücre hatları mevcuttur. Bu nedenle çalışmalarımızda kullanılan insan ST6Gal1 enziminin hücre içi formunu tanıyan antikorum, fare ve sıçan ST6Gal1'i tanıyıp tanımadığı *Western Blot* analizi ile kontrol edildi. Çalışmamız sonucunda, insan ST6Gal1 proteinine karşı oluşturulmuş bu antikorum sıçanda tanıma yapmadığı buna karşılık fare ST6Gal1 enziminin hücre içi ve salgılanan formunu tanıdığı gözlemlendi (Şekil 4.5 ve 4.6). Hipotezimize yönelik olarak sIBM hücre kültür modelinin oluşturulabilmesi için C2C12 fare miyoblast hücre hattının kullanılmasına karar verildi.

ST6Gal1'in 46 kDa. moleküler ağırlıkta olduğu bilinmektedir, ancak enzimin farklı *N* glikolizasyon bölgeleri olduğu için glikozillenmeye bağlı olarak *Western Blot* analizi sonucunda farklı moleküler ağırlıkta proteinler saptanabilecektir. Yapmış olduğumuz *Western Blot* analizleri sonucunda antikorum; ST6Gal1 ifadesinin yüksek olduğu bilinen fare akciğer, böbrek, dalak, karaciğer dokularında yaklaşık olarak 50kDa ve 70 kDa. moleküler ağırlık civarında özgül iki bant verdiği tespit edildi (Şekil 4.5). hST6Gal1 antikorumun, fare ST6Gal1'in hücre içi formunu tanıdığına saptanmasından sonra, enzimin salgılanan formunu tanıyıp tanımadığının kontrol edilebilmesi için fare plazmasından protein izolasyonu yapılarak *Western Blot* analizi gerçekleştirildi ve 50 kDa. civarında özgül bantlar elde edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Fare ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun *Western Blot* analizi (antikor: hST6Gal1, protein örnekleri: 40 µg/ kuyucuk).

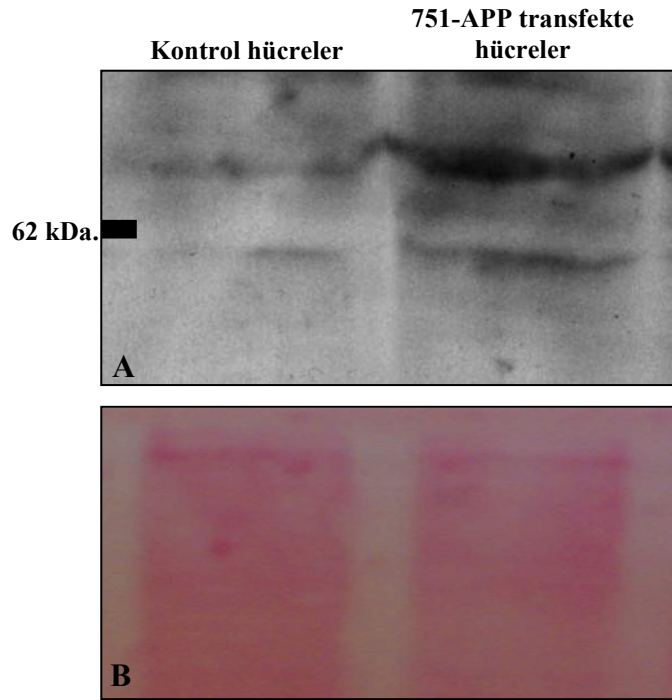


Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki fare plazma proteinlerinin *Western Blot* analizi (antikor: hST6Gal1).

4.6. ST6Gal1 Enziminin Hücre İçi Formunun Analizi

4.6.A. *Western Blot*

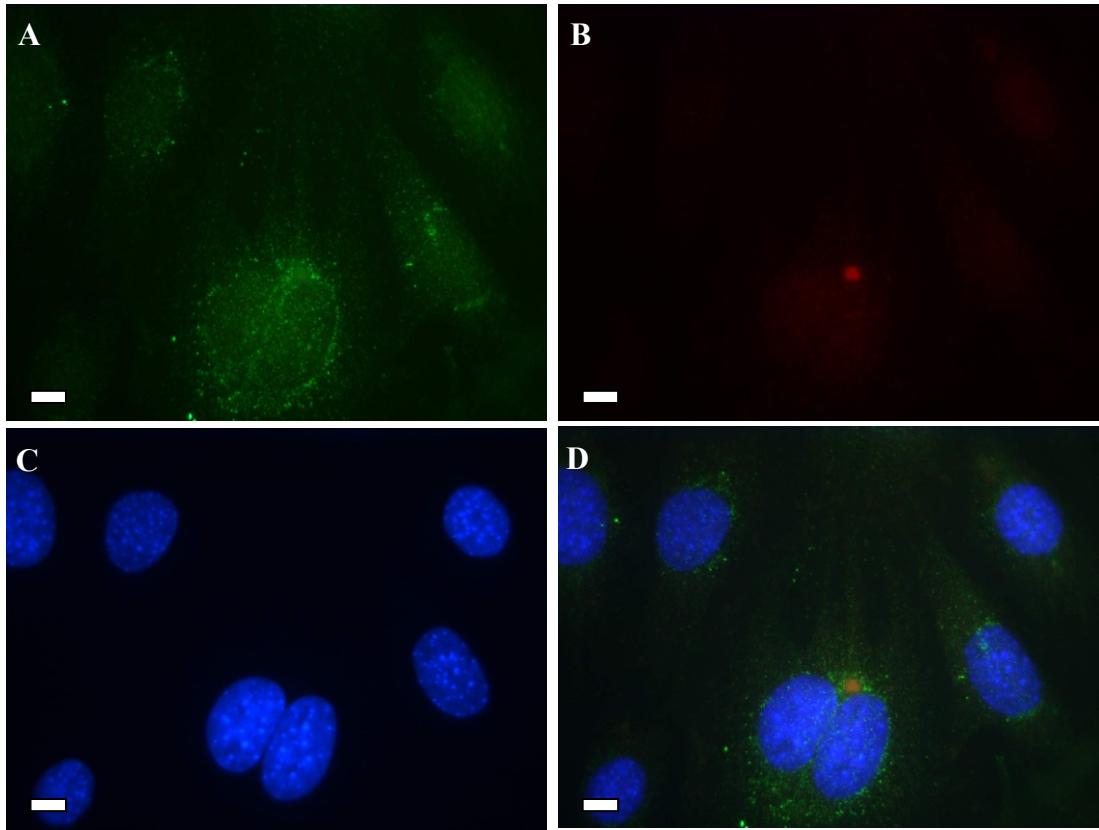
C2C12 fare miyoblast hücre hattında APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlanarak sIBM hücre kültür modeli oluşturuldu ve bu modelde ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun ifadesinin kontrol hücrelere göre artmış olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.7). 751-APP transfeksiyonunu takiben 24. saatte yapılan *Western Blot* analizi sonuçları, *Scion Image* programı ile densitometrik olarak değerlendirilmiştir. APP'nin yüksek düzeyde ifadesinin sağlandığı C2C12 hücrelerinde, ST6Gal1 enziminin 70 kDa. civarındaki hücre içi formunun kontrol hücrelere göre 1.3 kat arttığı saptandı.



