

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YL- 2024-0061

**KAİNİK ASİT İLE EKSİTOTOKSİSİTE OLUŞTURULMUŞ
NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE GLT-1 (GLUTAMAT
TRANSPORTER 1) YIKIM YOLAĞININ, SIRT4 (SIRTUIN 4)
İLE DÜZENLENMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yaren AKDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Bakiye GÖKER BAĞCA

2. DANIŞMAN
Prof. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TPF- 23039 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2024

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve tez çalışmam süresince hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan, motivasyonum düştüğünde destek olan sevgili danışmanım Doç. Dr. Bakiye Göker Bağca'ya,

Tüm yüksek lisansım boyunca tecrübeleriyle, sevgisiyle ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan, her konuda bana yol gösteren sevgili ikinci danışmanım Prof. Dr. Gizem Dönmez Yalçın'a,

Bana her konuda yardımcı olan, desteğini esirgemeyen, ders döneminde bilgi birikimini benimle paylaşan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Abdullah Yalçın'a, Prof. Dr. Mehtap Kılıç Eren'e ve Prof. Dr. Ali Özmen'e,

Bizleri kırmayıp tez savunmamda jüri üyeliğini kabul eden değerli hocam Doç. Dr. Nur Selvi Günel'e,

Laboratuvarda her yardıma ihtiyacım olduğunda tecrübelerini benimle paylaşan Doç. Dr. Umut Kerem Kolaç'a,

İhtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan ve deney sürecimde tecrübeleriyle yardımını esirgemeyen canım arkadaşım Ayşenur Akkulak Kambur'a, laboratuvarda her daim yardıma koşan ve hayatımda iyi ki tanışmışım dediğim sevgili arkadaşlarım Cansel Yıldırım'a, Elif Bayrak'a, Emre Yeşilören'e ve Erkan Usluer'e,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, beni her zaman destekleyen, yol gösteren, karşılıksız sevgiyle her daim yanımda olan, haklarını asla ödeyemeyeceğim canım annem Dilek Akdoğan'a, canım babam Ilgaz Akdoğan'a ve canım kardeşim Ceren Akdoğan'a, tatlılıkları ve cana yakınlıklarıyla beni hep sakinleştiren ve eğlendiren canım Zeytin'e ve canım Teo'ya,

Uzakta da olsa her zaman yanımda hissettiren, beni motive eden ve iyiliğimi düşünen Batuhan Öz'e, canım dostlarıma ve özel insanlara,

Çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Glutamat	3
2.1.1. Glutamat Metabolizması.....	4
2.1.2. Glutamat Reseptörleri.....	5
2.1.2.1. İyonotropik Reseptörler.....	6
2.1.2.1.1. AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit) / Kainat Reseptörleri	6
2.1.2.1.2. NMDA (N-metil-D-aspartat) Reseptörleri.....	7
2.1.2.2. Metabotropik Reseptörler	7
2.1.3. Glutamat Taşıyıcıları	8
2.1.3.1. EAAT1-GLAST (Glutamat-Aspartat Taşıyıcısı)	10
2.1.3.2. EAAT2-GLT-1 (Glutamat Taşıyıcısı-1).....	10
2.1.3.3. EAAT3 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcısı 3).....	12
2.1.3.4. EAAT4 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcısı 4).....	12
2.1.3.5. EAAT5 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcısı 5).....	12

2.2. Eksitotoksisite.....	13
2.3. Sirtuinler	14
2.3.1. SIRT4.....	16
2.4. Transkripsiyon Faktörleri	17
2.4.1. CREB (The cyclic AMP response element (CRE) – binding protein (CREB))	18
2.4.2. REST (The Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor)	18
2.5. Kainik Asit	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç.....	19
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	19
3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	20
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	22
3.1.4. Kainik Asit Hazırlanması.....	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Hücre Kültürü Uygulamaları	23
3.2.1.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi.....	23
3.2.1.2. Hücre Pasajlaması.....	24
3.2.1.3. Hücre Dondurulması	24
3.2.1.4. Hücre Sayımı ve Ekilmesi	24
3.2.1.5. shRNA İçeren Lentiviral Partikül ile Susmuş SIRT4 Kararlı Hücre Hattı Oluşturulması.....	25
3.2.1.6. Hücreden Protein İzolasyonu	26
3.2.2. Bradford Assay	27
3.2.3. Western Blot	27
3.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi	28
3.2.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	29

3.2.6. Real Time PCR (RT-PCR)	30
3.2.7. Kromatin İmmünopresipitasyon (CHIP)	31
3.2.8. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	32
4.1. SIRT4 Susturulmuş Kararlı Hücre Hattı Belirlenmesi	32
4.2. GLT-1 Protein İfade Seviyesinin Belirlenmesi.....	34
4.3. GLT-1 mRNA seviyesinin belirlenmesi	37
4.4. GLT-1 promotörü ve CREB ve REST transkripsiyon faktörlerinin etkileşiminin CHIP metodu ile gösterilmesi	37
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR	47
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	56
ÖZ GEÇMİŞ.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin Difosfat
Alpha-KG	: alfa-ketoglutarik asit
AMPA	: α -amino-3-hidroksil-5-metil-4-izozoleproponik asit
ARG	: Arginin
ASP	: Aspartik
ATP	: Adenozintrifosfat
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Ca⁺²	: Kalsiyum
cDNA	: Komplementer DNA
CHIP	: Chromatin Immunoprecipitation
Cit	: Sitrulin
CRE	: The cyclic AMP response element
CREB	: The cyclic AMP response element – binding protein
dH₂O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EAAT	: Eksitatör amino asit taşıyıcı
EAAT1	: Eksitatör amino asit taşıyıcı 1
EAAT2	: Eksitatör amino asit taşıyıcı 2
EAAT3	: Eksitatör amino asit taşıyıcı 3
EAAT4	: Eksitatör amino asit taşıyıcı 4
EAAT5	: Eksitatör amino asit taşıyıcı 5

FBS	: Fetal Bovin Serum
GDH	: Glutamat dehidrojenaz
Gln	: Glutamin
GLT-1	: Glutamat taşıyıcı 1
Glu	: Glutamat
GluR	: Glutamat reseptörleri
GS	: Glutamin sentetaz
H	: Hidrojen
iGluR	: İyonotropik reseptörler
mGLUR	: Metabotropik reseptörler
MSS	: Merkezi sinir sistemi
Na	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat-reseptörü
P	: Fosfor
PBS	: Fosfat Buffer Salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PKC	: Protein kinaz C
Pro	: Prolin
qPCR	: Kantitatif PCR
REST	: The Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon assay
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat

SIRT	: Sirtüin
SIRT1	: Sirtüin 1
SIRT2	: Sirtüin 2
SIRT3	: Sirtüin 3
SIRT4	: Sirtüin 4
SIRT5	: Sirtüin 5
SIRT6	: Sirtüin 6
SIRT7	: Sirtüin 7
SLC1A2	: Solute carrier family member 2
SLC1A3	: Solute carrier family member 3
SLC1A6	: Solute carrier family member 6
SLC1A7	: Solute carrier family member 7
TCA	: Trikarboksilik asit
TEMED	: Tetrametiletilediamin
VGLUT	: Vesiküler glutamat taşıyıcıları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Glutamatın kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2. Genel glutamat metabolizması.....	5
Şekil 3. Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması	5
Şekil 4. AMPA reseptörü yapısı.....	6
Şekil 5. NMDA reseptörü yapısı	7
Şekil 6. Metabotropik reseptörlerin sınıflandırılması.....	8
Şekil 7. Nöronlarda ve astrositlerde EAAT'lerin ifadesi ve aktiviteleri.	9
Şekil 8. Glutamat Taşıyıcı-1 ve glutamat taşınımı	11
Şekil 9. Glutamat metabolizması ve eksitotoksisite şeması.....	14
Şekil 10. Memeli sirtuinlerinin hücre içi lokalizasyonu ve ana fonksiyonları.....	15
Şekil 11. Hücresel metabolizmada SIRT4 özellikleri	16
Şekil 12. SH-SY5Y hücrelerinde SIRT4 geni susturulmuş kararlı hücre hattı oluşturulması.....	33
Şekil 13. SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 ekspresyon seviyeleri.	35
Şekil 14. SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 mRNA ifadesinin seviyeleri.	37
Şekil 15. SH-SY5Y hücrelerinde qPCR ile yapılan CHIP Enrichment Test sonuçları	39

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Memeli glutamat taşıyıcılarının ve bunların insan homologlarının dağılımı.....	10
Tablo 2. qPCR’da kullanılan primer baz dizileri.	30
Tablo 3. qPCR reaksiyon basamakları.	30
Tablo 4. CHIP tekniğinde kullanılacak olan genlerin Forward primer baz dizileri.	31
Tablo 5. CHIP tekniğinde kullanılacak olan genlerin Reverse primer baz dizileri.....	31



ÖZET

KAINİK ASİT İLE EKŞİTOTOKSİSİTE OLUŞTURULMUŞ NÖROBLASTOMA HÜCRELERİNDE GLT-1 (GLUTAMAT TRANSPORTER 1) YIKIM YOLAĞININ, SIRT4 (SIRTUIN 4) İLE DÜZENLENMESİNİN ARAŞTIRILMASI

Akdogan Y. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: Çalışmada; SIRT4'ün, nöroblastoma hücrelerinde, GLT-1'in ekspresyonunu ve degradasyonunu nasıl düzenlediği ve GLT-1 promotorundaki transkripsiyon faktörleri üzerine etkisinin aydınlatılması amaçlandı. Bunun yanında özellikle kainik asit kaynaklı eksitotoksosite durumunda bu düzenlemenin nasıl değiştiğinin gözlemlenmesi hedeflendi.

Gereç ve Yöntem: SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında, SIRT4 genini susturmak için SIRT4 shRNA içeren lentiviral partiküller kullanıldı ve SIRT4 geni susturulmuş kararlı SH-SY5Y hücre hattı elde edildi. SIRT4'ün susturulduğunu göstermek Western Blot yöntemi kullanıldı. Uygun şartları sağlayan tek bir hücre hattı seçilerek diğer deneylerde kullanılmak üzere çoğaltılmaya devam edildi. Kontrol SH-SY5Y hücreleri ve SIRT4 geni susturulmuş SH-SY5Y hücreleri kainik asit (1mM) ile muamele edilerek eksitotoksosite modeli oluşturuldu. Toplam dört deney grubu meydana getirildi. Bunlar; kontrol grubu, kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulmuş grup, SIRT4 susturulmuş grup ve kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulan ve SIRT4 susturulmuş gruptur. Dört deney grubundaki GLT-1 ifadeleri Western Blot yöntemi kullanılarak analiz edildi. Dört deney grubundaki GLT-1 mRNA seviyeleri qPCR yöntemi kullanılarak belirlendi. GLT-1 promotoru ve transkripsiyon faktörlerinin (CREB ve REST) etkileşimi CHIP (Kromatin İmmünopresipitasyon) metodu ile dört deney grubunda gösterildi.

Bulgular: Kontrol grubu, Kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulmuş grup, SIRT4 susturulmuş grup ve Kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulan ve SIRT4 susturulmuş gruplarındaki GLT-1 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için her gruptan protein izolasyonu yapılarak Western Blot yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlarda GLT-1'in nöroblastoma

hücrelerinde oligomerik yapılar oluşturduğu görüldü. SIRT4 geni susturulmuş iki grup arasında eksitotoksisite oluşturmak toplam GLT-1 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. Bunun yanında eksitotoksisite oluşturulmuş iki grup arasında SIRT4 genini susturmanın yine toplam GLT-1 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı bulundu. Ardından dört deney grubunda GLT-1 mRNA seviyeleri, qPCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre dört deney grubu arasında, GLT-1 mRNA seviyesinin, istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği gözlemlendi.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar, nöroblastoma hücrelerinde SIRT4' n susturulmasının ve eksitotoksisite durumunun GLT-1 ifadesini, mRNA düzeyinden ziyade protein düzeyinde etkilediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: GLT-1, eksitotoksisite, SIRT4, kainik asit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE REGULATION OF THE GLT-1 (GLUTAMATE TRANSPORTER 1) DEGRADATION PATHWAY BY SIRT4 (SIRTUIN 4) IN EXCITOTOXIC NEUROBLASTOMA CELLS INDUCED BY KAINIC ACID

Akdogan Y. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Medical Biology Program, Master Thesis, Aydın, 2024.

Objective: In this study, we aimed to investigate how SIRT4 regulates the expression and degradation of GLT-1 in neuroblastoma cells and to clarify its effect on transcription factors in the GLT-1 promoter. In addition, it was aimed to observe how this regulation changes especially in the case of kainic acid-induced excitotoxicity.

Material and Methods: In SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, lentiviral particles containing SIRT4 shRNA were used to silence the SIRT4 gene and a stable SH-SY5Y cell line with silenced SIRT4 gene was obtained. Western blotting was used to demonstrate SIRT4 silencing. A single cell line that met the appropriate conditions was selected and continued to be propagated for further experiments. Control SH-SY5Y cells and SIRT4 gene silenced SH-SY5Y cells were treated with kainic acid (1 mM) and excitotoxicity model was established. A total of four experimental groups were formed. These are; control group, kainic acid-induced excitotoxicity model, SIRT4 silenced group and kainic acid-induced excitotoxicity model and SIRT4 silenced group. GLT-1 expressions in the four groups were analyzed using Western Blot method. GLT-1 mRNA levels in the four groups were determined using qPCR method. The interaction of GLT-1 promoter and transcription factors (CREB and REST) was demonstrated by CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) method in four groups.

Results: In order to determine the GLT-1 expression level in the control group, Kainic acid-excitotoxicity induced group, SIRT4 silenced group and Kainic acid-excitotoxicity induced and SIRT4 silenced groups, protein isolation was performed from each group and Western Blot method was applied. The results showed that GLT-1 formed oligomeric structures in

neuroblastoma cells. A statistically significant decrease in total GLT-1 expression was observed between the two SIRT4 gene silenced groups to induce excitotoxicity. In addition, silencing the SIRT4 gene between the two excitotoxicity-induced groups was found to statistically significantly reduce total GLT-1 expression. GLT-1 mRNA levels in the four experimental groups were then determined using qPCR method. According to the results obtained, it was observed that GLT-1 mRNA levels did not show a statistically significant difference between the four groups.

Conclusion: Our results suggest that SIRT4 silencing and excitotoxicity in neuroblastoma cells affect GLT-1 expression at the protein level rather than the mRNA level.

Keywords: GLT-1, excitotoxicity, SIRT4, kainic acid

1. GİRİŞ

Glutamat hem hücrel metabolizmada hem de merkezi sinir sisteminde başlıca nörotransmitter olarak işlev görmektedir (Iovino ve ark, 2020). Bir sinir hücresinden salınarak başka hücrelerdeki ilgili reseptörü uyarır ve bu şekilde sinaptik iletim gerçekleşir. Aşırı glutamat salınımına bağlı olarak sinaptik yarı içindeki glutamat konsantrasyonundaki artış, eksitotoksisteye neden olur. Eksitotoksitenin, Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde ortak moleküler yolak olduğu bilinmektedir. GLT-1 (Glutamat Taşıyıcı 1), merkezi sinir sisteminde ifade edilen ana glutamat taşıyıcıdır. Hücre dışı glutamatın uzaklaştırılmasında ve nörotransmitter homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar (Bhardwaj ve ark. 2018).

Sirtuinler, proteinleri deasetilasyon veya ADP-ribosilasyon yoluyla posttranslasyonel modifikasyonlar ile düzenleyen enzimlerdir. Bu enzimlerin yedi adet alt grubu bulunur ve hücre içerisinde çekirdek, mitokondri veya sitoplazmada ifade edilirler. Sirtuin 4 (SIRT4), beyinde eksprese edilen mitokondriyal bir sirtuin ailesi proteindir (Bai ve ark. 2021).

Daha önce yapılan bir çalışmada, SIRT4 nakavt farede, bir eksitotoksik ajan olan kainik asidin etkileri daha şiddetli olarak görülmüştür ve ayrıca beyindeki GLT-1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Shih ve ark, 2014). Yapılan diğer bir çalışmada ise SIRT4'ün, hücre hattında, glutamat metabolizmasını düzenleyerek, eksitotoksisteyi önlediği gösterilmiştir (Oh ve ark, 2012).

PKC aracılığıyla NEDD4-2 fosforilasyonu sağlandığı ve fosforile olmuş NEDD4-2'nin GLT-1'in ubiquitinasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Sheldon ve ark, 2008; Tardón ve ark, 2012). Ayrıca A172 glioblastoma hücrelerinde SIRT4'ün overekspresyonunun GLT-1 protein ifadesini arttırdığı da bulunmuştur (Yalçın ve Çolak, 2020). Ek olarak GLT-1'in, glia ve glioblastoma hücrelerinde, SIRT4 susturulmasından sonra farklı şekilde düzenlendiği gösterilmiştir. SIRT4 susturulması glia hücrelerinde GLT-1 oligomer oluşumunu etkilemezken glioblastoma hücrelerinde önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur. (Yeşilören ve Yalçın, 2023).