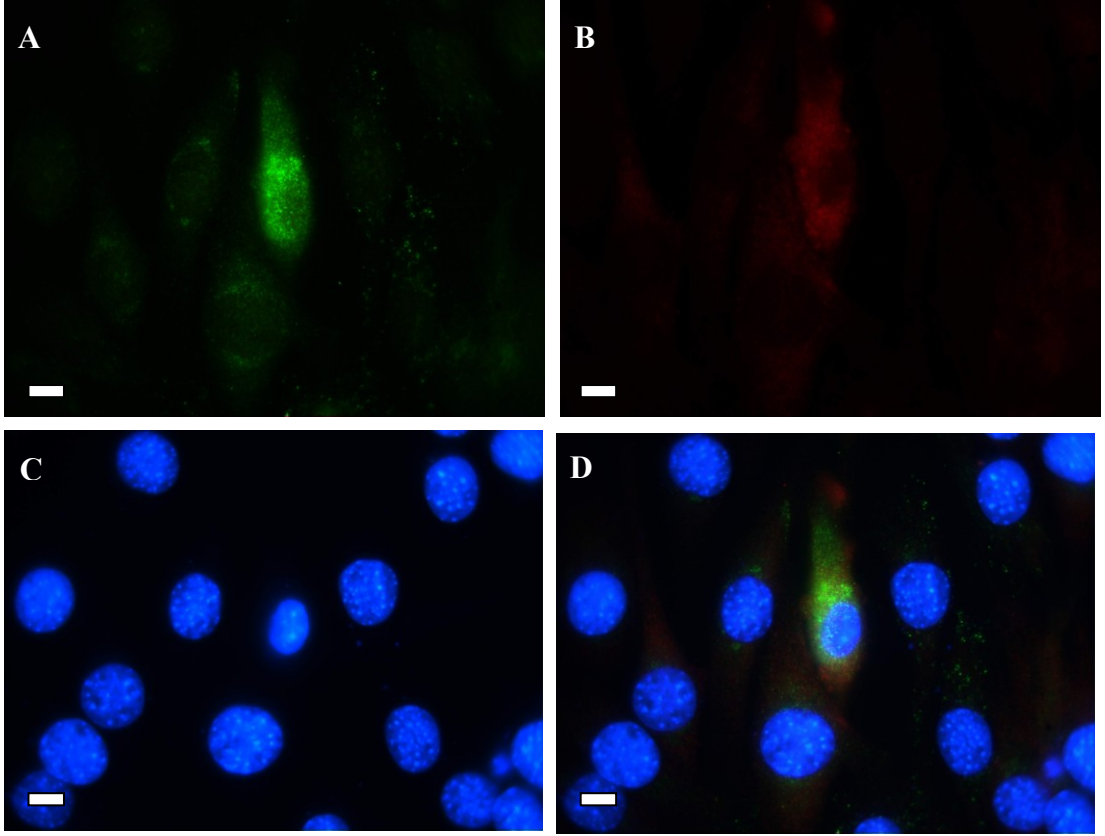
Şekil 4.7. sIBM hücre kültür modelinde ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun *Western Blot* analizi (antikor: hST6Gal1). **A)** *Western Blot* görüntüsü, **B)** Protein örneklerinin eşit yüklendiğinin kontrol edilebilmesi için transfer sonrası membranın *Ponceau S.* boyanması sonucunda elde edilen görüntüsü.

4.6.B. İmmü Floresan Boyama

Kontrol hücreler ile karşılaştırmalı olarak yapılan immü floresan boyamalar sonucunda, *Western Blot* analizi ile uyumlu sonuçlar elde edildi. Transfeksiyon yapılmayan kontrol hücrelerde ST6Gal1 enziminin ifadesinin çok düşük olduğu gözlenirken (Şekil 4.8), APP'nin yüksek derecede ifadesinin gözleendiği hücrelerde, ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun da ifadesinin artış gösterdiği sonucuna varıldı (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. ST6Gal1 ve APP peptidlerine özgül antikorlar ile boyanan kontrol C2C12 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüleri. **A)** Yeşil-FITC: APP peptidi, **B)** Kırmızı-Texas Red: ST6Gal1, **C)** Mavi-DAPI: hücre çekirdekleri, **D)** Çakıştırılmış filtre görüntüleri. Çubuk: 10 µm. (751-APP/pCMV-SPORT6: 3000ng./Fugene HD: 10 µl., 24.saat).

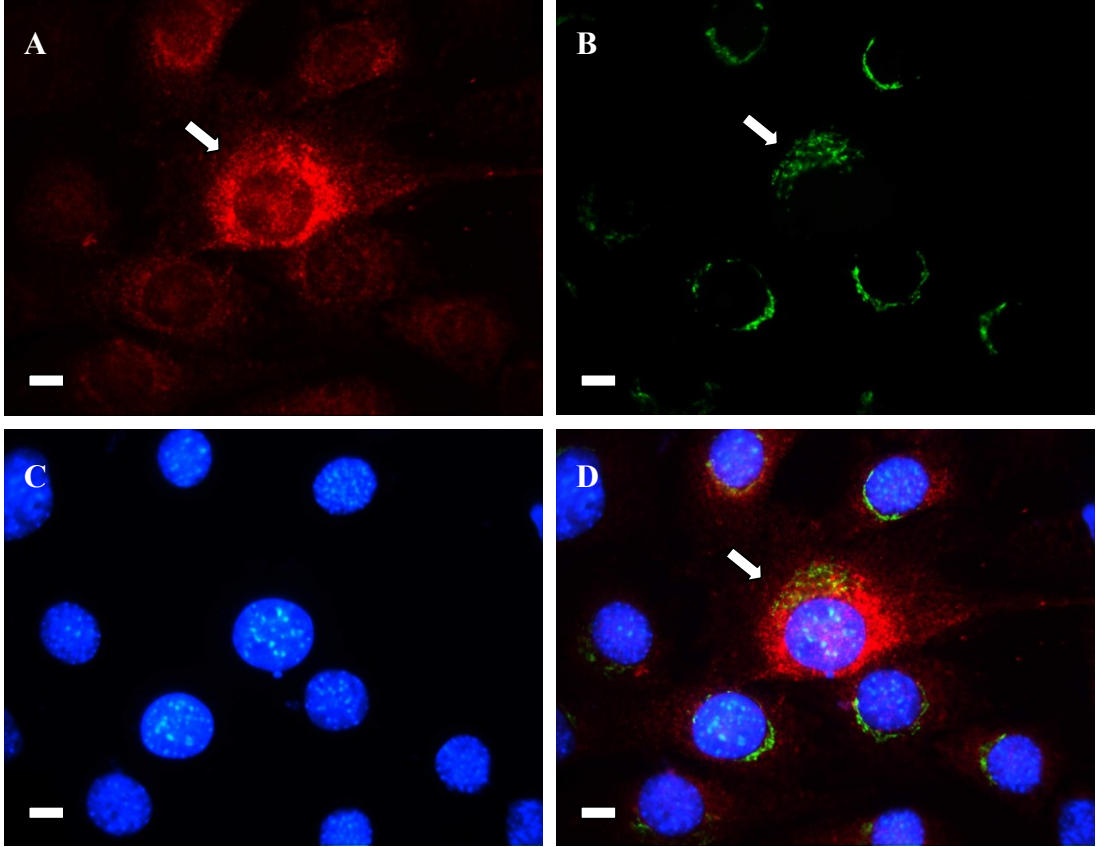


Şekil 4.9. ST6Gal1 ve APP peptidlerine özgül antikorlar ile boyanan 751-APP transfekte edilmiş C2C12 hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüleri. **A)** Yeşil-FITC: APP peptidi, **B)** Kırmızı-Texas Red: ST6Gal1, **C)** Mavi-DAPI: hücre çekirdekleri, **D)** Çakıştırılmış filtre görüntüleri. Çubuk: 10 μm . (751-APP/pCMV-SPORT6: 3000ng./Fugene HD: 10 μl ., 24.saat).

4.7. ST6Gal1 Enziminin Salgılanan Formunun Analizi

C2C12 fare miyoblast hücre hattında APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlanarak sIBM hücre kültür modeli oluşturuldu ve kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında hücrelerden salgılanan ST6Gal1 seviyesinin artış gösterdiği sonucuna varıldı.

Transfeksiyon sonrası dört farklı zaman aralığında (12, 24, 48 ve 72. saat) toplanmış olan hücre kültür ortamında ST6Gal1 enziminin salgılanma seviyesi *Western Blot* yöntemi ile araştırıldı (Şekil 4.10). *Scion Image* programı ile yapılan densitometrik analizler sonucunda özellikle 48 ve 72. saat aralıklarında, APP'nin yüksek derecede ifadesinin sağlandığı hücrelerden salgılanan ST6Gal1 seviyesinin kontrol hücrelere kıyasla artmış olduğu gözlemlendi. Kontrol hücrelerinde farklı zaman aralıklarında ST6Gal1 enziminin salgılanmasında fark gözlenmezken, APP'nin transfekte edildiği hücrelerde saptanmış olan salgılanma artışının hücre kültür ortamında miyotüp oluşumunun gözlenmeye başladığı 24-48. saat aralıklarında başladığı sonucuna ulaşıldı. ST6Gal1 enziminin salgılanmasındaki artışın, transfeksiyon sonrası 48. saatte 1.3 kat, 72. saatte ise 1.7 kat olduğu saptandı.



Şekil 4.11. 751-APP transfekte C2C12 hücresinin GOLPH4 ve $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ peptidlerine özgül antikorlar ile boyanması sonrasında floresan mikroskobu görüntüleri. **A)** Kırmızı-*Texas Red*: toksik $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ peptidleri, **B)** Yeşil-FITC: GOLPH4 Golgi belirteç proteini, **C)** Mavi-DAPI: hücre çekirdekleri, **D)** Çakıştırılmış filtre görüntüleri. Çubuk: 10 μm . (751-APP/pCMV-SPORT6: 3000ng./*Fugene HD*: 10 μl ., 24.saat). *

*Şekil 4.11'de ok işareti ile gösterilmeyen hücrelerde APP'nin yüksek düzeyde ifadesi gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

sIBM, klinik olarak yaşla beraber ilerleyen, yüksek derecede kas güçsüzlüğünün ortaya çıkmasıyla karakterize, ileri dönemde kas atrofisi ve nekrozun saptandığı, 50 yaş üzerindeki bireylerde ve özellikle erkeklerde en sık karşılaşılan dejeneratif kas hastalığıdır (9,13,80). Çok etmenli bir hastalık olan sIBM'in etiyolojisi ve patogenezi bilinmemekle beraber; genetik faktörler, hücrenel yaşlanma, ve çevresel etkenler gibi farklı mekanizmaların etkisinde ortaya çıktığı düşünülmektedir (13). sIBM kas biyopsilerinde inflamatuvar etkenlerin varlığı bilinmektedir. Ancak diğer inflamatuvar miyopatilerden (Polimiyozit, Dermatomiyozit, vb.) farklı olarak bu hastalık için etkin bir tedavi yaklaşımı şu ana kadar geliştirilememiştir (22,47).

hIBM hastalığının çoğu patolojik özelliği sIBM ile benzer olmasına karşılık, hIBM'de hastalığın klinik bulguları daha erken yaşlarda ortaya çıkmakta ve bu hastaların iskelet kaslarında lenfositik inflamasyon gözlenmemektedir (12). hIBM'den sorumlu olduğu gösterilen tek gen, siyalik asit sentezinin ilk iki basamağında görevli olan enzimi kodlayan GNE genidir (26). hIBM'de GNE geninde görülen mutasyonlar sonucu siyalik asit biyosentezinin azalmış olduğu ve bu sonucun hastalığın patogenezinde önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir (26). sIBM hastalığında ise siyalik asit biyosentezi doğru şekilde gerçekleştiğinden, siyalik asit biyolojisindeki herhangi bir değişikliğin kas dejenerasyon tablosunun oluşum basamaklarında rolü olup olmadığı araştırılmamıştır.

sIBM hastalığının en belirgin ve en önemli özelliği, merkezi sinir sistemi dışında toksik A β peptidinin patolojik birikiminin gözleendiği tek hastalık olmasıdır (48). Kas liflerinde A β , 751 aminoasitten oluşan ve yüksek düzeyde ifadesi gözlenen APP'nin endoproteolitik olarak kesilmesi sonucunda oluşur (76). IBM hastalığında, kas dejenerasyon yolağının bilinen başlangıç noktası APP'nin yüksek düzeyde ifade edilmesinin nedenleri henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Sağlıklı hücrelerde APP, sırasıyla α ve γ sekretazlar tarafından NH₂ ve COOH uçlarından işleme yolunu seçerken (45), sIBM'de ilk kesim β sekretaz ailesine dahil olan BACE1 tarafından

gerçekleşir (46,76). BACE1 enzimi, toksik A β peptidinin temel üreticisidir (76).

2001 yılında BACE1 enziminin ST6Gal1'in proteolitik kesiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (41). ST6Gal1 enzimi, BACE1 enzimi tarafından proteolitik kesime uğrayarak katalitik bölgeleri ile birlikte çözünür formda vücut sıvılarına salgılanır (57,58). Salgılanan ST6Gal1'in tam olarak işlevi ve substratları bilinmemekle birlikte, hücre dışına salgılanan çözünür glikoproteinlere α -2,6 bağı ile siyalik asit birimleri eklediği düşünülmekte, ayrıca çeşitli immünolojik reaksiyonları düzenlemek amacıyla akut faz hepatik reaksiyonlarda hücre dışına salgılanmasının arttığı bilinmektedir (21,24,27,70).