Yapılan bu çalışmalar, SIRT4'ün glia ve glioblastoma hücrelerinde GLT-1 ifadesini nasıl düzenlediğini göstermiştir. Bu çalışmada, nöroblastoma hücrelerinde, SIRT4'ün GLT-

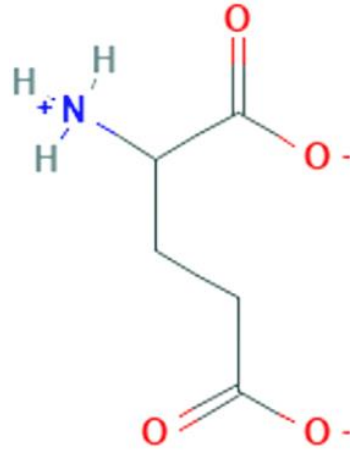
1 yıkım yolağını ve ifadesini nasıl düzenlediğini araştırmak amaçlandı. Ayrıca bu düzenlenmenin, özellikle kainik asitle indüklenmiş eksitotoksiste durumunda nasıl değiştiğini araştırmak hedeflendi. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında SIRT4'ü susturmak için dizayn edilmiş olan SIRT4'e karşı tasarlanmış shRNA genini içeren lentiviral partiküller kullanılarak SIRT4 geni susturulmuş kararlı SH-SY5Y hücre hattı elde edildi. SIRT4'ün susturulduğunu göstermek için SIRT4 protein ifadesi Western Blot yöntemi kullanılarak incelendi. Kontrol SH-SY5Y hücreleri ve SIRT4 geni susturulmuş kararlı SH-SY5Y hücreleri kainik asit ile muamele edilerek eksitotoksiste modeli oluşturuldu. Bu şekilde dört deney grubu oluşturuldu. Bunlar; kontrol SH-SY5Y, SIRT4 susturulmuş SH-SY5Y, kainik asit ile muamele edilmiş SH-SY5Y ve hem kainik asit ile muamele edilmiş hem de SIRT4 susturulmuş gruptur. Dört deney grubundaki GLT-1 ifadelerine Western Blot yöntemi kullanılarak bakıldı. Dört deney grubundaki GLT-1 mRNA seviyeleri qPCR yöntemi kullanılarak belirlendi. GLT-1 promotoruna bağlanan CREB ve REST transkripsiyon faktörlerinin etkileşimi CHIP (Kromatin İmmünopresipitasyon) metodu ile dört deney grubunda gösterildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glutamat

Şekil 1’de kimyasal yapısı verilen glutamat, glutaminden sentezlenen esansiyel olmayan bir amino asittir. Memeli merkezi sinir sistemindeki (CNS) ana uyarıcı nörotransmitter olarak görev yapar ve sinir hücreleri arasındaki iletişimi sağlar. Öğrenme, hafıza, hücreyel göç, hücreyel farklılaşma, gibi bilişsel fonksiyonlarda kritik bir rol oynar (Danbolt, 2001; Rueda ve ark, 2016; Magi ve ark, 2019). Glutamat, hücre dışı sıvıda 3-4 μM beyin omurilik sıvısında (BOS) ise 10 μM miktarlarında ve presinaptik nöron terminallerinde bulunur. Kan-beyin bariyerini geçebilir (Danbolt, 2001). Presinaptik nöron, glutamini glutamata dönüştürmek için glutaminaz enzimini kullanır. Vesiküler glutamat taşıyıcı ailesi (VGLUT1), üretilen glutamati alır ve veziküllerdeki sinaptik boşluğa taşır. Glutamat içeren kesecikler, presinaptik membranın yüzeyine bağlandıklarında sinaptik boşluğa salınır (Sheldon ve Robinson, 2007).

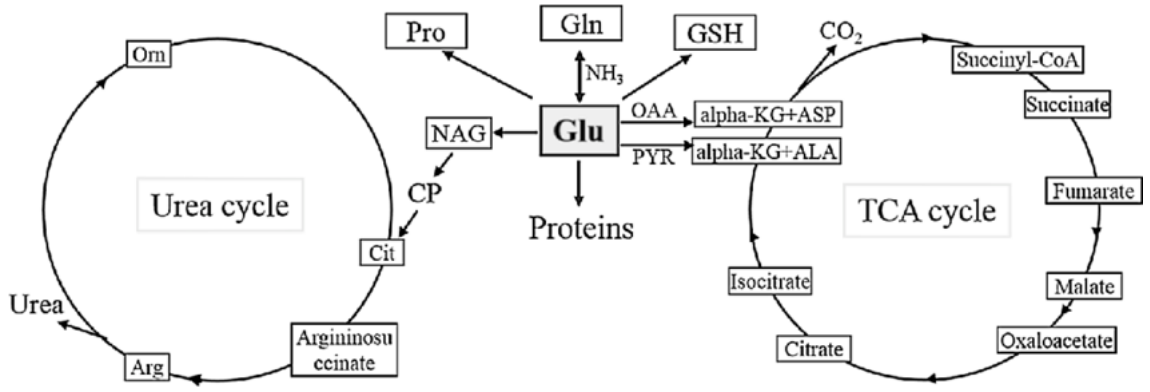
Glutamat reseptörleri (GluR), glutamatın bir nörotransmitter olarak fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki gruba ayrılır. İyonotropik reseptörler doğrudan membran iyon kanallarına bağlanırken, metabotropik reseptörler G proteini gibi aracı bileşiklere bağlanır ve inositol-1,4,5-trisfosfat (IP3), kalsiyum ve siklik nükleotidler gibi hücre içi ikinci habercileri modüle eder. İyonotropik reseptörler NMDA (N-metil-D-aspartat), AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonat) ve kainat olmak üzere alt gruplara ayrılır (Kew ve Kemp 2005).



Şekil 1. Glutamatın kimyasal yapısı (PubChem).

2.1.1. Glutamat Metabolizması

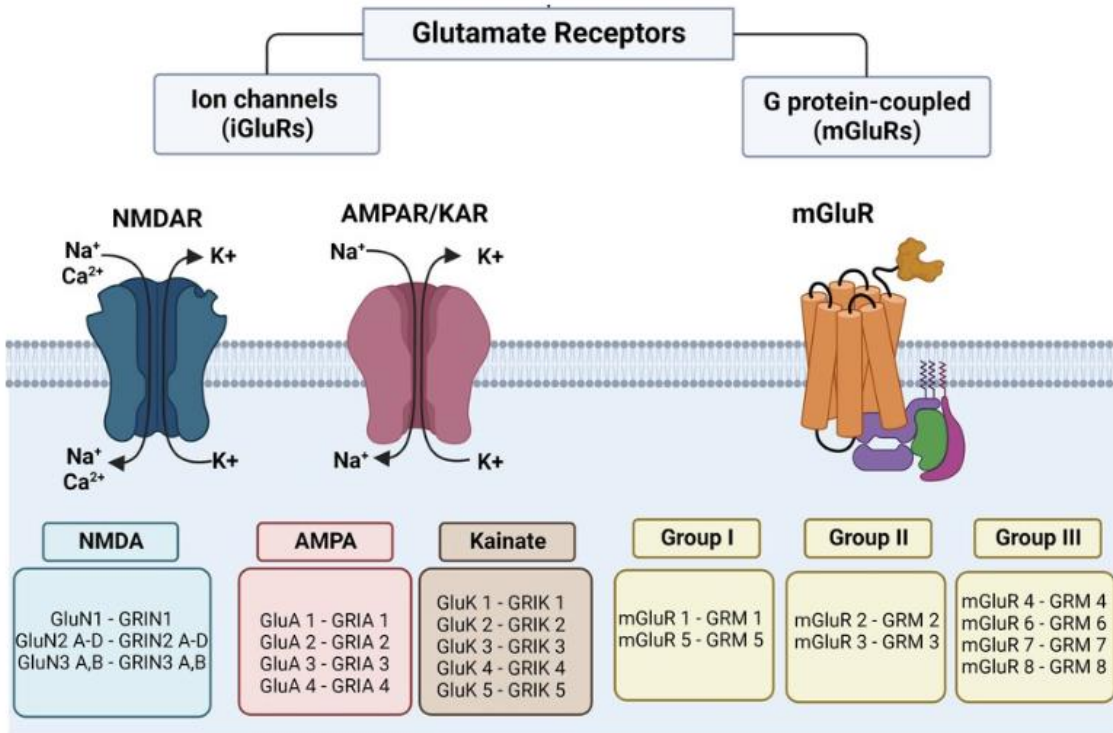
Glutamat uyarıcı bir nörotransmitter olmasının yanı sıra üre döngüsünün ilk enzimi olan karbamoilsentetaz 1'in allosterik aktivatörü olan metabolik düzenleyici N-asetilglutamatın (NAG) da öncüsüdür (Şekil 2) (Wu ve ark, 2015). Vücuttaki endojen mekanizmalar glutamatın sentezinden sorumludur. Glutamat dehidrojenaz (GDH) veya diğer aminotransferazlar, bu yollardan birinde onu alfa-ketoglutarattan, diğerinde ise glutamin, histidin, arginin ve prolinden üretir. Glutamaterjik nöronlarda bulunan glutamin sentetaz (GS) enzimi, glutamat ailesinin bir üyesi olan glutamin amino asidini glutamata dönüştürür ve glutamat sentezi metabolizması sırasında hücreden salınır. Zaten mevcut olan glutamat, burada bildirilen glutamat konsantrasyon oranına bağlı olarak astrositlerin yüzey glutamat taşıyıcıları tarafından alınır. Bu işlemin gerçekleştiği iki farklı yöntem vardır. Bunlardan biri, GDH enziminin glutamatı alfa-ketoglutarata dönüştürmesi ve daha sonra ATP üretmek için kullanılmasıdır. Diğer yol, glutamatı glutamine dönüştüren glutamin sentetaz (GS) enzimini içerir. Bu şekilde üretilen glutamin, yeniden glutamat sentezi için glutamaterjik nöronlara geri taşınmaktadır (Brosnan ve Brosnan, 2013; Karaca ve ark, 2011).



Şekil 2. Genel glutamat metabolizması (Wu ve ark, 2015).

2.1.2. Glutamat Reseptörleri

Glutamatın nörotransmisyonu, glutamat reseptörleri (GluR) tarafından düzenlenir. Glutamat reseptörleri fizyolojik ve moleküler yapılarına göre ayrılarak iki ana türden oluşur. Bunlar metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) ve iyonotropik reseptörleridir (iGluR). iGluR'lar katyon geçirgen ligand kapılı iyon kanallarıdır ve mGluR'lar G proteinine bağlıdır (Mayer ve Armstrong, 2004; Reiner ve Levitz, 2018).



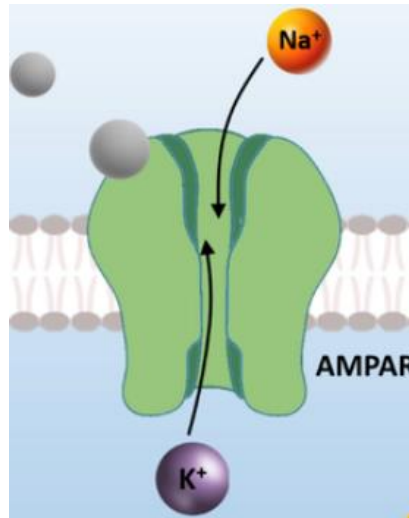
Şekil 3. Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması (García-Gaytán ve ark, 2022).

2.1.2.1. İyonotropik Reseptörler

İyonotropik reseptörler postsinaptik membran üzerinde bulunur ve merkezi sinir sisteminde hızlı uyarıcı iletimden sorumludur. AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit)/Kainat ve NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörleri olarak sınıflandırılır. Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının hücre içi ve hücre dışı sıvılar arasında hareket etmesine izin vererek glutamat taşınmasını kolaylaştırırlar (Mayer ve Armstrong, 2004; Reiner ve Levitz, 2018; Zhang ve ark, 2019).

2.1.2.1.1. AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit)/Kainat Reseptörleri

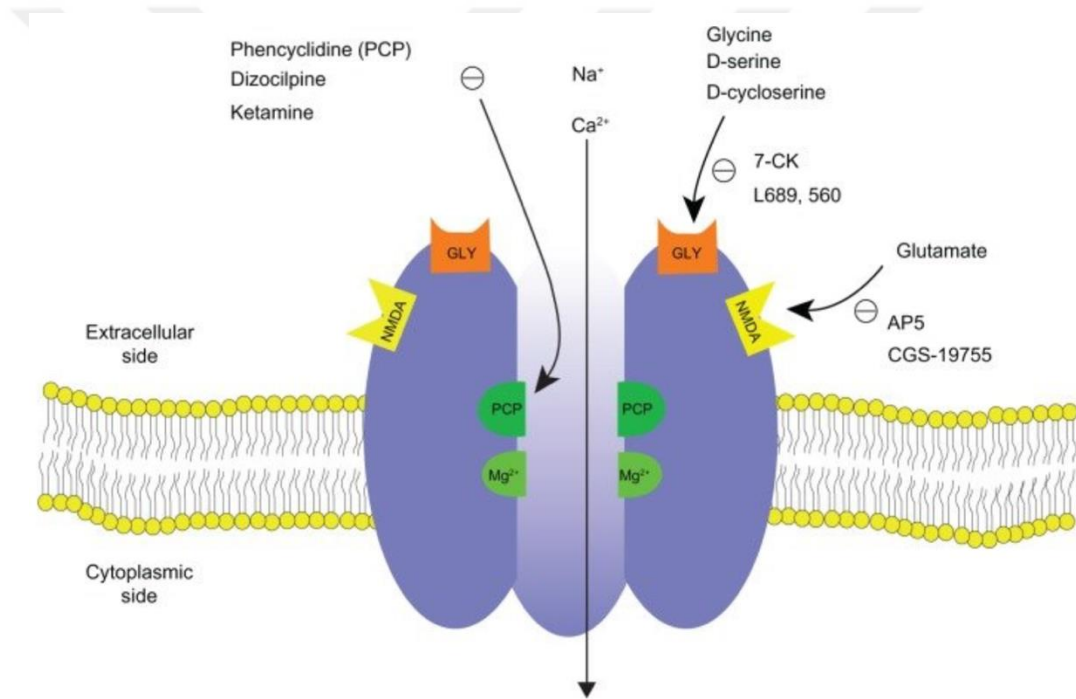
AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit) ve kainat reseptörleri, Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının hücre içi ve hücre dışı sıvılar arasında geçişi yoluyla glutamat taşınmasında görev alan reseptörlerdir (Şekil 4). AMPA reseptörleri hafıza, eksitotoksisite ve öğrenme ile ilişkili sinaptik plastisite süreçlerini destekler ve uyarıcı yanıtı başlatır (Kew ve Kemp 2005). AMPA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu sinir sistemine zarar verebilir, potansiyel olarak geçici nöropatiye ve nöronların ölümüne neden olabilir. Kainat reseptörleri, dengeyi doğru bir şekilde değiştirerek nöronal uyarımı ve inhibisyonu düzenler (Reiner ve Levitz, 2018; Gasparini ve ark, 2013).



Şekil 4. AMPA reseptörü yapısı (Kazemi ve ark, 2022).

2.1.2.1.2. NMDA (N-metil-D-aspartat) Reseptörleri

NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörleri uyarıcı bir fonksiyona sahiptir ve Ca^{+2} , Na^{+} ve K^{+} 'ya karşı geçirgendir (Şekil 5). Farklı fizyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip tetramerik ve heteromerik formları vardır. NMDA reseptörleri, glutamat taşıyıcı aktivasyonu ve glutamatın sinaptik boşluktan uzaklaştırılması için önemli iyonotropik reseptörlerdir. Bu, beyin ve omurilikteki nöronlarda meydana gelen depolarizasyona ve ardından sinaptik iletimin başlatılmasına neden olur (Kew ve Kemp, 2005; Reiner ve Levitz, 2018).