IBM hastalığında ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun ifade düzeyi ve salgılanan formunun hücrelerden salgılanma seviyesinin değişip değişmediği ile ilgili bir çalışma şu ana kadar yapılmamıştır. Bu nedenle tez çalışmamız kapsamında, dejeneratif bir kas hastalığı olan sIBM'in hücre kültür modelinin oluşturulması ve bu modeli kullanarak glikoproteinlere α -2,6 bağı ile siyalik asit birimlerinin eklenmesinden sorumlu ST6Gal1 enziminin sIBM patogenezindeki olası rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Hipotezimize yönelik olarak tez çalışmamızın ilk aşamasında, Amiloid β plaklarının oluşumu ile karakterize dejeneratif bir kas hastalığı olan sIBM'in hücre kültür modelinin oluşturulması gerçekleştirilmiştir. İn vitro ortamda, kas liflerine APP gen transferi yapıldığında, IBM tipi patolojik birikimlerin kolayca gözlenebilmesi nedeniyle, sIBM, hücre kültür modeli oluşturulabilecek nadir hastalıklardan biridir (3). Alzheimer ve sIBM hastalıklarına yönelik in vitro model oluşturma çalışmalarında heterolog sistemler kullanılmaktadır (16,40,44). Bu nedenle, tez çalışmamızda sIBM hücre kültür modelinin oluşturulabilmesi için insan 751-APP cDNA'sını içeren pCMV-SPORT6 gen ifade vektörü C2C12 fare miyoblast hücre kültür sistemine transfekte edilmiş ve CMV promotörü kontrolünde APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlanmıştır. sIBM kas liflerine özgül proteinlerin (APP ve A β ₄₀/A β ₄₂) immünfloresan boyamalarla birikiminin saptanmasıyla modelin oluşturulduğu kanıtlanmıştır (Şekil 4.2 ve 4.3). Bununla birlikte geliştirdiğimiz hücre

kültür modelinde, APP transfeksiyonu sonrası 72. saatte Kongo Kırmızısı boyaması ile amiloid birikimlerinin gözlenmesi sIBM hücre kültür modelinin oluşumu yönünde önemli bir bulgudur (Şekil 4.4).

Günümüze kadar sIBM patogenezi ve kas dejenerasyon mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olarak yapılan çalışmalar, insan APP'sinin yüksek düzeyde ifadesinin sağlandığı transgenik fare modellerinde ve viral vektörlerle APP gen transferinin yapıldığı primer miyoblast hücre kültürlerinde gerçekleştirilmiştir (2,3,68,69). Toksik A β birikiminin patolojik yolaktaki etkilerini en iyi şekilde anlayabileceğimiz modeller tartışmasız transgenik hayvan modelleridir. IBM'in yaşa bağlı olarak ortaya çıkan ve yavaş klinik ilerleme gösteren dejeneratif bir hastalık olması nedeniyle, hastalıkta gözlenen miyopatolojik ve fenotip farklılıklar transgenik hayvan modellerinde 10 aydan fazla sürede ortaya çıkmaktadır (68). Bu nedenle, transgenik hayvan çalışmaları çok uzun bir süreç, deneyim ve alt yapı gerektirmektedir. Bunun yanında yapısı çok karmaşık olan in vivo sistem çeşitli çevresel ve endojen etkenlerin etkisinde olduğundan bulguların değerlendirilmesi güçleşmektedir. Hücre kültür modelleri ise, canlı sistemi birebir taklit etmemelerine rağmen in vivo sisteme göre daha kolay çalışılabilir ve analiz edilebilir niteliktedir (4,50). Ancak, primer miyoblast hücrelerinin kullanılması ile oluşturulan hücre kültür modellerinde, fibroblast hücre popülasyonunun kültür ortamında bulunması, primer miyoblast hücrelerinin ilerleyen pasajlarda bölünme özelliklerini yitirmeleri ve farklılaşmalarının hücre hatlarına kıyasla uzun sürmesi nedeniyle primer miyoblastların in vitro model oluşumunda kullanımları sınırlı olmaktadır.

Tez çalışmamız kapsamında sIBM hücre kültür modelinin oluşturulması C2C12 fare miyoblast hücre hattında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda sIBM hücre kültür modelinde, kontrole göre salgılanan ST6Gal1 enziminde gözlenen farklılıkların yalnızca miyoblast hücrelerinden kaynaklandığının anlaşılabilmesi ancak fibroblastlardan tamamen arınmış hücrelerin kullanılmasıyla mümkün olacaktır. Bu nedenle saf miyoblastlardan oluşan, hızla farklılaşabilen ve iskelet kasına özgül proteinleri ifade edebilme yeteneğine sahip olan C2C12 hücreleri kullanılmıştır (59). C2C12 hücre hatlarında APP'nin yüksek düzeyde ifadesi için ilk

defa bu tez kapsamında, viral vektörlere kıyasla daha düşük toksik etki gösteren, kolay ve güvenli çalışılabilir gen aktarım metodu olan, lipozomal transfeksiyon kullanılmıştır. C2C12 hücre hatları kullanarak oluşturduğumuz sIBM hücre kültür modeli, deneysel olarak kolay çalışılabilir olmasının yanısıra, IBM tipi patolojik birikimlerin kolayca gözlenebildiği bir model özelliğini taşımaktadır. Tez çalışmamız kapsamında oluşturduğumuz bu model, sIBM patogenezi açıklamaya yönelik yapılacak araştırmalar için bir alt yapı hazırlayacaktır.

Tez çalışmamızın ikinci aşamasında, oluşturduğumuz sIBM hücre kültür modeli kullanılarak glikoproteinlere α -2,6 bağı ile siyalik asit birimlerinin eklenmesinden sorumlu ST6Gal1 enziminin patogenezi olası rolü araştırılmıştır. Bu doğrultuda, sIBM hücre kültür modelinde ST6Gal1'in hücre içi formunun ifade düzeyi ve hücre dışına salgılanma seviyesinin değişip değişmediği araştırılmıştır. Bu amaçla, sIBM patolojisinin gözlemlendiği kültür ortamındaki hücrelerden ve hücre kültür ortamından protein izolasyonu yapılarak, *Western Blot* yöntemi ile ST6Gal1'in hücre içi ve salgılanan formları kontrol hücreler ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Çalışmamız sonucunda APP'nin yüksek düzeyde ifadesinin sağlandığı C2C12 hücrelerinde, ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun ifade düzeyinin (Şekil 4.7 ve 4.9) ve ST6Gal1 salgılanma seviyesinin (Şekil 4.10) arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Tez çalışmamız sonucunda ST6Gal1 ifadesinde saptanmış olan bu artışın, hücrelerde yüksek düzeyde ifade edilen APP'nin α -2,6 siyalasyon hızını arttırdığını ve translasyon sonrası değişikliği tamamlanmış olan APP'nin, BACE1 enzimi tarafından işleme hızının artmasıyla, hücre içerisinde daha fazla miktarda toksik A β peptidi birikimine neden olduğunu düşünmekteyiz. Alzheimer hastalığına yönelik çalışmalar yapan bir grubun Neuro2a hücrelerinde APP'nin α -2,6 siyalasyonunun artışına bağlı olarak işlenmesinin arttığını saptadığı çalışma bu düşüncemizi desteklemektedir (53).

sIBM hastalığında; bilinmeyen bir nedenle hücre içindeki genel transkripsiyon mekanizmasının etkin duruma geçtiği ve hücre içindeki yıkım

mekanizmalarının işlev göremez durumda olduğu bilinmektedir (44,75,78). APP'nin artmasıyla ortaya çıkan patolojik tabloya baktığımızda, hücre kültür modelinde ST6Gal1 ifade düzeyindeki saptadığımız artışın APP artışına özgül olup olmadığını test etmek için Golgi zarında yerleşik olarak bulunan GOLPH4 Golgi belirteç proteininin ifadesinin değişip değişmediği analiz edilmiştir. Yapısal bir protein olması nedeniyle bu proteinin ifadesinde herhangi bir artış beklenmemesine rağmen, çalışmamız sonucunda GOLPH4'ün ifadesinin arttığı saptanmıştır. Bu durumda ST6Gal1 artışını patolojik tabloya bağlı olarak görülen bir artış olarak değerlendirmekle birlikte bu artışın sIBM patogenezinin katılan bir işlevi olabileceğini de gözardı etmemek gerekir.

Tez çalışmamızda saptadığımız GOLPH4 Golgi belirteç proteininin ifadesinin artışı, APP'nin yüksek düzeyde ifade edildiği hücrelerde ER stresinin varlığını öngörmektedir. sIBM hastalığında hatalı katlanmış ve katlanamamış proteinlerin hücre içinde biriktiği, bu birikimle beraber ER homeostazının bozulmasıyla hücrede ER stresinin oluştuğu bilinmektedir (14,28,30). Hücreler, ER stresinden korunmak için katlanmamış protein cevabı (*UPR-unfolded protein response*) yolağını etkinleştirirler. Ancak UPR ile ifade düzeyi artan şaperonların hücresel yaşlanma nedeniyle etkinleştirilmelerinin yetersiz kaldığı bilinmektedir. Hücresel UPR cevabının başlamasına her ne kadar ER'de birikmiş olan proteinler sebep olsa da, UPR sinyal yolağının devreye geçebilmesi için hücre çekirdeği ve Golgi organelinde işlev gören bir çok proteine ihtiyaç vardır. Bu nedenle, bu patolojik süreçte ER stresine bağlı olarak Golgi organeline özgül GOLPH4 vb. birçok proteinin ifade düzeylerinin artması beklenebilir. Ayrıca, sIBM patolojisinde ifade düzeyi artmış olan APP ve bir çok farklı proteinin Golgi'de translasyon sonrası değişime uğradığı düşünülecek olursa, çalışmamızda Golgi'nin morfolojisinde gözlemiş olduğumuz değişimin, artmış organel işlevine bağlı olduğu düşünülebilir (Şekil 4.11).

Kitazume ve diğ. (41) yapmış oldukları çalışmada, BACE1'in iki substratı olan ST6Gal1 ve APPsw aynı anda COS-7 hücrelerinde yüksek düzeyde ifade ettirildiklerinde, ST6Gal1 salgılanmasının azaldığı sonucuna ulaşmışlardır. Enzimin

öncelikli substrat olarak ifade düzeyi artmış olan APPsw'yi seçebileceği, bu nedenle ST6Gal1'in kesilememesine bağlı olarak hücre dışına salgılanma seviyesinin azalmış olabileceği önerilmiştir. Fakat bu çalışmada BACE1 enziminin substratlarından biri olan ve yüksek düzeyde ifadesi sağlanan APP, kalıtsal Alzheimer hastalığına neden olan mutasyonu içermektedir. Bu mutasyonun enzimin substratına karşı olan ilginliğini yabani tip APP'ye göre yaklaşık 100 kat arttırdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (66,73). Bunun yanında, sIBM patogeneğinde APP ve Apolipoprotein E gibi kalıtsal Alzheimer ile ilişkili hiç bir gene bağlantı gösterilememiştir (11,29,36). Ayrıca, hIBM hastalarında APP geninde herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir (11). Yapmış olduğumuz çalışmamızda C2C12 hücrelerinde BACE1 enziminin her iki substratını da (APP ve ST6Gal1) fizyolojik ortamında bulması ve BACE1'in substratlarından olan APP'ye olan ilginliğini arttıracak bilinen bir nedenin olmaması durumunda enzimin her ikisini de benzer etkinlikle kesmesi ve buna bağlı olarak da salgılanan ST6Gal1 miktarının artması beklenen bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

Hepatik sistemde inflamasyon durumunda; serum siyalik asit seviyesinin artışı ile birlikte akut faz reaktanı olarak ST6Gal1 ifade düzeyinin ve salgılanmasının arttığı bilinmektedir (21,24,27). Günümüze kadar, salgılanan ST6Gal1'in tam olarak işlevi ve substratları bilinmemekle birlikte, hücre dışına salgılanan çözünür glikoproteinlerin α -2,6 siyalasyonunu sağladığı saptanmıştır (70). sIBM patolojik fenotipinde vakuol içermeyen kas liflerine farklı derecelerde CD8+ sitotoksik T hücrelerinin infiltre olduğu bilinmektedir (13,47). Bu bulgular bize, oluşturduğumuz sIBM hücre kültür modelinde ST6Gal1 salgılanma seviyesinde saptanan artışın sIBM patolojik yolağında gözlenen inflamasyon tablosu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. sIBM hastalığının patolojik ve biyokimyasal özelliklerinin genellikle hIBM ile benzer olmasına karşılık, iki form arasında görülen en önemli farklılık hIBM'de inflamasyon bulgularının olmamasıdır (5). Bu hastalarda ST6Gal1 ifade düzeyi ve buna bağlı olarak salgılanması artmış olsa bile, GNE genindeki mutasyonlara bağlı olarak siyalik asit biyosentezi tam olarak gerçekleşmediğinden inflamasyonun gözlenememesi beklenen bir sonuç olabilir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar sIBM patogenezinde gözlenen inflamasyon ve dejenerasyon süreçlerinin önemini ortaya çıkarmaya yönelik olsa da, bu iki patolojik özelliğin birbirleri ile ilişkisi ve patolojik yolaktaki sıraları halen bilinmemektedir.

Dalakas ve diğ. (23) 2006 yılında, inflamasyonun sIBM patolojik tablosunun başlangıç evrelerinde yer aldığını, kas lifi dejenerasyonu ve protein birikimlerinin inflamasyon sonrasında meydana geldiğini öne sürmüşlerdir. Buna göre, interlökin 1 (IL 1), tümör nekroz faktör alfa (TNF α) ve interferon gama (IFN γ) gibi proinflamatuvar sitokinlerin ifade düzeylerinin artmasının, sIBM patolojik yolağında, APP ifadesinin artışından daha erken gözlenen patolojik bir durum olduğu ve bunun sırasıyla inflamasyon ve dejeneratif unsurları beraberinde getirdiği düşünülmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin miyotüplerde MHC sınıf 1 ifade düzeyini arttırıcı bir etken olduğu bilinmektedir (49). MHC sınıf 1 ifade düzeyinin artmasının ER üzerinde stres etkisi oluşturarak, NF κ B ifade düzeyini arttırdığı, bunun da MHC sınıf 1 antijeninin hücre zarına yerleşimiyle T hücre cevabını ortaya çıkardığı düşünülmektedir (51,52). Proinflamatuvar sitokinlerden IL 1'in ve NF κ B'nin, APP'nin ifade seviyesini ve buna bağılı olarak toksik A β oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (31,33,34). Toksik A β birikiminin de sırasıyla ER stresi ve proteozom işlevinin bozulmasına, bunun da proteinlerin hücre içinde birikmesine neden olduğu düşünülmektedir (54).