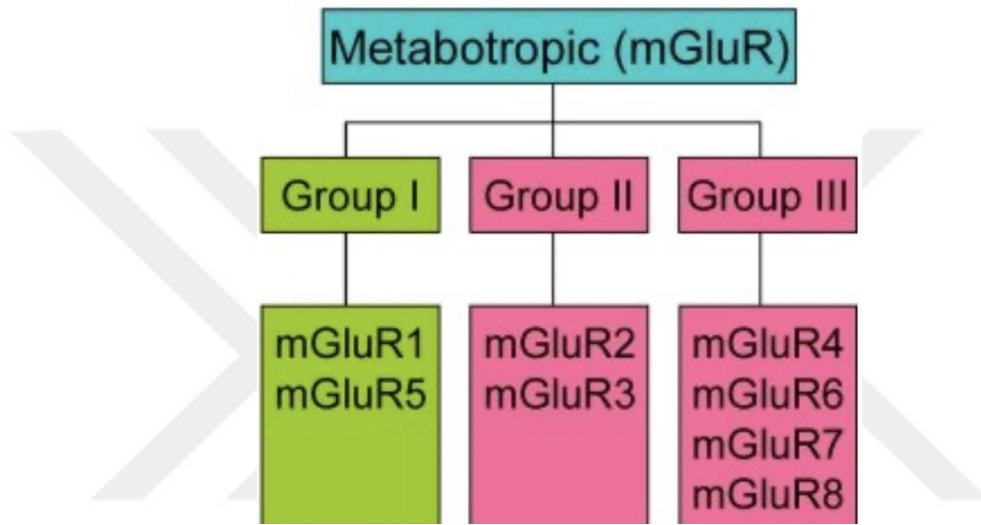


Şekil 5. NMDA reseptörü yapısı (Li ve ark, 2011).

2.1.2.2. Metabotropik Reseptörler

Metabotropik reseptörler, hücre yüzeyinde bulunan ve hücre aktivitesini düzenlemek için bir dizi metabolik adımı başlatan G proteinine bağlı reseptörlerdir. Bu reseptörler, nörotransmitterler veya hormonlar gibi dış uyarılarla etkileşime girer ve bu etkileşim sonucunda hücre içi yanıtları başlatırlar. Bir nörotransmitter bağlandığında, bağlı G-proteini

aktive eder. Aktive olan G-protein, adenil siklaz veya fosfolipaz C gibi efektör enzimleri harekete geçirir ve bu da hücre içi ikinci mesajcıların üretimini tetikler. Metabotropik reseptörler genellikle daha yavaş ve daha uzun süreli etki ederler. mGluR'ler, 8 alt tipte sınıflandırılırlar (mGluR1 - mGluR8) ve sinyal iletim mekanizmalarına göre üç gruba ayrılırlar (Hermans ve Challiss, 2001; Niswender ve Conn, 2010; Lau ve ark, 2010). mGluR'ler, 8 alt tipte sınıflandırılırlar (mGluR1 - mGluR8) ve sinyal iletim mekanizmalarına göre üç gruba ayrılırlar (Şekil 6).

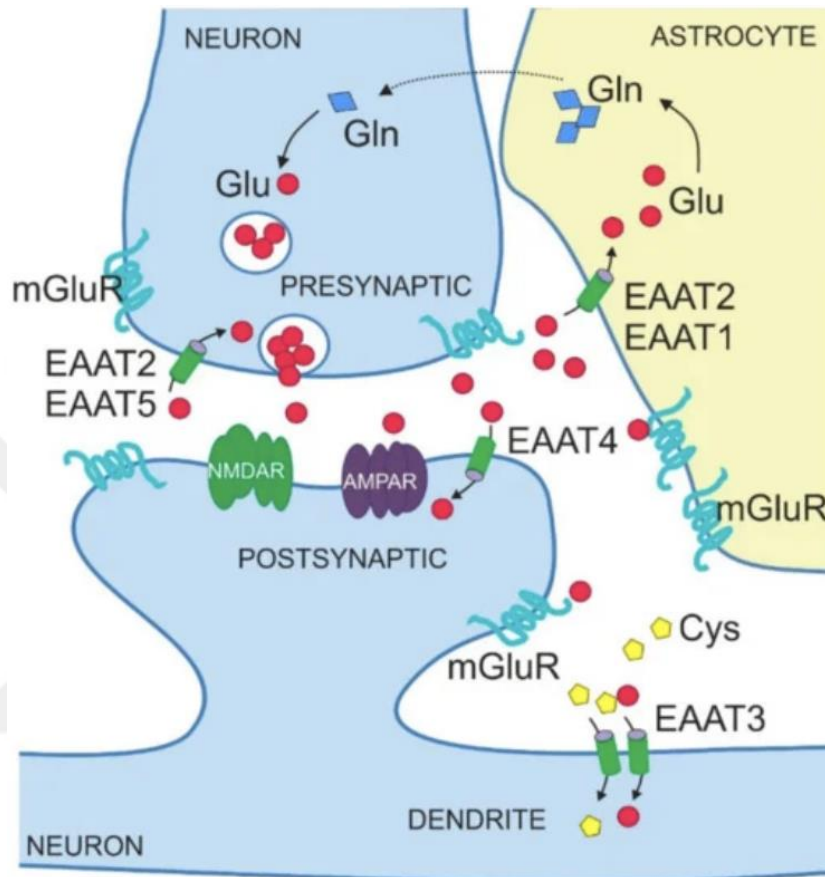


Şekil 6. Metabotropik reseptörlerin sınıflandırılması (Blackshaw ve ark, 2011).

2.1.3. Glutamat Taşıyıcıları

Glutamat taşıyıcıları, glutamati sinir sisteminin sinaptik yarığında taşıyan proteinlerdir. Yüksek seviyelerde glutamat, sinir hücrelerine zarar verebilir ve nörotoksositeye yol açabilir. Bu nedenle glutamat düzeylerinin düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır ve bu düzenlemede glutamat taşıyıcıları kritik bir rol oynamaktadır. Birincisi, glutamatın sinaptik yarıktan postsinaptik nöronlar ve glia hücreleri tarafından geri alınması, böylece sinaptik iletimin durdurulması ve nörotoksik etkilerin önlenmesidir. Bir diğeri ise hücrelerdeki glutamati, tekrar kullanılabilir şekilde glutamin gibi öncü moleküllere dönüştürmek, yani glutamatın geri dönüşümünü sağlamaktır (Danbolt, 2001; Seal ve Amara, 1999). Glutamat taşıyıcıları, glutamat seviyelerini düzenleyerek sinir hücrelerinin sağlıklı işlev görmesini sağlar ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynar.

Bu taşıyıcıların işlev bozukluğu, çeşitli nörolojik hastalıklara, örneğin ALS (Amyotrofik Lateral Skleroz), epilepsi ve iskemik beyin hasarı gibi çeşitli nörolojik hastalıklara yol açabilir (Rothstein ve ark,1995; Sheldon ve Robinson, 2007).



Şekil 7. Nöronlarda ve astrositlerde EAAT'lerin ifadesi ve aktiviteleri. (Malik ve Willnow, 2019).

Nöronlar ve astroglialar, yüksek afiniteli ve sodyuma bağımlı glutamat taşıma kapasitesine sahiptir. Yüksek afiniteli glutamat taşıyıcıları "Eksitator Aminoasit Taşıyıcısı (EAAT)" olarak adlandırılır ve beş ana alt tipe ayrılır. Bunlar eksitator amino asit taşıyıcısı 1 (EAAT1 [GLAST]), eksitator amino asit taşıyıcısı 2 (EAAT2 [GLT-1]), eksitator amino asit taşıyıcısı 3 (EAAT3), eksitator amino asit taşıyıcısı 4 (EAAT4) ve eksitator amino asit taşıyıcısı 5 (EAAT5) oluşmaktadır (Tablo 1) (Danbolt, 2001; Peterson ve Binder, 2019).

Tablo 1. Memeli glutamat taşıyıcılarının ve bunların insan homologlarının dağılımı (Sattler ve Rothstein, 2006'dan modifiye edilmiştir).

Glutamat Taşıyıcı Alt tipi	İnsan Homologu	Hücre Tipi	Anatomik yeri
GLAST	EAAT1	Astrosit	Beyincik, korteks, omurilik,
GLT-1	EAAT2	Astrosit	Beyin ve omurilik boyunca
EAAC1	EAAT3	Nöron	Hipokampus, beyincik, bazal ganglia
EAAT4	EAAT4	Nöron	Beyincik
EAAT5	EAAT5	Nöron	Retina

2.1.3.1. EAAT1-GLAST (Glutamat-Aspartat Taşıyıcısı)

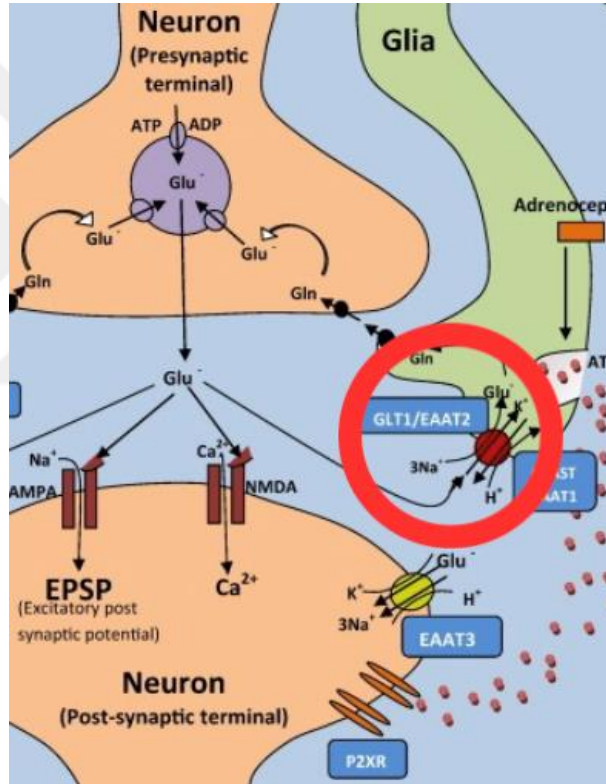
İnsanlarda EAAT1 veya GLAST (Glutamat-Aspartat taşıyıcı), 5p11-p12 kromozomunda yer alan SLC1A3 (Solute carrier ailesi 1 üye 3) geni tarafından kodlanır. GLAST'lar özellikle MSS gelişimi boyunca aktiftir. Anatomik olarak beyincik, korteks ve omurilik bölgelerindeki ana glutamat taşıyıcısıdır. EAAT1'in çalışması sodyum iyonlarına dayanır. Glutamatın hücreye taşınması, sodyum iyonlarının elektrokimyasal gradyanı ile desteklenir. Glutamat taşınırken, sodyum ve protonlar aynı anda hücre tarafından emilir ve hücreden potasyum salınır (Rothstein ve ark, 1996; Danbolt, 2001; Pajarillo ve ark, 2019).

2.1.3.2. EAAT2-GLT-1 (Glutamat Taşıyıcısı-1)

GLT-1 olarak da bilinen EAAT2 beyinde glutamat alımından sorumlu bir EAAT taşıyıcısıdır. Sinapslardaki glutamat seviyelerini düzenleyerek, çeşitli nörodejeneratif bozukluklarda eksitotoksik nöronal hasarı azaltmaya yardımcı olur. EAAT2 proteini 11. kromozomun kısa kolunda bulunan SLC1A2 geni tarafından kodlanır. Nöronlarda EAAT2 ekspresyonu öncelikle presinaptik olarak akson terminallerinde görülür (Robinson ve Jackson, 2016; O'Donovan ve ark, 2017). EAAT2, özellikle astrositlerde yüksek yoğunlukta bulunur. Beynin kortikal bölgelerinde yoğun şekilde ifade edilirken daha az yoğunlukta da olsa bazı nöronlar tarafından da ifade edilebilir. EAAT2 fonksiyonunun bozulması glutamatın geri alınmasını engeller. Bu durumda oluşan aşırı glutamat birikimi, ALS (Amyotrofik Lateral Skleroz), epilepsi, Alzheimer ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir faktördür (Rothstein ve ark, 1995;

Tanaka ve ark, 1997; Kim ve ark, 2011; Wilkie ve ark, 2021; Rimmele ve Rosenberg, 2021; Bhatnagar ve ark, 2023).

Glutamat, presinaptik nörondan veziküller aracılığıyla sinaptik boşluğa salınır. Sinaptik boşlukta artan glutamat konsantrasyonu, postsinaptik nöron üzerindeki glutamat reseptörlerini uyarak glutamatın nöron içerisine alınmasını sağlar. Artan glutamatın fazlası ise sinaptik boşluktan GLT-1 tarafından astrositlere taşınır ve burada tekrar glutamat-glutamin döngüsüne katılır. Glutamatın taşınması sırasında Na^+ (sodyum) ve H^+ (hidrojen) iyonları glutamat ile birlikte hücre içine, K^+ (potasyum) iyonları ise hücre dışına taşınmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Glutamat Taşıyıcı-1 ve glutamat taşınımı (Soni ve ark, 2014'den modifiye edilmiştir).

GLT-1, dinamik bir düzenleme mekanizmasına sahiptir. Glutamat taşınımı sırasında, GLT-1 Protein Kinaz C (PKC) aktivasyonu sonucu ubiquitinlenir ve degrade olur. PKC, fosforilasyon yoluyla aktive edilir. Translasyon sonrası modifikasyonlar, hücrelerdeki PKC proteinlerinin seviyesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Aktif PKC, E3 ligaz olan NEDD4-2'yi fosforile ederek aktif hale getirir. Aktif NEDD4-2, GLT-1'e ubiquitin ekler ve

GLT-1'in proteozomlar tarafından yıkılmasını sağlar. Bu süreç sonucunda, GLT-1 seviyesi azalır. Sinaptik yarıktaki artan glutamat seviyeleri, hücre yüzeyindeki GLT-1 seviyelerini artırır. Sinaptik yarıktaki glutamat seviyeleri düştüğünde ise hücre yüzeyindeki GLT-1 ubikuitinlenerek parçalanır (Sheldon ve ark, 2008; Tardon ve ark, 2012; Wang ve ark, 2016; Dağdelen ve ark, 2021).

2.1.3.3. EAAT3 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı 3)

EAAT3 ayrıca EAAC1 olarak da bilinir. 9p24.2 kromozomunda bulunan SLC1A1 (Solute taşıyıcı aile 1 üye 1) geni tarafından kodlanan bir proteindir (Nieoullon ve ark, 2006). EAAT3, çoğunlukla nöronlarda bulunur ve anatomik olarak beyincik ve hipokampusu yerleşmiştir (Sattler ve Rothstein, 2006). EAAT3 eksikliği GDH homeostazisi disfonksiyonu ve nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılıdır (Holmseth ve ark, 2012; Casteneda ve ark, 2017).

2.1.3.4. EAAT4 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı 4)

EAAT4, İnsanlarda 19. kromozomun üzerine lokalize olan SLC1A6 (Solute carrier ailesi 1 üye 6) geni tarafından kodlanan bir proteindir. Hipokampus ve neokorteksin yanında çoğunlukla beyincikteki Purkinje hücrelerinde eksprese edilir (Fairman ve ark, 1995; Kim ve ark, 2011).

2.1.3.5. EAAT5 (Eksitatör Aminoasit Taşıyıcı 5)

EAAT5, 1. Kromozomun üzerinde bulunan SLC1A7 geninden üretilen retinaya özgü bir glutamat taşıyıcısıdır. EAAT5, retinal fotoreseptörler ve bipolar hücreler tarafından ifade edilir ve burada düşük hızlı bir taşıyıcı ve inhibitör bir glutamat reseptörü olarak görev yapar. Bir diğer rolü klorür iletkenliğini sağlamasıdır. EAAT5'ün disfonksiyonu, retinanın işlevselliğini etkileyebilir ve görme bozukluklarına yol açabilir (Lee ve ark, 2013; Schneider ve ark, 2014).