Dalakas ve diğ. (23)'nin hipotezlerine karşılık olarak, Askanas ve Engel (15), APP'nin yüksek ifade düzeyine ve hatalı işlenmesine bağılı olarak oluşan toksik A β birikiminin, sIBM patolojik yolağının inflamasyondan önceki basamaklarında yer aldığını ve bunun sonucu olarak, ER stresi, oksidatif stres ve hücre içinde biriken proteinlere yanıt olarak T hücre cevabının ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir (65). İnflamasyon ve kas dejenerasyonu arasındaki bu ilişki, sIBM iskelet kasında sitokinlerin, kemokinlerin, APP'nin, tau ve ubikütinlerin mRNA seviyelerindeki artışın eş zamanlı olduğunun saptanmasıyla desteklenmiştir (65). Ancak, sIBM'de proinflamatuvar sitokinlerin artışlarının ve toksik A β birikiminin temel nedeni hala bilinmemektedir (32,62).

Tez çalışmamız sonucunda APP'nin yüksek ifade düzeyine bağlı olarak ST6Gal1 ifadesinin ve salgılanmasının arttığı saptanmıştır. Yapılacak olan çalışmalarla ST6Gal1 salgılanma artışının proinflamatuvar sitokinlerin ifade düzeyini arttırarak inflamasyonu tetiklediği yönünde bir ipucu elde edilebilirse, bu sonuçlar Askanas ve Engel'in hipotezini (15) destekleyecek yönde bir bulgu olacak ve sIBM patolojik yolağında gözlenen inflamasyonun kas dejenerasyon sürecinde bir cevap olarak, APP'nin yüksek düzeyde ifade olmasından sonraki basamaklarda ortaya çıktığı düşünülebilecektir.

sIBM'de kas lifi dejenerasyonunun nedenlerinin aydınlatılabilmesi, dejenerasyon yolağını başlatan ve bu yolda yer alan faktörlerin tanımlanması ve bunların dejenerasyon mekanizmasındaki rollerinin çok iyi aydınlatılması ile mümkün olacaktır. sIBM hastalığı kas liflerinde APP'nin yüksek düzeyde ifadesinin sağlanması ile hücre kültür modeli oluşturulabilecek nadir hastalıklardan birisidir (3). Oluşturmuş olduğumuz sIBM hücre kültür modeli, elde etmiş olduğumuz veriler üzerine tez çalışmasını takip eden, patogenezele birlikte kas dejenerasyon mekanizmasını da açıklamaya yönelik yapılacak olan araştırmalar ve patolojik yolda görev alan proteinlerin işlevlerini ortaya koymak için yapılacak analizler için bir alt yapı hazırlamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 751-APP/pCMV-SPORT6 gen ifade vektörünün C2C12 fare miyoblast hücre kültür sistemine transfekte edilerek, CMV promotörü kontrolünde APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlanarak sIBM hücre kültür modeli oluşturulmuş ve sIBM patogenezini aydınlatmaya yönelik çalışmalar için kullanılabilir bir model haline getirilmiştir.
- sIBM kas liflerinde biriken özgül proteinlerin (APP, A β ₄₀, A β ₄₂) immünfloresan boyama teknikleri ile gösterilmesi ile hücre kültür ortamında sIBM patolojisinin oluşumu gösterilmiştir. Ayrıca, sIBM hücre kültür modelindeki hücrelerde Kongo kırmızısı boyaması ile çözünmeyen fibriler yapıdaki amiloid birikimleri saptanmıştır.
- C2C12 fare miyoblast hücre hattında APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlanarak oluşturulan sIBM hücre kültür modelinde, ST6Gal1 enziminin hücre içi formunun ifade düzeyinin kontrol hücrelere göre arttığı sonucuna varılmıştır.
- C2C12 fare miyoblast hücre hattında APP'nin yüksek düzeyde ifadesi sağlanarak oluşturulan sIBM hücre kültür modelinde, kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında hücrelerden salgılanan ST6Gal1 seviyesinin artış gösterdiği sonucuna varılmıştır.
- sIBM hücre kültür modelinde, APP protein ifade seviyesinin artış gösterdiği hücrelerde GOLPH4 Golgi belirteç proteinin de ifadesinin arttığı sonucuna varılmıştır.
- sIBM hücre kültür modelinde ST6Gal1 salgılanma seviyesinin artışına paralel olarak proinflamatuvar sitokinlerin ifade düzeylerinin araştırılması, ST6Gal1 salgılanma artışının inflamasyonu tetikleyip tetiklemediği yönünde önemli bulgular elde edilmesine katkıda bulunacaktır.

- hIBM hastalığında, ST6Gal1 ifade düzeyi ve buna bağlı olarak enzimin salgılanma miktarında değişiklik olup olmadığı araştırılmalıdır. Bu çalışma ile hIBM’de gözlenmeyip sIBM’de gözlenen inflamasyonun nedenleri ile ilgili bulgular elde edilebilir.
- Tez çalışması kapsamında oluşturduğumuz sIBM hücre kültür modeli tez çalışmasını takip eden diğer araştırmalar için bir alt yapı hazırlamıştır. Ancak, ilerleyen dönemde sIBM kas dejenerasyon mekanizmasına yönelik olarak yapılacak çalışmalar için tüm hücrelerin APP’yi yüksek düzeyde ifade ettiği *inducible* (uyarılabilir) hücre hatlarının oluşturulması planlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Askanas, V ve Engel, W.K. (1993). New advances in inclusion-body myositis. *Curr Opin Rheumatol.*, 5(6), 732-741.
2. Askanas, V., McFerrin, J., Baque, S., Alvarez, R.B., Sarkozi, E., Engel, W.K. (1996). Transfer of beta-amyloid precursor protein gene using adenovirus vector causes mitochondrial abnormalities in cultured normal human muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(3), 1314-1319.
3. Askanas, V., McFerrin, J., Alvarez, R.B., Baque, S., Engel, W.K. (1997). Beta APP gene transfer into cultured human muscle induces inclusion-body myositis aspects. *Neuroreport*, 8(9-10), 2155-2158.
4. Askanas, V. ve Engel, W.K. (1998). Does overexpression of betaAPP in aging muscle have a pathogenic role and a relevance to Alzheimer's disease? Clues from inclusion body myositis, cultured human muscle, and transgenic mice. *Am J Pathol.*, 153(6), 1673-1677.
5. Askanas, V. ve Engel, W.K. (1998). Sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies: current concepts of diagnosis and pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.*, 10(6), 530-542.
6. Askanas, V. ve Engel, W.K. (1998). Sporadic inclusion-body myositis and its similarities to Alzheimer disease brain. Recent approaches to diagnosis and pathogenesis, and relation to aging. *Scand J Rheumatol.*, 27(6), 389-405.
7. Askanas, V., Engel, W.K., Alvarez, R.B. (1998). Fourteen newly recognized proteins at the human neuromuscular junctions and their nonjunctional accumulation in inclusion-body myositis. *Ann N Y Acad Sci.*, 841, 28-56.
8. Askanas, V. ve Engel, W.K. (2001). Inclusion-body myositis: newest concepts of pathogenesis and relation to aging and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 60(1), 1-14.
9. Askanas, V. ve Engel, W.K. (2002). Inclusion-body myositis and myopathies: different etiologies, possibly similar pathogenic mechanisms. *Curr Opin Neurol.*, 15(5), 525-531.
10. Askanas, V. ve Engel, W.K. (2002). Newest pathogenetic considerations in inclusion-body myositis: possible role of amyloid-beta, cholesterol, relation to aging and to Alzheimer's disease. *Curr Rheumatol Rep.*, 4(5), 427-433.
11. Askanas, V., Engel, W.K., Mirabella, M., Weisgraber, K.H., Saunders, A.M., Roses, A.D. ve diğerleri. (2002). Apolipoprotein E alleles in sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(9), 6334-6339.
12. Askanas, V ve Engel, W.K. (2003). Hereditary inclusion body myopathies. The Molecular and Genetic Basis of Neurologic and Psychiatric Diseases. (Ed 3). *An imprint of Elsevier Science* (s. 501-509). Philadelphia.