2.2. Eksitotoksisite

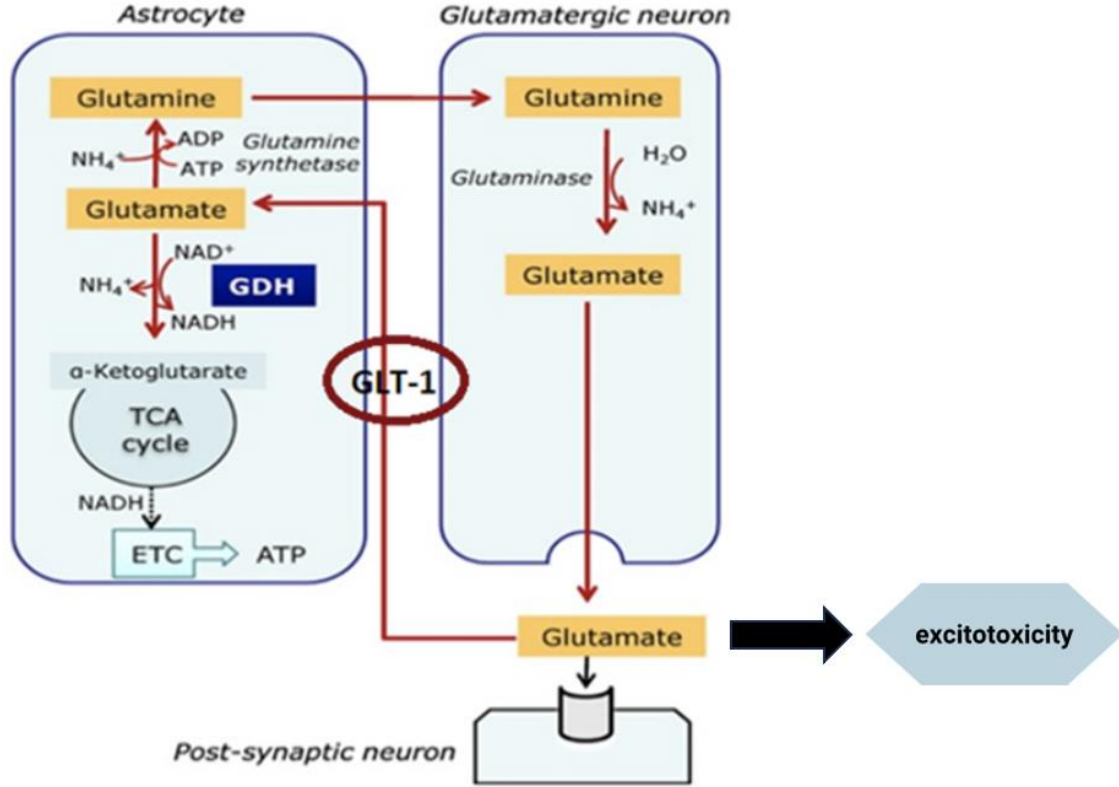
Eksitotoksisite, sinir hücrelerinin, aşırı derecede eksitator amino asitlerin uyarılması sonucu hasar görmesi veya ölmesi durumudur (Dong ve ark, 2009). Glutamat ve glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterler sinaptik yarıktaki birikerek eksitotoksisiteye neden olur, bu yüzden bu nörotransmitterlere eksitotoksinler veya nörotoksinler denir (Danbolt ve ark, 2016). Eksitotoksisite süreci, beyin ve omurilik dahil olmak üzere merkezi sinir sistemindeki birçok nörolojik hastalıkta ve hasarda önemli bir rol oynar (Dong ve ark, 2009; Olloquequi ve ark, 2018).

Aşırı glutamat ve aspartata maruz kalmanın bir sonucu olarak hücre ölümünün gerçekleştiği bir çalışma sonrasında, ilk kez 1969 yılında Olney tarafından 'Eksitotoksisite' terimi ortaya atılmıştır (Olney, 1969).

Eksitotoksisite, Alzheimer hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Parkinson hastalığı, iskemik inme gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynar (Soni ve ark, 2014; İovino ve ark, 2020).

Astrositler tarafından üretilen glutamin, glutaminaz enzimi tarafından deamine edilir ve glutamik asite dönüştürülür. α -ketoglutarat, Krebs döngüsünde bir ara madde olarak glutamata aminlenir. Glutamat, presinaptik nöronlarda veziküller içinde depolanır ve sinaptik uyarı ile sinaptik yarığa salınır. Daha sonra postsinaptik nöronlarda bulunan NMDA, AMPA ve kainat reseptörlerine bağlanarak sinaptik iletimi başlatır ve nöronal uyarımı sağlar. Sinaptik iletimi durdurmak için glutamat, EAAT2 (GLT-1) gibi taşıyıcılar aracılığıyla sinaptik yarıktan glial hücrelere geri alınır. Ardından glial hücrelerde glutamin sentetaz (GS) enzimi tarafından glutamat glutamine dönüştürülür ve yeniden nöronlara taşınarak döngü tamamlanır. Patolojik durumlarda, glutamatın aşırı salınımı veya glutamat taşıyıcılarının işlev bozukluğu sonucu sinaptik boşlukta glutamat birikimi artar. Yüksek glutamat seviyeleri, postsinaptik nöronlarda bulunan NMDA ve AMPA reseptörlerinin aşırı uyarılmasına neden olur. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, hücrelere aşırı kalsiyum (Ca^{2+}) girişine neden olur. Yüksek kalsiyum seviyeleri, hücre içi proteazlar, lipazlar ve endonükleazlar gibi enzimleri aktive eder. Kalsiyum birikimi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak oksidatif strese ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açar. Hücre içi hasar, apoptotik veya nekrotik yollar ile hücre ölümüne yol açar (Şekil 9)

(Sontheimer, 2008; Hardingham ve Bading, 2010; Karaca ve ark, 2011; Soni ve ark, 2014; Lewerenz ve Maher, 2015).

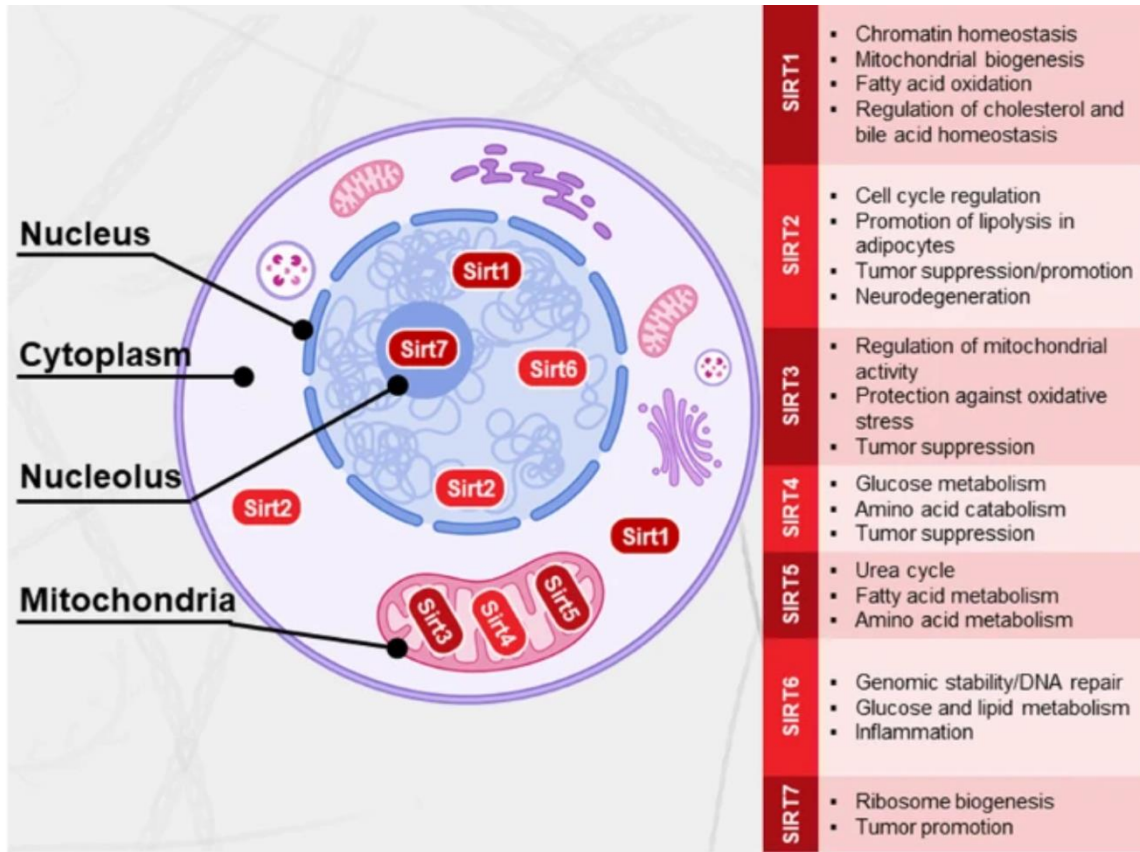


Şekil 9. Glutamat metabolizması ve eksitotoksisite şeması (Karaca ve ark, 2011'den adapte edilmiştir).

2.3. Sirtuinler

Sirtuinler, NAD^+ bağımlı protein deasetilaz enzimleridir ve çeşitli hücresel işlevlerin düzenlenmesinde etkilidirler. Sınıf III histon deasetilazlar (HDAC) sınıfında bulunmaktadırlar (Hamaidi ve Kim, 2022). Sirtuinler, histon proteinlerini, transkripsiyon faktörlerini ve diğer proteinleri deasetile ederek, gen ifadesini ve metabolizmayı düzenlerler. Ayrıca, hücresel stres yanıtlarını, oksidatif stresi, DNA onarımını, hücresel yaşlanma süreçlerini yönetirler, genomik stabiliteyi korurlar ve yaşa bağlı hastalıkları üzerinde etki gösterirler (Dönmez ve ark, 2010; Houtkooper ve ark, 2012; İmai ve Guarente, 2014).

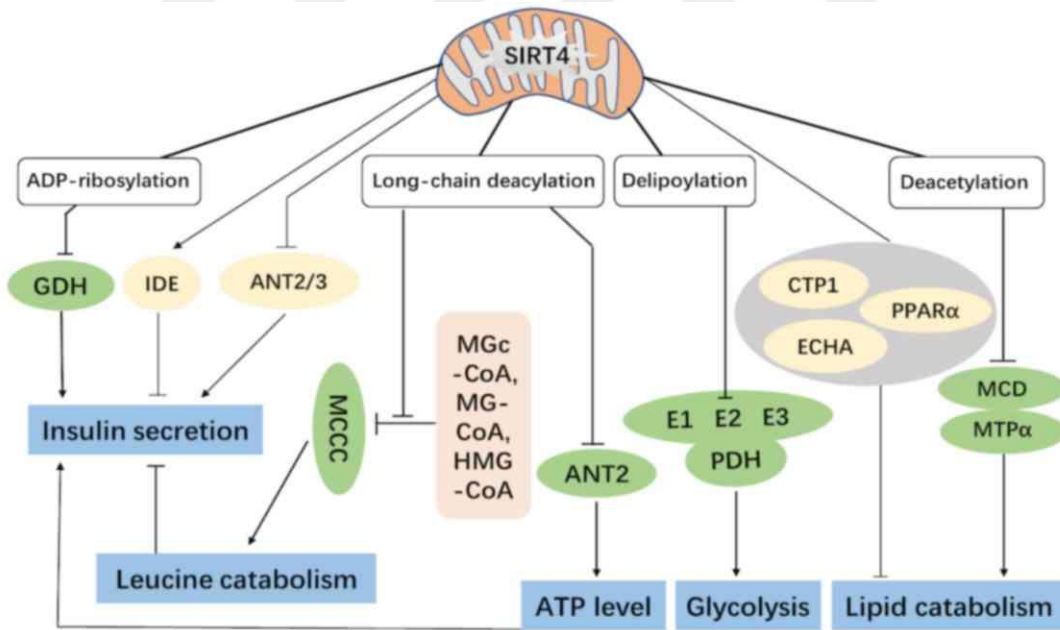
Memelilerde sirtuin ailesi, doku özgüllüğü, hücre içi lokalizasyonu ve enzimatik aktivitesi açısından farklılık gösteren yedi proteinden (SIRT1-SIRT7) oluşur (Şekil 10). SIRT1 üzerinde en çok çalışılan memeli sirtuinidir ve hücre çekirdeğinde lokalizedir. Bunun yanında belirli koşullar altında SIRT1 sitoplazmaya taşınabilir. SIRT2, mitoz sırasında çekirdeğe göç edebilen, ağırlıklı olarak sitozolik bir sirtuin'dir. SIRT6 sadece çekirdekte lokalize olurken, SIRT7 nükleolusta lokalize olur. SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondride lokalizedir. SIRT5 dışındaki tüm sirtuinler mono-ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahipken, SIRT5 protein hedeflerinden süksinil, malonil ve glutaril gruplarının uzaklaştırılmasını katalize eder (Houtkooper ve ark, 2012; Hamaidi ve Kim, 2022).



Şekil 10. Memeli sirtuinlerinin hücre içi lokalizasyonu ve ana fonksiyonları (Hamaidi ve Kim, 2022).

2.3.1. SIRT4

Mitokondriyal protein SIRT4, sirtuin ailesinin metabolizmada işlev gören bir üyesidir ve memelilerde mitokondriyal matrikste lokalize olur (Şekil 11). ADP-ribozilasyon aktivitesine sahiptir ve SIRT4'ün deasetilaz aktivitesi henüz tanımlanmamıştır (Haigis ve Sinclair, 2010). SIRT4, SIRT3'den farklı olarak NAD^+ 'ya bağımlı deasetilaz aktivitesinden yoksundur ancak SIRT4'ün NAD^+ 'ya bağımlı ADP-riboziltransferaz aktivitesi içerdiği gösterilmiştir. SIRT4, glutamat dehidrojenazı (GDH) ADP-ribozilleyerek enzimatik aktivitesini baskılar, bu da ATP üretmek için glutaminin glutamata metabolizmasını sınırlar (Haigis ve Sinclair, 2010; Houtkooper ve ark, 2012; Hamaidi ve Kim, 2022). GDH'nin aktivitesinin inhibisyonu amino asit kaynaklı insülin salgılanmasını engeller. Yapılan bir çalışma sonucunda, SIRT4^{-/-} fareleri hem beslenmiş hem de aç durumda ve glutamin ile uyarıldığında plazma insülin seviyelerinde artışa sahip olduğu görülmüştür (Houtkooper ve ark, 2012).



Şekil 11. Hücresel metabolizmada SIRT4 özellikleri (Wang ve ark, 2020).

Başka bir çalışmada, insülinoma hücrelerinde SIRT4'ün aşırı ekspresyonu insülin sekresyonunu baskıladığı bulunmuştur. SIRT4'ün ayrıca insülin parçalayan enzim ve adenin nükleotid translokatorü ile etkileşime girdiği de gösterilmiştir (Ahuja ve ark, 2007).

SIRT4'ün karaciğerdeki yağ oksidasyonunu baskılayarak metabolik süreçlerde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. SIRT4'ün PPAR α aktivitesini baskılaması sonucu, karaciğerde yağ asidi oksidasyonu baskılamış ve bu durum sonucunda, karaciğerin enerji üretimindeki yağ asitlerinin kullanımı azalmıştır (Laurent ve ark, 2013).

Ayrıca, SIRT4'ün eksitotoksik etkilere mücadelede indüklendiği ve koruyucu bir rol oynadığı tespit edilmiştir. SIRT4'ün devre dışı bırakıldığı farelerin öncesine göre daha şiddetli nöbet belirtileri gösterdiği ve glutamat taşıyıcılarının hücre yüzeyindeki ekspresyonlarında ve ATP seviyelerinde belirgin bir azalma yaşandığı gözlemlenmiştir. Yabani tip farelerde, toplam glutamat alımında bir artışın eşlik ettiği kainik düzenlemesinden sonra SIRT4 ekspresyonu yukarı doğru düzenlenir ve SIRT4 nakavt farelerinde, glutamat alım fonksiyonundaki azalma, glutamat taşıyıcıların hücre yüzeyi ekspresyonundaki azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu nedenle SIRT4'ün beyinde glutamat taşınmasını teşvik ederek eksitotoksisiteye karşı koruma sağladığı ve SIRT4 kaybının eksitotoksik etkilere karşı duyarlılığı artırdığı gözlemlenmiştir (Shih ve ark, 2014). Başka bir çalışmada, GLT-1'in SIRT4 tarafından dinamik ifadesi ve düzenlenmesi glia (ölümsüzleştirilmiş insan astrositleri) ve glioblastoma hücrelerinde analiz edilmiştir ve glioblastoma hücrelerinde SIRT4 sustrulmasından sonra GLT-1 protein ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu çalışma sonucunda GLT-1 ekspresyonunun glia ve glioblastoma hücrelerinde farklı şekilde düzenlendiği bulunmuştur. SIRT4 aktivatörlerinin, glioblastomalarda eksitotoksisiteyi önlemek için kullanılabildiği görülmüştür (Yeşilören ve Yalçın, 2023).

2.4. Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri (TF'ler), DNA'ya bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen proteinlerdir. Genomu doğrudan yorumlayarak DNA dizisinin kodunun çözülmesinde ilk adımı gerçekleştirirler. Genomdaki spesifik DNA dizilerini tanırlar ve RNA polimerazın belirli genleri transkribe etmesini teşvik eder veya engellerler. Bu proteinler, hücrelerin genetik bilgisini kullanarak işlev görmesini ve farklı uyarılara yanıt vermesini sağlar (Latchman, 1997; Lambert ve ark, 2018).

2.4.1. CREB (The cyclic AMP response element (CRE) – binding protein (CREB))

Bir transkripsiyon faktörü olan CREB, DNA üzerindeki spesifik bir dizi olan ve cAMP Response Element (CRE) adı verilen diziyi tanır ve bağlanır. Bu bağlanma, hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır veya artırır. Çeşitli protein kinazlar aracılığıyla hücre içi Ca^{+2} akışına yanıt verir ve hücreyel sinyalizasyon yolları tarafından fosforilasyon yoluyla aktive edilir (Mayr ve Montminy, 2001; Shaywitz ve Greenberg, 1999).

2.4.2. REST (The Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor)

REST, “Neural Restrictive Silencer” (NRS) olarak da bilinen nörolojik gen ekspresyonunu negatif düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Mori, 2002). REST, nörojenik genlerin baskılanmasında görev alır. Hücreyel gelişim, farklılaşma ve nörolojik fonksiyonların düzenlenmesinde etkilidir. REST'in anormal ekspresyonu ve işlev bozuklukları, çeşitli nörolojik hastalıkların ve kanserlerin patogeneğinde, ayrıca nöronal genlerin ifade edilmediği durumlarda bu genlerin susturulmasında önemli bir rol oynar (Mampay ve Sheridan, 2019). REST, 21 bp uzunluğunda bir cis-regülatör bölgeye (-663. ve -131.sekans) bağlanmaktadır (Bruce ve ark, 2009; Pajarillo ve ark, 2021).

2.5. Kainik Asit

Kainik asit bazı deniz yosunlarında doğal olarak bulunan bir asittir. Bu asit, merkezi sinir sistemindeki başlıca uyarıcı nörotransmitter olan glutamat için reseptörleri aktive ederek etki eden güçlü bir nöro-uyarıcı amino asit agonisti olarak görev yapar (Hung ve ark, 2006; Chekan ve ark, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (Nüve)
- Mini santrifüj (Nüve)
- Hücre Kabini (Nüve)
- Su banyosu (Mipro)
- Vorteks (Velb Scientifica)
- Sheaker (Miu)
- Isı Bloğu (Dizge)
- Manyetik karıştırıcı (Weightlab)
- pH ölçer (AZ)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- İnkübatör (Nuaire)
- -80°C buzdolabı (WiseCryo)
- Spektrofotometre (BioTek)
- Western görüntüleme cihazı (Syngene GBox)
- Floresan Mikroskobu (Zeiss)
- Nanodrop (Nabi)
- Western Blot sistemi (Biorad)
- Rotator (Biosan)

- Magnet (invitrogen)
- -20 ve +4°C dolaplar (Vestel, Samsung, Uğur)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Otoklav (Hirayama)
- Distile su cihazı (Nüve)
- Hücre kültürü kabini (Nüve)
- Buz cihazı (Uğur buzaL60)
- Real-Time PCR (Bio-Rad)
- Pipet seti (10 µl, 100 µl, 1000 µl, Eppendorf)
- Sonikatör (Bandaline Elektronik)

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- DMEM high glucose (Capricorn, Serox)
- Fetal sıgır serumu (FBS, 500 ml, Gibco)
- L-glutamin solüsyonu (200 mM, 100 mL, Capricorn)
- Penisilin/Streptomisin (100 mL, Capricorn)
- 10 cm'lik petri kabı (Biofil)
- Tek kullanımlık serolojik pipet (5 mL, 10 mL, 25 mL, Nest)
- Pastör pipeti (Isolab)
- Sodyum piruvat (Gibco)
- Tripsin-EDTA (%0.05, Capricorn)
- Dulbecco's PBS (1x, Serox)
- 6 well plate (Nest)
- 10 mL şırınga (Risus)

- 15 mL'lik falkon (Isolab, Nest)
- 50 mL'lik steril falkon (Isolab, Nest)
- Cryotube (Biosharp)
- Enjektör filtresi (Isolab)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO, Merck)
- Ethanol (Isolab)
- RNase içermeyen su (ABT)
- RIPA lizis tamponu (ABT)
- 1 mL'lik steril enjektör (Beybi)
- Protein kuantifikasyon kiti (Bradford testi, Sigma)
- Proteaz ve fosfataz inhibitörü (100x, MCE)
- Tripan mavisi (AgriCulture)
- Tris Hidroklorid (Sigma)
- Sodyum Klorür (Merck)
- Tris Base (Nzytech)
- Glisin (Tekkim)
- Yağsız süt tozu (Enka)
- B-Merkaptoetanol (Merck)
- Metanol (Isolab)
- SDS-Page yükleme boyası (5x, ABT)
- SDS-PAGE jeli (Biorad, Criterion midi)
- Whatman kağıdı (Filtre kağıdı, Whatman)
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (Carlo Erba)
- PVDF membran (Poli-viniliden florür) (Biorad)
- Tween 20 (Sigma)

- Protein marker (Genedirex)
- ECL (Biorad)
- qPCR mastermix (SYBR) (SUGENOMICS)
- Tubulin antikoru (Elabscience)
- GLT-1 antikoru (Finetest)
- shRNA lentiviral partikülü (OriGene)

3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

- TBS (Tris-Buffered Salline / 1 Litre); 6,05 gr Tris-HCl (0.038 M) + 8.76 gr NaCl (0.15 M) + 1 lt distile su (pH: 7,6)
- Yıkama Tamponu; 100 ml TBS (pH: 7,6) + 100 µl %0,1 Tween20
- Transfer Tamponu; 3.03 gr Tris-Base (0.025 M) + 14,4 gr glisin (0.192 M) + 200 ml metanol + 2 ml %10 SDS + 1 lt distile su
- 10X Yürütme Tamponu; 30,3 gr Tris-Base (0.25 M) + 144 gr glisin (1.92 M) +10 gr SDS (0.04 M) %1 lt distile su
- Bloklama Solüsyonu; %5 Yağsız Süt Tozu + TBS (pH: 7.6)
- Strip Tamponu (stok); 200 ml %10 SDS + 62,5 ml 1 M Tris (pH:6,7) + 737,5 ml distile su
- Strip Tamponu; 50 ml stok strip tamponu + 350 µl β-merkaptoetanol
- DNA Kolon Bağlama Tamponu: 30 µl DNA kolon bağlama solüsyonu + 120 µl pH
- İndikatörü
- DNA Kolon Yıkama Tamponu: 6 ml DNA Kolon Yıkama Solüsyonu + 24 ml (%96-100) ethanol
- Membran Ekstraksiyon Tamponu: 200 µl tampon + 2 µl halt coctail
- MNase Digestion Tampon Çalışma Solüsyonu: 210 µl MNase Digestion Buffer + 0,21 µl 1M DTT

- 1X IP Dilution Buffer: 395µl Nuclease Free Water + 100 µl IP Dilution Buffer (5X) + 5 µl halt cocktail
- IP Yıkama Tamponu 1: 600 µl IP Dilution Buffer/Wash Buffer (5X) + 2,4 ml nuclease free water
- IP Yıkama Tamponu 2: 200 µl IP Dilution Buffer/Wash Buffer (5X) + 70 µl NaCl (5M) + 730 µl nuclease free water
- 1X IP Elüsyon Tamponu: 75 µl IP Elüsyon Tamponu + 75 µl nuclease free water

3.1.4. Kainik Asit Hazırlanması

Kainik asit ana stok hazırlamak için önce 5 ml suda çözünecek miktar hesaplandı. Molekül kütlesi 213,23 g/mol ve kütlesi 50 mg olan kainik asitten 0,0002344 mol gerektiği bulundu ($n=m/MW$). Ana stok konsantrasyonu 46 mM olarak hesaplandı ($M=n/V$). 5ml ana stok hazırlandıktan sonra deneylerde kullanılmak üzere 1 ml ependorflara 10 mM'lık ara stoklar hazırlandı. Ara stok hazırlanışında ana stoktan 217 µl kainik asit 783 µl su ile karıştırıldı. Deneylerde 6-well plate'deki hücrelere kainik asit muamelesi yapılırken, her bir kuyucukta son hacmin 1 mM olması için 200 µl kainik asit, 1800 µl taze besiyeri kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

3.2.1.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

İnsan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücrelerinin, %10 (v/v) (50ml) FBS, %1 (v/v) (5ml) sodyum pirüvat, %1 (v/v) (5ml) penisilin/streptomisin, 15 ml L-glutamin ve yüksek glikoz içerikli DMEM besiyeri ortamında 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında büyümesi ve çoğalması sağlandı. Başlangıçta hücreler 10 cm² 'lik petrilere ekildi ve petri yüzeyine tutunabilmeleri için 24 saat 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde

inkübe edildi. Hücrelerin kültür ortamı ortalama 1-2 günde bir değiştirildi ve hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında pasajlama (alt kültürleme) işlemi yapıldı.

3.2.1.2. Hücre Pasajlaması

%70-%80 yoğunluğa ulaşan SH-SY5Y hücrelerinin pasajlanması için öncelikle besiyeri uzaklaştırılarak 5ml 1X PBS ile yıkandı. Sonrasında 1 ml Tripsin-EDTA eklenerek 37°C'de 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde tripsini inaktive etmek için 4 ml besiyeri eklenerek pipetaj işlemi ile hücreler petri yüzeyinden toplandı ve hücreler homojenize edildi. Ardından petrilere eşit miktarda paylaştırıldı. Daha sonra üstüne taze besiyeri eklendi ve hücreler, 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.2.1.3. Hücre Dondurulması

Yeterli yoğunluğa ulaşınca dondurularak saklanmasına karar verilen SH-SY5Y hücre petrilerinin her biri için 2 ml dondurma besiyeri hazırlandı. Besiyeri hazırlama aşamasında %20 FBS, %10 DMSO ve %70 serumsuz besiyeri falkon tüp içerisinde birleştirildi. Hazırlanan besiyeri filtreden geçirilerek yeni bir tüp içerisine alındı. Hücrelerin bulunduğu petrilerdeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 1 ml tripsin-EDTA eklendi ve 37°C inkübatörde 3 dakika bekletildi. Petrilerin üzerine 7 ml besiyeri eklendikten sonra hücreler toplanarak 15'lik falkon içerisine alındı. Falkonlar, 1200 rpm ve +4°C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra tüpteki süpernatant atıldı. Hazırlanmış olan dondurma besiyeri pellet üzerine eklenerek çözdürüldü ve cryotüp içerisine alındı. Sonrasında cryotüpler -20°C'de 20 dakika bekletildi ve en sonunda -80°C'de saklandı.

3.2.1.4. Hücre Sayımı ve Ekilmesi

Kurulacak olan deneylerin her biri için 6-well plate kullanıldı ve her bir kuyucuk için 100.000 adet hücre ekilmesi kararlaştırıldı. SH-SY5Y hücrelerinin üzerine 1 ml tripsin-EDTA eklendikten sonra 37°C inkübatörde 3 dakika bekletildi. Sonrasında petrilerin

içerisine 7 ml besiyeri eklendi ve hücreler falkon tüp içerisine toplandı. Falkonlar, 1200 rpm ve +4°C’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpteki süpernatant atıldı ve pellet, pipetaj yardımıyla 10 ml taze besiyeri içerisinde çözündürüldü. Falkon içinden ependorf tüpe çözödürölen karışımından 1 ml eklendi ve daha sonra yeni bir ependorf tüp içerisine 10 µl alındı. 10 µl hücre bulunan ependorf tüpüne 10 µl tripan mavisi eklendi ve pipetaj yardımıyla homojenize edildi. Hücre sayım lamı üzerindeki bölgelere 10’ar µl hazırlanan 1:1 (hücre:tripan mavi) karışımından eklendi. Hücre sayımı tamamlandıktan sonra gerekli hesaplamalarla, kuyucuklar 100.000 hücre içerecek şekilde ekim yapıldı. Sonrasında kuyucuklar toplamda 2 ml besiyeri içerecek şekilde üzerlerine gerekli miktarda taze besiyeri eklendi.

3.2.1.5. shRNA İçeren Lentiviral Partiköl ile Susmuş SIRT4 Kararlı Hücre Hattı Oluşturulması

SH-SY5Y hücre hattında SIRT4 susturulmuş kararlı bir hücre hattı oluşturmak için OriGene shRNA Lentiviral Partikülleri kullanıldı. Hücrelerdeki SIRT4 genini susturmak için kullanılacak viral partiköl miktarı MOI (Multiplicity of Infection) birimi ile hesaplandı. Susturulacak olan hücrelere yetecek MOI miktarı 5 MOI olarak belirlendi. Hesabı aşağıda gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

Origene’den alınan SIRT4 virüsünün konsantrasyonu $2,37 \times 10^7$ ’dir. Kullanılacak olan hücre miktarı 100.000 hücredir.

$$100.000 \text{ hücre} \times 5 \text{ MOI} = 500.000$$

Elde edilen konsantrasyon miktarı, virüs konsantrasyonuna bölündü;

$500.000 / 2,37 \times 10^7 = 21,1 \text{ µl}$ virüs kullanılacağı hesaplandı. Bu hesaba göre 6-well plate’de her bir kuyu içerisine 21,1 µl SIRT4 virüs, 8 µl polybrene ve toplamda 2000 µl’ye tamamlanması için 1970,9 µl besiyeri eklendi.

5 kuyucuğa virüs verildikten 24 saat sonra her 6 kuyucukta puromisin (0,5 µg/ml) içeren besiyeri ile besiyeri değişikliği yapıldı. Hücreler yeterli büyüklüğe ulaşana kadar puromisin içeren besiyeri değişikliği devam etti. Bir süre sonra virüs içermeyen kontrol grubunun tamamında ölüm yaşandı. Plazmidli hücreler puromisin içeren besiyeri değişikliği ile büyümeye devam etti. Hücreler yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra 6 well plate’ten 25

cm'lik flasklara alındı. Puromisin içeren besiyeri değişikliği uygulanmaya devam etti. Hücreler yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra 25 cm'lik flasklardan 10cm'lik petrilere alındı ve böylece 5 ayrı hücre hattı elde edildi. Hücre hatlarından hangilerinin efektif olarak sustuğu western blot yöntemleri ile tespit edildi. Hücreler 37°C inkübatöre konuldu ve 48 saat beklemenin ardından hücreler protein izolasyonuna hazır hale geldi.

3.2.1.6. Hücreden Protein İzolasyonu

Ekimden 24 saat sonra protein izolasyonu yapılacak olan hücrelerde, kainik asitli deney gruplarının oluşturulması için kontrol SH-SY5Y ve SIRT4 susturulmuş SH-SY5Y gruplarının birer kuyucuğuna, kainik asit muamelesi yapıldı. Muamele edilen kuyucuklara 200 µl kainik asit ve 1.8 ml taze besiyeri verildi. Diğer kuyuculara 2 ml taze besiyeri verilerek besiyeri değiştirilmesi gerçekleştirildi ve plate inkübatör içerisine konularak 24 saat bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra, 6-well plate üzerindeki besiyeri çekilerek her bir kuyu üzerine 250 µl tripsin-EDTA eklendi ve 37°C inkübatörde 3 dakika bekletildi. Tekrar kabin içerisine alınan plate'de bulunan her bir kuyuya 750 µl PBS konularak gruplara göre toplanıp 15 ml'lik falkon içerisine alındı. Falkonlar 2000 rpm ve +4°C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pellet üzerine 1 ml PBS eklendi, hücreler pipetaj yardımıyla çözdürüldükten sonra ependorf tüp içerisine alındı. Ependorf tüpler 2000 rpm ve +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu sırada tüp başına 200 µl olacak şekilde %1 fosfataz ve %1 proteaz içeren RIPA hazırlandı ve buz üstünde bekletildi. Santrifüj sonunda ependorflardan süpernatant kısmı atıldı ve geriye kalan pellet üzerine, hazırlanan RIPA'dan 200'er µl eklenerek pipetaj yapıldı. Ardından her bir tüpün içindeki pellet-RIPA karışımı 10-15 kez iğneden geçirildikten sonra -80°C'de 20 dakika bekletildi. Her 20 dakikanın sonunda çözdürülüp pipetaj yapıldı ve bu işlem 4 kez tekrarlandı. En sonunda 14.000 rpm ve +4°C'de 25 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve elde edilmiş protein olan süpernatant, yeni ependorf tüpe alınarak -20°C'de saklandı.

3.2.2. Bradford Assay

Bradford Assay yapmak için deneyde kullanılacak olan tüm gruplardan izole edilen proteinler distile su ile yeni ependorf tüp içerisinde 1:5 oranında seyreltildi. Bu orana göre seyreltme işlemi için 5 µl protein ve 20 µl distile su kullanıldı. Bradford ölçümü sonucunda protein konsantrasyonunun hesaplanması için BSA'nın farklı konsantrasyonlara ait standartları kullanıldı. 96 well plate içerisinde 200 µl Bradford solüsyonu eklendi. Her bir kuyucuğa sırasıyla 2 tekrar halinde hazırlanan standartlar ve seyreltilmiş protein grupları 5 µl miktarında konuldu. 30 saniye hafif bir şekilde çalkalanan 96-well plate ışıktan korunacak şekilde 5 dakika inkübe edildi. Ölçüme hazır olan plate spektrofotometre içerisine yerleştirildikten sonra 595 nm'de ölçüldü. Elde edilen ölçüm değerleri ile çizilen grafik eğrisinden elde edilen denklem yardımıyla her bir gruba ait protein miktarı µg/ml olarak hesaplandı.