13. Askanas, V. ve Engel, W.K. (2003). Proposed pathogenetic cascade of inclusion-body myositis: importance of amyloid-beta, misfolded proteins, predisposing genes, and aging. *Curr Opin Rheumatol.*, 15(6), 737-744.
14. Askanas, V. ve Engel, W.K. (2005). Sporadic inclusion-body myositis: a proposed key pathogenetic role of the abnormalities of the ubiquitin-proteasome system, and protein misfolding and aggregation. *Acta Myol.*, 24(1), 17-24.
15. Askanas, V ve Engel, W.K. (2006). Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with Abeta, protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology*, 24(66), 39-48.
16. Boyd-Kimball, D., Sultana, R., Mohmmad-Abdul, H., Butterfield, D.A. (2004). Rodent Abeta(1-42) exhibits oxidative stress properties similar to those of human Abeta(1-42): Implications for proposed mechanisms of toxicity. *J Alz Dis.*, 6(5), 515-525.
17. Caillé, I., Alliquoat, B., Dupant, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U. ve diğerleri. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development*, 131(9), 2173-2181.
18. Cai, X.D., Golde, T.E., Younkin, S.G. (1993). Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259(5094), 514-516.
19. Caporaso, G.L., Gandy, S.E., Buxbaum, J.D., Ramabhadran, T.V., Greengard, P. (1992). Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89(7), 3055-3059.
20. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P. ve diğerleri. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360(6405), 672-674.
21. Colley, K.J. (1997). Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology*, 7(1), 1-13.
22. Dalakas, M.C. (2001). The molecular and cellular pathology of inflammatory muscle diseases. *Curr Opin Pharmacol.*, 1(3), 300-6.
23. Dalakas, M.C. (2006). Sporadic inclusion body myositis; diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Neurol.*, 2(8), 437-447.
24. Dall'Olio, F., Chiricolo, M., D'Errico, A., Gruppioni, E., Altimari, A., Fiorentino, M. ve diğerleri. (2004). Expression of beta-galactoside alpha 2,6 sialyltransferase and of alpha2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis. *Glycobiology*, 14(1), 39-49.

25. De Strooper, B., Simons, M., Multhaup, G., Van Leuven, F., Beyreuther, K., Dotti, C.G. (1995). Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *EMBO J.*, 14(20), 4932-4938.
26. Eisenberg, I., Avidan, N., Potikha, T., Hochner, H., Chen, M., Olender, T. ve diğeri. (2001). The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet.*, 29(1), 83-87.
27. El-Battari, A., Prorok, M., Angata, K., Mathieu, S., Zerfaoui, M., Ong, E. ve diğeri. (2003). Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation. *Glycobiology*, 13(12), 941-953.
28. Ferrer, I., Martin, B., Castaño, J.G., Lucas, J.J., Moreno, D., Olivé, M. (2004). Proteasomal expression, induction of immunoproteasome subunits, and local MHC class I presentation in myofibrillar myopathy and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 63(5), 484-498.
29. Finch, C.E. (2006). A perspective on sporadic inclusion-body myositis: the role of aging and inflammatory processes. *Neurology*, 66(2 Suppl 1), 1-6.
30. Fratta, P., Engel, W.K., Van Leeuwen, F.W., Hol, E.M., Vattemi, G., Askanas, V. (2005). Mutant ubiquitin UBB+1 is accumulated in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Neurology*, 63(6), 1114-1117.
31. Goldgaber, D., Harris, H.W., Hla, T. (1989). Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86(19), 7606-7610.
32. Greenberg, S.A., Sandoudou, D., Haslett, J.N., Kohane, I.S., Kunkel, L.M., Beggs, A.H. (2002). Molecular profiles of inflammatory myopathies. *Neurology*, 59(8), 1170-1182.
33. Grilli, M., Ribola, M., Alberici, A., Valerio, A., Memo, M., Spano, P. (1995). Identification and characterization of a B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem.*, 270(45), 26774-26777.
34. Grilli, M., Goffi, F., Memo, M., Spano, P. (1996). Interleukin-1beta and glutamate activate the NF-kappa B/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. *J Biol Chem.*, 271(25):15002-15007.
35. Grundmann, U., Nerlich, C., Rein, T., Zettlmeissl, G. (1990). Complete cDNA sequence encoding human beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 18(3), 667.
36. Harrington, C.R., Anderson, J.R., Chan, K.K. (1995). Apolipoprotein E type epsilon 4 allele frequency is not increased in patients with sporadic inclusion-body myositis. *Neurosci Lett.*, 183(1-2), 35-38.

37. Hinderlich, S., Stasche, R., Zeitler, R., Reutter, W. (1997). A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem.*, 272(39), 24313-24318.
38. Hung, A.Y. ve Selkoe, D.J. (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.*, 13(3), 534-542.
39. Jarret, J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32(18), 4693-4697.
40. Johnstone, E.M., Chaney, M.O., Norris, F.H., Pascual, R., Little, S.P. (1991). Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res Mol Brain Res.*, 10(4), 299-305.
41. Kitazume, S., Tachida, Y., Oka, R., Shirotani, K., Saido, T.C., Hashimoto, Y. (2001). Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(24), 13554-13559.
42. Kitazume, S., Suzuki, M., Saido, T.C., Hashimoto, Y. (2004) Involvement of proteases in glycosyltransferase secretion: Alzheimer's beta-secretase-dependent cleavage and a following processing by an aminopeptidase. *Glycoconj J.*, 21(1-2), 25-29.
43. Kleene, R. ve Berger, E.G. (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta.*, 1154(3-4), 283-325.
44. Klein, W.L., Krafft, G.A., Finch, C.E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.*, 24(4), 219-224.
45. Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M. ve diğerleri. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(7), 3922-3927.
46. Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(4), 1456-1460.
47. Mastaglia, F.L., Garlepp, M.J., Phillips, B.A., Zilko, P.J. (2003). Inflammatory myopathies: clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Muscle Nerve*, 27(4), 407-425.
48. Mendell, J.R., Sahenk, Z., Gales, T., Paul, L. (1991). Amyloid filaments in inclusion body myositis. Novel findings provide insight into nature of filaments. *Arch Neurol.*, 48(12), 1229-1234.