3.2.3. Western Blot

Bradford Assay sonrasında belirlenen konsantrasyonlara göre, yeni ependorf tüpler içerisine protein örneklerinden koyuldu ve üzerlerine 6 µl Loading Dye eklendi. Hazırlanan tüpler 2000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra örnekler 96°C'de 5 dakika denatüre edildi. Daha sonra tekrar 2000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve örnekler yüklemeye hazır hale getirildi. Yürütmenin yapılacağı tank içerisine önceden hazırlanmış olan yürütme tamponu koyuldu. Yapılan yükleme planı doğrultusunda jelde bulunan kuyucuklara, en başa marker gelecek şekilde örnekler yüklendi. Yükleme tamamlandıktan sonra tank güç kaynağına bağlandı ve 90V'de yürütme işlemi başlatıldı. Yürütmenin ilk 30 dakikasından 100V'ye alınarak örnekler yürümeye devam etti.

Yürütmenin sonunda transfer için jel tanktan çıkartıldı. Kullanılacak olan PVDF membranın aktifleştirilmesi için membran metanol içerisinde 5 dakika bekletildi ve transfer için gerekli sandviç sistemi kuruldu. Sandviç sistemine koyulan tüm ekipmanlar koyulmadan önce transfer tamponuyla ıslatıldı. Sandviç aşağıdan yukarıya siyah kaset, sünger, whatman kağıtları, jel, membran, whatman kağıtları, sünger, kırmızı kaset olarak sıralandı. Sandviçin üst kapağı kapatılmadan önce sünger üzerinden roller aracılığıyla roll-on işlemi gerçekleştirildi ve hava kabarcıklarının kalması engellendi. Sonrasında kapak

kapatıldı ve sandviç sistemi transfer tankına konuldu. Tank içerisine buz aküleri ve transfer tamponu eklendi. Transfer işlemi +4°C’de 70V’da 2 saat yürütülerek gerçekleştirildi.

Transfer işlemi sonrasında sistemden alınan membran plastik kap içerisine konuldu ve üzerine 5ml bloklama solüsyonu eklendi. Membran 1 saat oda sıcaklığında shaker üzerinde bloke edildikten sonra taze süt ile 1:1000 (antikor: skim milk) oranında antikor konuldu ve +4°C’de bir gece shaker üzerinde inkübasyona bırakıldı.

Ertesi gün membran 3 defa 5’er dakika yıkama tamponu ile yıkandı. Üzerine 1:5000 (antikor: skim milk) oranında sekonder antikor konuldu ve oda sıcaklığında shaker üzerinde 2 saat inkübe edildi. Daha sonra membran yıkama tamponu ile 10’ar dakika 3 kez yıkandı ve membran görüntüye hazır hale getirildi.

Membran asetat üzerine alındı ve 500 µl ECL solüsyonu konulduktan sonra western görüntüleme cihazı içerisine alınarak karanlıkta 5 dakika bekletildi ve sonrasında görüntü alındı. Görüntüleme işlemi sonrasında membran tekrar kap içerisine alınarak üzerine strip tamponu konuldu ve 40 dakika oda sıcaklığında shaker üzerinde inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 3 tekrar halinde 5'er dakika yıkama tamponuyla yapılan yıkama işlemi sonrasında membran tekrar bloke edilmek için taze süt eklendi. Sonrasında aynı aşamaların tekrarı yapılarak housekeeping protein görüntülenmesine hazır hale getirildi. Hedef antikordan farklı olarak kontrol antikoru (GAPDH) 1:5000 oranında eklendi ve housekeeping protein görüntülenmesi yapıldı.

3.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

RNA izolasyonu yapılacak olan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 6-well plate içerisine ekildi. Ekim sonrası bir gün 37°C’de inkübatörde bekletildi. Kainik asitli deney gruplarının oluşturulması için kontrol SH-SY5Y ve SIRT4 susturulmuş SH-SY5Y gruplarının birer kuyucuğuna, kainik asit muamelesi yapıldı. Muamele edilen kuyucuklara 200 µl kainik asit ve 1.8 ml taze besiyeri verildi. Diğer kuyucuklara 2 ml taze besiyeri verilerek besiyeri değiştirilmesi gerçekleştirildi ve plate inkübatör içerisine konularak 24 saat bekletildi. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve taze besiyeri eklenerek 48 saat 37°C inkübatörde bekletildi. 48 saat sonunda kabin içerisine alınan plate de bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk içerisine 250 µl trizol konuldu ve 5 dakika bekletildi. Kuyucukların içerisi hücre kazıyıcı ile kazındı ve

kuyucukların içeriği ependorf tüp içerisine aktarıldı. 12.000 rcf ve +4°C’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Tüp içerisindeki süpernatant yeni bir ependorf tüpe alındı ve üzerine 200 µl kloroform koyuldu. 15 saniye vortekslendi ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12.000 rcf ve +4°C’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Tüp içerisinde oluşan 3 fazdan en üstteki faz kısmı yeni ependorf tüpe alındı. Her ependorf tüp içerisine 500 µl izopropanol eklendi ve pipetaj yapıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

12.000 rcf ve +4°C’de 10 dakika santrifüj işleminden sonra tüp içerisindeki süpernatant atıldı. Pellet üzerine 1 ml %75 etanol konuldu ve -20°C’de 20 dakika bekletildi. 7.500 rcf ve +4°C’de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı atıldı. Tüp içerisindeki etanol tamamen uçurulduktan sonra tüp içerisine 50 µl RNase içermeyen su eklendi ve 56°C’de 15 dakika tutuldu. Elde edilen RNA örneklerinin her birinde 1 µl alınarak nanodrop cihazından ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlarda A260:A280 ve A260:A230 dalga boylarındaki ölçümler ile RNA’nın saflık ve kalitesi belirlendi ve konsantrasyon miktarı belirlendi.

3.2.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Belirlenen RNA konsantrasyonlarına göre 100 ng/µl olacak şekilde miktarlar belirlendi. Her bir grubun cDNA sentezi için 10 µl master mix hazırlandı. Master mix içerisinde 10X reaksiyon tamponu, 20X dNTP karışımı, random hekzamer primer, revers transkriptaz, RNAaz inhibitörü ve RNAaz free su bulunmalıdır. Hazırlanan master mix mikrosantrifüj tüp içerisine alınarak üzerlerine 10 µl RNA örnekleri eklendi. Hava kabarcığının engellenmesi için santrifüj yapıldı. Tüpler buz üzerine alındı ve işlemler buz üstünde devam etti. cDNA sentez reaksiyonu termal cycle cihazı ile sırasıyla 25°C (10 dakika), 37°C (85 dakika), 85°C (5 dakika) adımları ile gerçekleşti ve Reaksiyon için BioRad T100 Thermal Cycler cihazı kullanıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen cDNA örnekleri -20°C’de saklandı.

3.2.6. Real Time PCR (RT-PCR)

Reaksiyon, SUGENOMICS qPCR kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kit içinde bulunan syber master mix ve RNaz içermeyen su oda sıcaklığında çözülerek santrifüj edildi ve buz üzerinde bekletildi. Deneyde kullanılacak olan primerler nükleaz içermeyen su ile çözündürülerek 100 µM konsantrasyona sahip olacak şekilde stoklar hazırlandı. PCR reaksiyonunda kullanılacak olan primerlerin baz dizileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2. qPCR’da kullanılan primer baz dizileri.

Gen	Forward (5’-3’)	Reverse (5’-3’)
GLT-1	AACAATATGCCCAAGCAGGT	CTCCCAGGATGACACCAAAC
β-tubulin	AACTGGGACGACATGGAGAA	GAAGGTCTCAAACATGATCTGG

20 µl reaksiyon hazırlamak için 96’lık qPCR plate’lerinde sırasıyla; qPCR SYBR master mix (1 örnek için: 10 µl), 10 uM forward primer (1 örnek için: 1 µl), 10 uM reverse primer (1 örnek için: 1 µl), RNaz içermeyen su (1 örnek için: 3 µl) ve cDNA (1 örnek için: 5 µl) reaktifleri hazırlandı. Daha sonra yavaşça pipetaj yapılarak karıştırıldı. Pipetajın ardından hızlı bir şekilde santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüjden sonra qPCR plate’i RT-PCR cihazına yerleştirildi. qPCR döngüleri aşağıdaki gibi ayarlanarak reaksiyon başlatıldı.

Tablo 3. qPCR reaksiyon basamakları.

Sıcaklık	Zaman	Döngü
95°C	5 dakika	1
90°C	20 saniye	50
58°C	20 saniye	50
72°C	30 saniye	50
4°C	∞	

mRNA ifadeleri, β-aktin mRNA seviyelerine oranlanarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Kromatin İmmünopresipitasyon (CHIP)

CREB ve REST proteinlerinin, GLT-1 promotorundaki konsensus dizilerine bağlanıp bağlanmadığını belirlemek için gerçekleştirilen kromatin immünopresipitasyon (CHIP) tekniği Thermofischer Scientific'ten Pierce™ Magnetic ChIP (Catalog no: 26157) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney basamakları kitte bulunan protokole göre uygulanmıştır. Kısaca, %16 Formaldehit ile DNA-protein komplekslerini oluşturmak için kabin içerisinde krosslinking yaptıktan sonra, kitte bulunan solüsyonlar ile hücreler parçalandı ve kroslink olmuş olan DNA-protein kompleksleri, solubilize edildi. Daha sonra, kompleksler CREB ve REST antikoları ile inkübe edildi ve Pierce CHIP-grade Protein A/G Magnetic Beads (Manyetik Boncuklar) ile izole edildi. Kitteki protokole göre, krosslink tersine çevrildikten ve protein-DNA kompleksleri mikro tip sonikatör ile parçalandıktan sonra, DNA fragmanları elde edildi. Son olarak DNA bölgeleri CREB ve REST bölgeleri primerleri kullanılarak qPCR ile tespit edildi. Bu analizlere göre, GLT-1 promotorunda bulunan transkripsiyon faktörlerinin primer dizileri aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 4. CHIP tekniğinde kullanılacak olan genlerin Forward primer baz dizileri.

Gen	Forward (5'-3')
CREB	GCG GCG GTT AAA GGA GTT
REST 1. Bölge	GAG CTG AAG CGG GTG CTC
REST 2. Bölge	TGA TGT CAG CTC TCG ACG AA

Tablo 5. CHIP tekniğinde kullanılacak olan genlerin Reverse primer baz dizileri.

Gen	Reverse (5'-3')
CREB	GGC TAA ACC TTG CAA TCC CT
REST 1. Bölge	AAT TAG CCA AAT AAG AAA AGA GG
REST 2. Bölge	AGA GAG TGG TGG CAG AGG AC

3.2.8. İstatistiksel Analiz

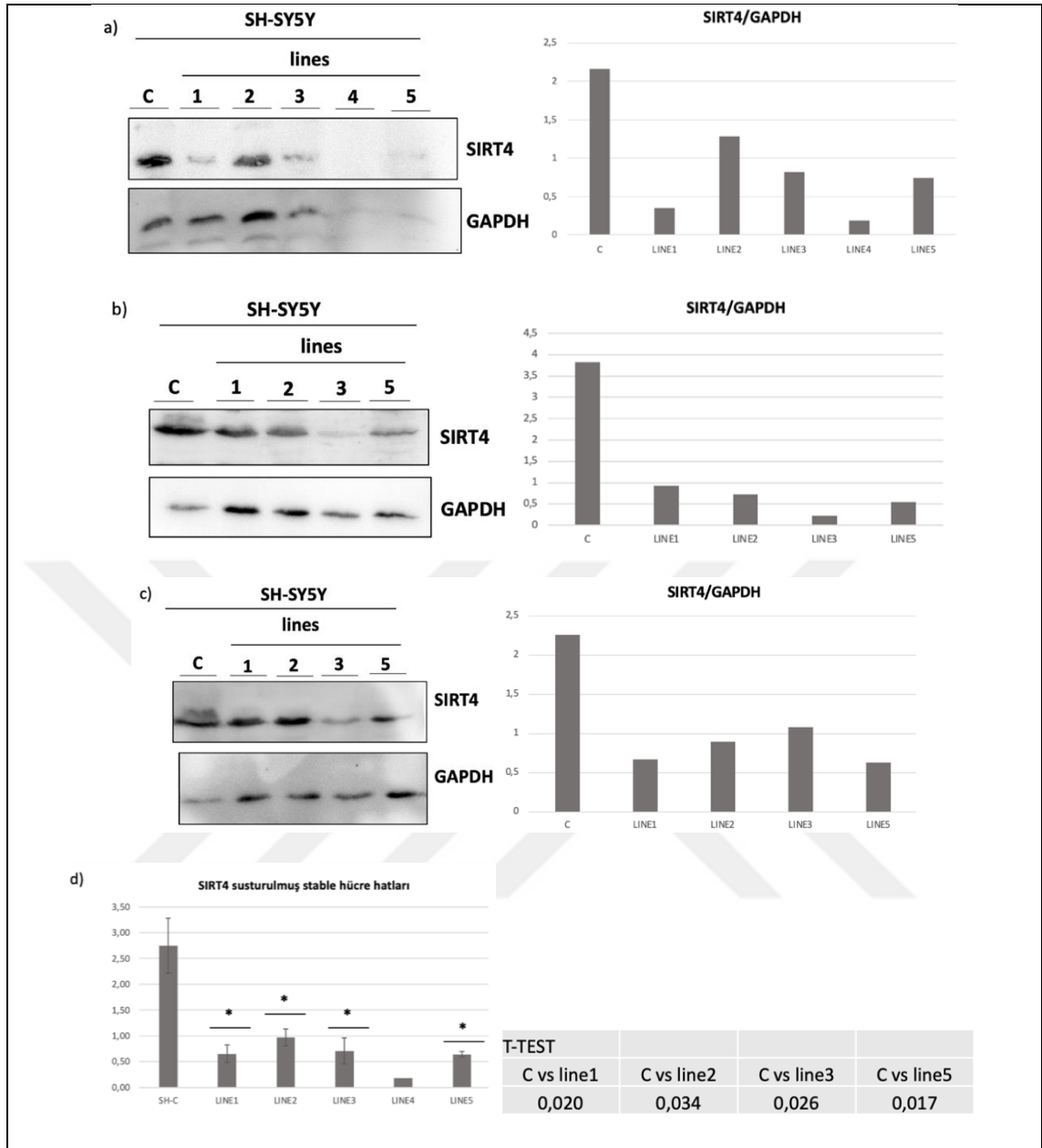
İstatistik yazılım programları kullanılarak gerçekleştirildi. İki örnek grubun ortalamaları arasındaki fark için “Unpaired two tailed Student’s t-test” kullanılacaktır. $p < 0.05$ değerini taşıyanlar anlamlı farklılık olarak görüldü. Hata çubukları (error bar) SEM’i temsil etmektedir.

4. BULGULAR

4.1. SIRT4 Susturulmuş Kararlı Hücre Hattı Belirlenmesi

SH-SY5Y hücre hattına SIRT4 shRNA geni içeren lentiviral partikül muamelesi yapılarak SIRT4 susturulmuş kararlı SH-SY5Y hücre hattı oluşturuldu. Bu uygulama sırasında beş farklı SIRT4 geni susturulmuş SH-SY5Y hücre hattı elde edildi. Elde edilen tüm hücre hatları büyütülüp çoğaltıldı. Deneylerde kullanılacak SIRT4 geni susmuş deney grubunu belirlemek için elde edilen hücre hatlarında SIRT4 ekspresyon seviyelerine Western Blot yöntemi ile bakıldı.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hücre hatlarının hepsinde SIRT4 protein seviyeleri kontrol hücre grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı. Dolayısıyla, SIRT4 shRNA içeren lentiviral partiküller ile yapılan susturma işlemi sonucu, SIRT4'ün tüm hücre hatlarında başarılı bir şekilde sustuğu gösterildi. İstatistiksel hesaplamalar ve hücrelerin çoğalma hızı göz önünde bulundurulduğunda deneylerde kullanılmak üzere hücre hattı 3'ün (Line 3) en uygun SIRT4 susturulmuş kararlı hücre hattı olduğuna karar verildi (Şekil 12).



Şekil 12. SH-SY5Y hücrelerinde SIRT4 geni susturulmuş kararlı hücre hattı oluşturulması. **a)** SH-SY5Y hücrelerinde SIRT4 protein seviyeleri Western Blot ile gösterilmiştir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. C: kontrol, Line1, Line2, Line3, Line4, Line5: SIRT4 susturulmuş Hücre Hattı 1, Hücre Hattı 2, Hücre Hattı 3, Hücre Hattı 4, Hücre Hattı 5. **b)** SH-SY5Y hücrelerinde SIRT4 protein seviyeleri Western Blot ile gösterilmiştir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. C: kontrol, Line1, Line2, Line3, Line5: SIRT4 susturulmuş Hücre Hattı 1, Hücre Hattı 2, Hücre Hattı 3, Hücre Hattı 5. **c)** SH-SY5Y hücrelerinde SIRT4 protein seviyeleri Western Blot ile gösterilmiştir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. C: kontrol, Line1, Line2, Line3, Line5: SIRT4 susturulmuş Hücre Hattı 1, Hücre Hattı 2, Hücre Hattı 3, Hücre Hattı 5. **d)** Tüm hücre hatları kontrol ile kıyaslanmıştır. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir.

(ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, # $p \leq 0.0001$)

4.2. GLT-1 Protein İfade Seviyesinin Belirlenmesi

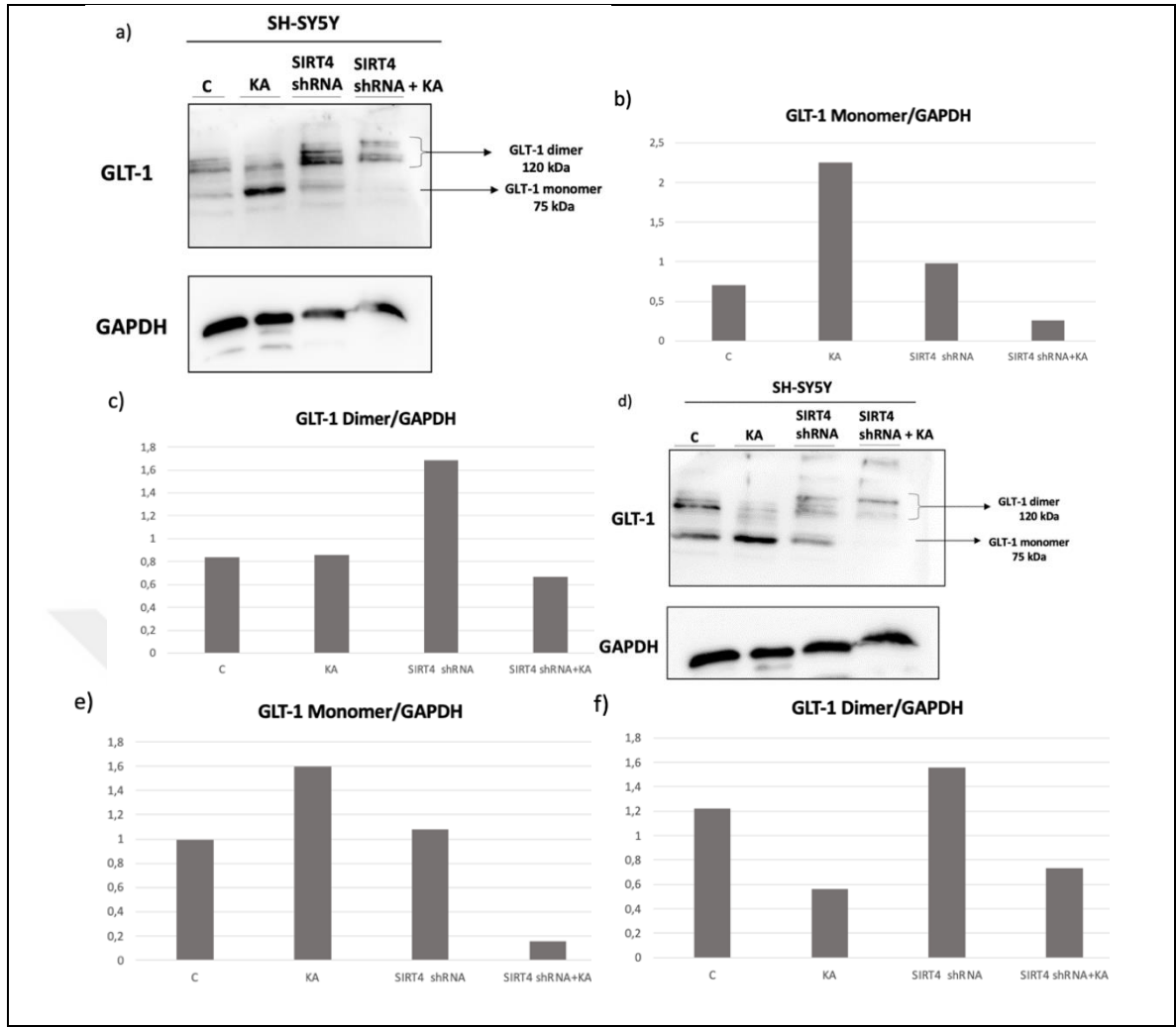
SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubu, kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş grup, SIRT4 susturulmuş grup ve kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarındaki GLT-1 protein ifadesi düzeyinin belirlenmesi Western Blot yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen Western Blot sonuçlarında GLT-1 molekülünün oligomerik yapılarına ait bantlar oluşturulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 13).

Kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde monomer GLT-1 ifadesinde, kontrol hücrelerine göre artış gözlenmiştir. Monomer GLT-1 ifadesi kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarında, SIRT4 susturulmuş gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır. Kainik asit ile muamele edilen gruplarda SIRT4 geninin susturulmuş olması monomer GLT-1 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açmıştır (Şekil 13g).

Dimer GLT-1 ekspresyonu, kainik asit ile muamele edilmiş gruplarda kontrol grubuna göre azalmıştır. Eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarında, SIRT4 susturulmuş gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 13h).

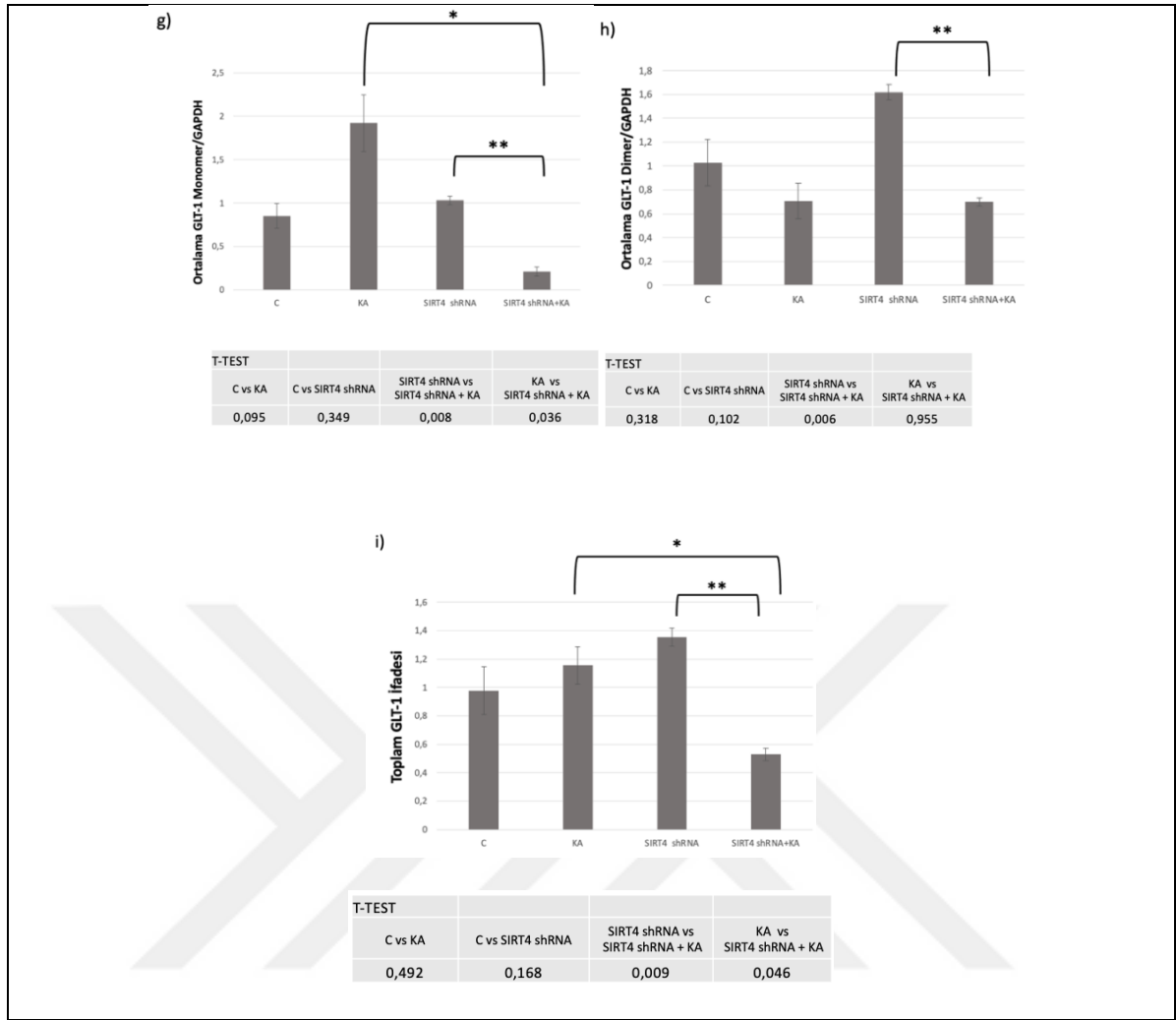
Eksitotoksisite modeli oluşturulmuş gruplara göre eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarında toplam GLT-1 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalmıştır. Benzer şekilde eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarında toplam GLT-1 ifadesi, sadece SIRT4 geni susmuş gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 13i).

GLT-1'in dimer bantlarının üstlerinde yüksek moleküler ağırlıkta yürüyen bantlar gözlemlenmiş ve bu bantların GLT-1'in farklı post translasyonel modifikasyonlarına (glikozilasyon gibi) ait bantlar olduğu düşünülmüştür.



Şekil 13. SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 ekspresyon seviyeleri. **a)** Western Blot yöntemi ile SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 monomerleri ve dimerleri protein seviyeleri gösterilmiştir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. C: kontrol, KA: kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA: SIRT4 susturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA+KA: SIRT4 susturulmuş ve kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş hücreler. **b)** Monomer GLT-1/GAPDH oranı. **c)** Dimer GLT-1/GAPDH oranı. **d)** Western Blot yöntemi ile SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 monomerleri ve dimerleri protein seviyeleri, GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. C: kontrol, KA: kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA: SIRT4 susturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA+KA: SIRT4 susturulmuş ve kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş hücreler. **e)** Monomer GLT-1/GAPDH oranı. **f)** Dimer GLT-1/GAPDH oranı. **g)** Ortalama monomer GLT-1/GAPDH oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. **h)** Ortalama dimer GLT-1/GAPDH oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. **i)** Toplam GLT-1/GAPDH oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir.

(ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, # $p \leq 0.0001$)

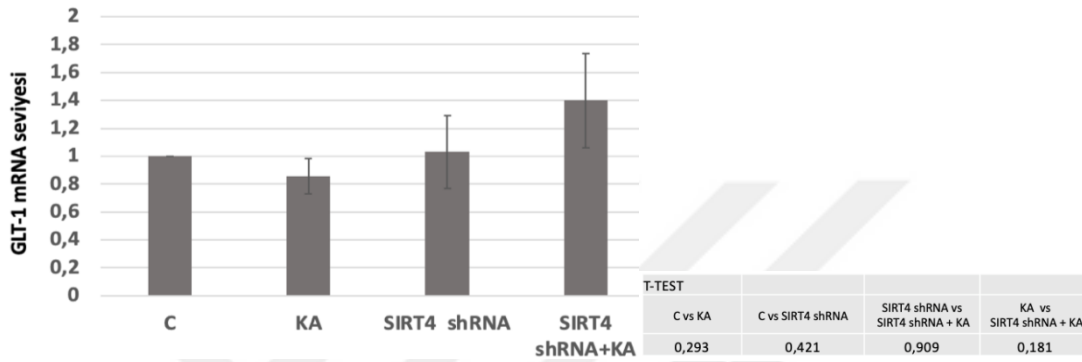


Şekil 13. SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 ekspresyon seviyeleri. **a)** Western Blot yöntemi ile SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 monomerleri ve dimerleri protein seviyeleri gösterilmiştir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. C: kontrol, KA: kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA: SIRT4 susturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA+KA: SIRT4 susturulmuş ve kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulmuş hücreler. **b)** Monomer GLT-1/GAPDH oranı. **c)** Dimer GLT-1/GAPDH oranı. **d)** Western Blot yöntemi ile SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 monomerleri ve dimerleri protein seviyeleri, GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. C: kontrol, KA: kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA: SIRT4 susturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA+KA: SIRT4 susturulmuş ve kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulmuş hücreler. **e)** Monomer GLT-1/GAPDH oranı. **f)** Dimer GLT-1/GAPDH oranı. **g)** Ortalama monomer GLT-1/GAPDH oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. **h)** Ortalama dimer GLT-1/GAPDH oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. **i)** Toplam GLT-1/GAPDH oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir.

(ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, # $p \leq 0.0001$) (devamı)

4.3. GLT-1 mRNA seviyesinin belirlenmesi

SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulmuş dört deney grubunda GLT-1'in mRNA düzeyinin belirlenmesi için qPCR yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubu, kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş grup, SIRT4 susturulmuş grup ve kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplar arasında GLT-1 mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi (Şekil 14).



Şekil 14. SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 mRNA ifadesinin seviyeleri. C: kontrol, KA: kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA: SIRT4 susturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA+KA: SIRT4 susturulmuş ve kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş hücreler. P değerlerinin 0,05'ten büyük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir.

(ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, # $p \leq 0.0001$)

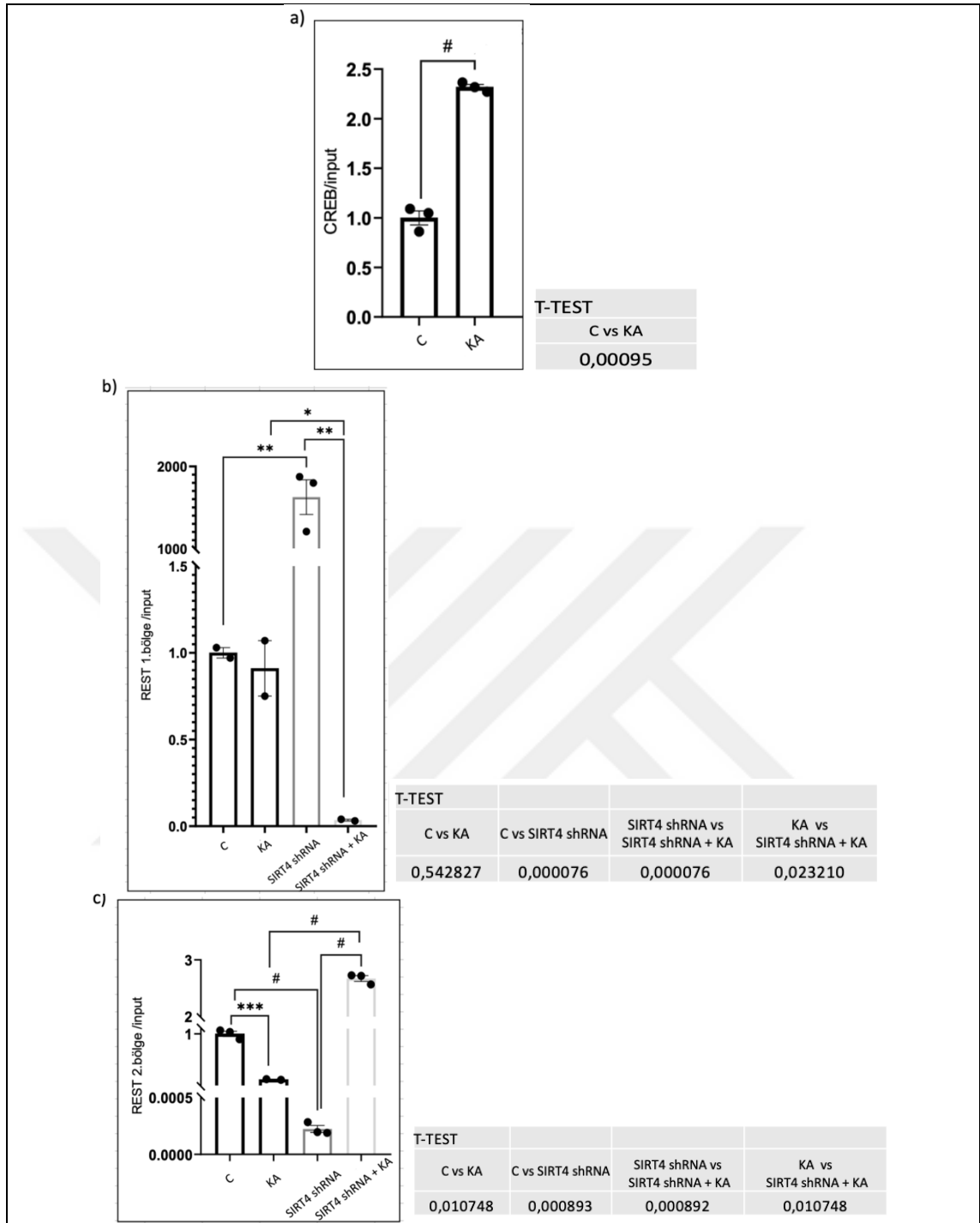
4.4. GLT-1 promotoru ve CREB ve REST transkripsiyon faktörlerinin etkileşiminin CHIP metodu ile gösterilmesi

SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubu, kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş grup, SIRT4 susturulmuş grup ve kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarındaki, GLT-1 promotoruna bağlanan CREB ve REST transkripsiyon faktörlerinin değişimini göstermek için kromatin immünopresipitasyon (CHIP) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde deney gruplarından CHIP yolu ile elde edilen DNA-protein kompleksleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda GLT-1 promotoruna bağlanabilen transkripsiyon faktörü CREB'in analizinde, kontrol ve kainik asit verilerek eksitotoksisite modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı

bir değişim gözlemlenmiştir. Kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş gruplarda kontrol ve SIRT4 susmuş SH-SY5Y hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmüştür (Şekil 15a). Bu sonuç, CREB'in GLT-1 promotoruna bağlanmasının KA ile eksitotoksisite oluşturulduğu durumda arttığını göstermektedir (Şekil 15a).