49. Michaelis, D., Goebels, N., Hohlfeld, R. (1993). Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes. *Am J Pathol.*, 143(4), 1142-1149.
50. Murphy, M.P. ve Golde, T.E. (2006). Inclusion-body myositis and Alzheimer disease: two sides of the same coin, or different currencies altogether? *Neurology.*, 24;66(2 Suppl 1), 65-68.
51. Nagaraju, K., Raben, N., Loeffler, L., Parker, T., Rochon, P.J., Lee, E. Ve diğ erleri. (2000). Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(16), 9209 -9214.
52. Nagaraju, K., Casciola-Rosen, L., Lundberg, I., Rawat, R., Cutting, S., Thapliyal, R. Ve diğ erleri. (2005). Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis. *Arthritis Rheum.*, 52(6), 1824-1835.
53. Nakagawa, K., Kitazume, S., Oka, R., Maruyama, K., Saido, T.C., Sato, Y. ve diğ erleri. (2006). Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid- β peptides. *J. Neurochem.*, 96, 924-933.
54. Needham, M., Mastaglia, F.L., Garlepp, M.J. (2007). Genetics of inclusion-body myositis. *Muscle Nerve*, 35(5), 549-561.
55. Oldfors, A. ve Lindberg, C. (1999). Inclusion body myositis. *Curr Opin Neurol.*, 12(5), 527-533.
56. Oltersdorf, T., Ward, P.J., Henriksson, T., Beattie, E.C., Neve, R., Lieberburg, I. ve diğ erleri. (1990). The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J. Biol Chem.*, 265(8), 4492-4497.
57. Paulson, J.C., Beranek, W.E., Hill, R.L. (1977). Purification of a sialyltransferase from bovine colostrum by affinity chromatography on CDP-agarose. *J Biol Chem.*, 252(7), 2356-2362.
58. Paulson, J.C. ve Colley, K.J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem.*, 264(30), 17615-17618.
59. Pownall, M. E., Gustafsson, M. K., Emerson, C. P., Jr. (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 18, 747-783.
60. Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H.A., Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci.*, 26(27):7212-7221.
61. Rademacher, T.W., Parekh, R.B., Dwek, R.A. (1988). Glycobiology. *Annu Rev Biochem.*, 57, 785-838.
62. Raju, R., Dalakas, M.C. (2005). Gene expression profile in the muscles of patients with inflammatory myopathies: effect of therapy with IVIg and biologic validation of clinical relevant genes. *Brain*, 128, 1887-1896.

63. Schauer, R. (1982). Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem.*, 40, 131-234.
64. Schlesinger, I., Soffer, D., Lossos, A., Meiner, Z., Argov, Z. (1996). Inclusion body myositis: atypical clinical presentations. *Eur Neurol.*, 36(2), 89-93.
65. Schmidt, J., Raju, R., Salajegheh, M., Rakocevic, G., Voss, J.G., Dalakas, M.C. (2005). Distinct interplay between inflammatory and degeneration-associated molecules in sporadic IBM. *Neurology*, 64, 331-338.
66. Shi, X.P., Tugusheva, K., Bruce, J.E., Lucka, A., Chen-Dodson, E., Hu, B. ve diğerleri. (2005). Novel mutations introduced at the beta-site of amyloid beta protein precursor enhance the production of amyloid beta peptide by BACE1 in vitro and in cells. *J Alzheimers Dis.*, 7(2), 139-148.
67. Stoscheck, C.M. (1990). Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50-69.
68. Sugarman, M.C., Yamasaki, T.R., Oddo, S., Echegoyen, J.C., Murphy, M.P., Golde, T.E. ve diğerleri. (2002). Inclusion body myositis-like phenotype induced by transgenic overexpression of beta APP in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(9), 6334-6339.
69. Sugarman, M.C., Kitazawa, M., Baker, M., Caiozzo, V.J., Querfurth, H.W., LaFerla, F.M. (2006). Pathogenic accumulation of APP in fast twitch muscle of IBM patients and a transgenic model. *Neurobiol Aging.*, 27(3), 423-432.
70. Sugimoto, I., Futakawa, S., Oka, R., Ogawa, K., Marth, J.D., Miyoshi, E. ve diğerleri. (2007). Beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase I cleavage by BACE1 enhances the sialylation of soluble glycoproteins. A novel regulatory mechanism for alpha2,6-sialylation. *J Biol Chem.*, 282(48), 34896-34903.
71. Tadokoro, T., Yamamoto, K., Kuwahara, I., Fujisawa, H., Ikekita, M., Taniguchi, A. ve diğerleri. (2006). Preferential reduction of the α -2,6 sialylation from cell surface N-glycans of human diploid fibroblastic cells by in vitro aging. *Glycoconj J.*, 23: 443-452.
72. Tawil, R. ve Griggs, R.C. (2002). Inclusion body myositis. *Curr Opin Rheumatol.*, 14(6), 653-657.
73. Tomasselli, A.G., Qahwash, I., Emmons, T.L., Lu, Y., Leone, J.W., Lull, J.M. ve diğerleri. (2003). Employing a superior BACE1 cleavage sequence to probe cellular APP processing. *J Neurochem.*, 84(5), 1006-1017.
74. Tsuji, S. (1996). Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J Biochem.*, 120(1), 1-13.
75. Vassar, R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. (2004). *J Mol Neurosci.*, 23(1-2): 105-114.
76. Vattemi, G., Engel, W.K., McFerrin, J., Buxbaum, J.D., Pastorino, L., Askanas, V. (2001). Presence of BACE1 and BACE2 in muscle fibres of patients with sporadic inclusion-body myositis. *Lancet*, 358(9297), 1962-1964.

77. Vattemi, G., Engel, W.K., McFerrin, J., Pastorino, L., Buxbaum, J.D., Askanas, V. (2003). BACE1 and BACE2 in pathologic and normal human muscle. *Exp Neurol.*, 179(2), 150-158.
78. Vattemi, G., Engel, W.K., McFerrin, J., Askanas, V. (2004). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inclusion body myositis muscle. *Am J Pathol.*, 164(1), 1-7.
79. Visekruna, T. (1995). Sialyltransferases: Expression and Application for Chemo-enzymatic Syntheses. Doktora tezi, Vorgelegt der Philosophisch Naturwissenschaftlichen Fakultät Der Universität Basel, Basel.
80. Yunis, E.J. ve Samaha, F.J. (1971). Inclusion body myositis. *Lab Invest.*, 25(3), 240-248.