REST transkripsiyon faktörünün 1. bölgesi için bakılan sonuçlarda kontrol ve kainik asit verilerek eksitotoksisite modeli oluşturulmuş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. SIRT4'ün susturulması kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişimlere yol açmıştır. SIRT4 susturulmuş grup ve SIRT4 susturulmuş kainik asitli grupta istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlemlenmiştir. Eksitotoksisite oluşturulmuş gruplar karşılaştırıldığında, SIRT4'ün susturulması istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olmuştur. (Şekil 15b). SIRT4'ün susturulması ile REST'in GLT-1 promotorunda bağlandığı 1. bölgeye bağlanması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Kontrol ile KA). SIRT4 susturulmuş hücrelerde, KA verildiğinde ise REST'in 1. bölgeye bağlanması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (SIRT4 shRNA ile SIRT4 shRNA +KA). Eksitotoksisite oluşturulmuş hücreler karşılaştırıldığında ise SIRT4'ün susturulması yine bağlanmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (KA ile SIRT4 shRNA + KA). Bu sonuçlar Şekil 15b'de gösterilmiştir.

REST transkripsiyon faktörünün 2. bölgesi için gözlemlenen qPCR sonucunda SIRT4'ün susturulması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değişimlere yol açmıştır. Eksitotoksisite modeli oluşturulmuş gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlemlenmiştir (Şekil 15c). KA verilerek eksitotoksisite oluşturulan hücrelerde, REST'in GLT-1 bölgesinde bağlandığı 2. bölgeye bağlanması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Kontrol ile KA). SIRT4'ün susturulması ile REST'in GLT-1 promotorunda bağlandığı 2. bölgeye bağlanması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Kontrol ile SIRT4 shRNA). SIRT4 susturulmuş hücrelerde, KA verildiğinde ise REST'in 2. bölgeye bağlanması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (SIRT4 shRNA ile SIRT4 shRNA+KA). Eksitotoksisite oluşturulmuş hücreler karşılaştırıldığında ise SIRT4'ün susturulması bağlanmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır (KA ile SIRT4 shRNA + KA). SIRT4'ün susuturulduğu hücrelerde, KA verildiğinde bağlanma istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu sonuçlar Şekil 15c'de gösterilmiştir.



Şekil 15. SH-SY5Y hücrelerinde qPCR ile yapılan CHIP Enrichment Test sonuçları. **a)** CREB/input oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. **b)** REST 1. bölge/input oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. **c)** REST 2. bölge/input oranı. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. C: kontrol, KA: kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA: SIRT4 susturulmuş hücreler, SIRT4 shRNA+KA: SIRT4 susturulmuş ve kainik asit ile eksitotoksosite modeli oluşturulmuş hücreler.

(ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, # $p \leq 0.0001$)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde GLT-1 ekspresyonu, degradasyonu ve GLT-1 promotorundaki transkripsiyon faktörleri (CREB ve REST) üzerinde SIRT4'ün etkisinin nasıl olduğunun aydınlatılması amaçlandı. Aynı zamanda bu etkinin eksitotoksisite durumunda değişimi gözlemlenmeye çalışıldı. SH-SY5Y hücre hattında, SIRT4'ü susturmak için dizayn edilmiş olan shRNA genini içeren lentiviral partiküller kullanılarak SIRT4 geni susturulmuş kararlı SH-SY5Y hücre hattı elde edildi. SIRT4 geninin susturulduğunu göstermek için Western Blot yöntemi ile SIRT4 protein ifadeleri belirlendi. Bu uygulama sonucunda en başarılı şekilde susmuş hücre hattı ile devam edildi. Kontrol SH-SY5Y hücreleri ve SIRT4 geni susturulmuş kararlı SH-SY5Y hücreleri kainik asit ile muamele edilerek eksitotoksisite modeli oluşturuldu. Bu şekilde kontrol SH-SY5Y, SIRT4 susturulmuş SH-SY5Y, kainik asit ile muamele edilmiş SH-SY5Y ve hem kainik asit ile muamele edilmiş hem de SIRT4 susturulmuş grup olmak üzere dört deney grubu oluşturuldu.

Dört deney grubundaki GLT-1 ifadelerine Western Blot yöntemi kullanılarak bakıldı. Sonrasında dört deney grubundaki GLT-1 mRNA seviyeleri qPCR yöntemi kullanılarak belirlendi. GLT-1 promotoruna bağlanan transkripsiyon faktörlerinin (CREB ve REST) etkileşimi CHIP (Kromatin İmmünopresipitasyon) metodu ile dört deney grubunda gösterildi.

SIRT4'ü susturmak shRNA genini içeren lentiviral partiküller kullanılan SIRT4 geni susturulmuş kararlı SH-SY5Y hücre hattı elde edilmesi protokolü sonucunda toplam beş farklı SIRT4 geni susturulmuş SH-SY5Y hücre hattı elde edildi. Bu hücre hatlarında başarılı susturma yapıldığını göstermek ve deneylere devam edilecek hücre hattını belirlemek amacıyla Western Blot yöntemi uygulanarak SIRT4 protein seviyeleri kontrol grubuyla kıyaslandı. Yapılan ilk deney sonrasında Line 4 hücre hattı çoğalamadı ve hücre hattı sonlandı (Şekil 12a). Geriye kalan tüm hücre hatlarının başarılı bir şekilde sustuğu gözlemlendi ve protein seviyelerindeki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Şekil 12d). Deneyler için gerekli olan sağlıklı çoğalma ve çoğalma hızı yüksek olma koşullarını karşılayan Line 3'ün deneylerde kullanılmasına karar verildi. SIRT4 geni susturulmuş diğer SH-SY5Y hücre hatları çok sayıda çoğaltılıp dondurularak saklandı.

GLT-1, EAAT2 olarak da bilinen, nöronal hücrelerde astroglial lokalizasyona sahip, yüksek afiniteli, Na⁺-bağımlı bir glutamat taşıyıcısıdır. Merkezi sinir sistemi sinapslarında salınan glutamatın büyük kısmının temizlenmesinden sorumludur. Bu sebeple glutamaterjik nörotransmisyonun şekillendirilmesinde ve eksitotoksitenin sınırlandırılmasında önemli bir rolü vardır (Boston-Howes ve ark, 2006). Sirtuinler, NAD⁺-bağımlı deasetilazlar ve ADP-riboziltransferazlardır. Birçok biyolojik süreçte yer alan kritik metabolizma düzenleyicileridir. SIRT4 beyinde eksprese edilen mitokondriyal sirtuin olup insülin salgılanması ve glukoz homeostazının sürdürülmesinde kritik bir rol oynar (Hong ve ark, 2018). SIRT4 kaybının beyinde GLT-1 ekspresyonunu azalttığı ve eksitotoksik bir madde olan kainik asit karşı şiddetli bir reaksiyona yol açtığı daha önceki çalışmalardan bilinmektedir. Bu bilgi doğrultusunda yapılan bir çalışmada, SIRT4 aşırı ekspresyonunun kainik asit tedavisinden sonra hücre canlılığını artırdığını gözlemlenmiştir (Yalçın ve Çolak, 2020). Haugeto ve arkadaşları (1996) tarafından yapılan bir çalışmanın sonucunda sıçan beyni glutamat taşıyıcı proteinlerinden GLT-1'in hücre içinde monomer, dimer ve trimer gibi homomultimerler oluşturduğu bilinmektedir (Haugeto ve ark, 1996). Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada, glioblastoma ve glial hücre hatlarında GLT-1 protein ifadelerine bakılmıştır ve glioblastoma hücrelerinin glia hücrelerine oranla GLT-1 monomer ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Dağdelen ve ark, 2021). Yapılan başka bir çalışmada GLT-1'in, glia ve glioblastoma hücrelerinde multimerik yapılar oluşturduğu gösterilmiştir. Glia hücrelerinin SIRT4 susturulmuş ve kontrol gruplarında GLT-1 monomer yapılarında bir değişiklik görülmemiştir. Bunun yanında glioblastoma hücrelerinde ise GLT-1 monomer yapılarının ifadesi SIRT4 susturulması ile değişmezken, GLT-1 dimer ve trimer bantlarının üstünde yüksek moleküler ağırlıklı bantlar gözlenmiştir (Yeşilören ve Yalçın, 2023).

Bu sonuçlardan yola çıkarak, nöroblastoma hücrelerinde, GLT-1 ifadesinin ve oligomerizasyon yapısının; SIRT4 yokluğundan ve KA ile indüklenmiş eksitotoksiste koşullarında nasıl değiştiğini araştırmayı amaçladık. Tasarladığımız deneyler ile SIRT4'ün glioblastoma hücrelerinde olduğu gibi nöroblastoma hücrelerinde de GLT-1 ifadesini ve oligomerizasyonunu kontrolü aydınlatıldı. KA ile indüklenmiş eksitotoksiste varlığında, SHSY-5Y hücrelerinde GLT-1 ifadesinin ve oligomer yapılarının değişimi gözlemlendi. Öncelikle, sonuçlarımızda SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 monomer ve dimer yapılarının varlığını gösterildi. GLT-1 monomerlerinin ifadesinin eksitotoksiste durumunda kontrol hücrelerine göre arttığı görülmektedir. SIRT4 susturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 monomer ifadesi, kainik asit ile muamele edilmiş SIRT4 susturulmuş SH-SY5Y

hücrelerindeki GLT-1 monomer ifadesinden daha fazladır. Monomer GLT-1 ifadesi kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarında, SIRT4 susturulmuş gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Diğer yandan kainik asit ile muamele edilen gruplarda SIRT4 geninin susturulmuş olması monomer GLT-1 ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açmıştır (Şekil 13g).

GLT-1 dimer ifadesi ise eksitotoksiste durumunda, kontrol hücrelerine göre azalmıştır. Ancak SIRT4 susturulmuş hücrelerde GLT-1 dimer ifadesi kontrol hücrelerine ve kainik asit ile muamele edilmiş SIRT4 susturulmuş hücreler göre daha fazladır (Şekil 13h). Dimer yapıların üst kısımlarında daha yüksek moleküler ağırlığa sahip bantların post translasyonel modifikasyona uğramış ve glikolize olmuş GLT-1'i gösteren protein bantları olduğu düşünülmüştür. Bu düşüncenin temeli glikolizasyonun yüksek moleküler ağırlığa sahip yapılar oluşmasında etkili olduğunun bilinmesidir.

Eksitotoksisite modeli oluşturulmuş gruba göre eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş grubunda toplam GLT-1 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalmıştır. Benzer şekilde eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarında toplam GLT-1 ifadesi, sadece SIRT4 geni susmuş gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 13i).

GLT-1 mRNA ifadesi seviyesini belirlemek için qPCR yöntemi uyguladık. Elde ettiğimiz sonuçlarda, kontrol grubu, kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş grup, SIRT4 susturulmuş grup ve kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplar arasında GLT-1 mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç SIRT4'ün SH-SY5Y hücrelerinde GLT-1 mRNA ifadesini düzenlemediğini dolayısıyla protein ifadesi düzeyinde etkin olabileceğini göstermektedir (Şekil 14).

Transkripsiyon faktörleri, DNA'ya bağlanarak belirli genlerin transkripsiyonunu artırabilir veya azaltabilirler. Bu süreçte, RNA polimerazın belirli bir gene erişimini ve o genin mRNA'ya çevrilmesini kontrol ederler. Transkripsiyon faktörlerinin işlevleri, hücre gelişim, farklılaşma, hücre döngüsü ve cevap mekanizmaları gibi çeşitli biyolojik süreçlerde hayati öneme sahiptir. Transkripsiyon faktörleri, DNA'nın belirli dizilerine bağlanır. Bu dizilere "transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri" denir (Latchman,1997). Çalışmamızda, Kromatin İmmünopresipitasyon (CHIP) yöntemi kullanarak GLT-1 promotoruna bağlanan CREB ve REST transkripsiyon faktörlerinin etkinliğini gösterdik. Oluşturduğumuz deney

gruplarında (Kontrol SH-SY5Y hücreleri, kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücreleri, SIRT4 susturulmuş SH-SY5Y hücreleri ve kainik asit ile eksitotoksisite modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş SH-SY5Y hücreleri) arasında kromatin immünopresipitasyon sonrası qPCR deneyleri gerçekleştirilmiştir.

CREB (cAMP Response Element-Binding protein), hücre içi sinyalleme yolları tarafından aktive edilen ve gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. CREB, nöronlarda sinaptik bağlantıların güçlendirilmesi ve uzun süreli hafıza oluşumu için kritik bir role sahiptir. Özellikle, CREB'in aktivasyonu, yeni protein sentezini teşvik ederek nöral devrelerin yeniden düzenlenmesini destekler (Lonze ve Ginty, 2002). Çalışmamız sonucunda CREB'in GLT-1 promotoruna bağlandığını gösterdik ve SIRT4'ün susturulmasının CREB'in GLT-1 promotoruna bağlanmasına etkisi olmadığını bulduk. Analizde kontrol ve kainik asit verilerek eksitotoksisite modeli oluşturulmuş SH-SY5Y hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemledik. Bu sonuç, CREB'in GLT-1 promotoruna bağlanmasının KA ile eksitotoksisite oluşturulduğu durumda arttığını göstermektedir.

REST (RE1-Silencing Transcription factor), nöronal genlerin ekspresyonunu baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür. REST, özellikle nöronal olmayan hücrelerde nöronal genlerin ifadesini baskılayarak hücre tipi spesifik gen ekspresyonunu düzenler. REST, nöronal olmayan hücrelerde aktif olup nöronal genlerin ifadesini baskılar, böylece bu hücrelerin nöronal olmayan fenotiplerini korumasına yardımcı olur. Nöronal hücrelerde ise REST'in ekspresyonu düşüktür veya işlevsel değildir, bu da nöronal genlerin ekspresyonuna izin verir (Mozzi ve ark, 2017, Ballas ve ark, 2005). Gerçekleştirdiğimiz CHIP deneyinde, REST transkripsiyon faktörünün 1. bölgesi için bakılan sonuçlarda kontrol ve kainik asit verilerek eksitotoksisite modeli oluşturulmuş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemleyemedik. SIRT4'ün susturulması kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişimlere yol açtığını gördük. SIRT4 susturulmuş grup ve SIRT4 susturulmuş kainik asitli grupta istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlemledik. Eksitotoksisite oluşturulmuş gruplar karşılaştırıldığında, SIRT4'ün susturulması istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olduğunu bulduk. (Şekil 15b). SIRT4'ün susturulması ile REST'in GLT-1 promotorunda bağlandığı 1. bölgeye bağlanması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Kontrol ile KA). SIRT4 susturulmuş hücrelerde, KA verildiğinde ise REST'in 1. bölgeye bağlanması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (SIRT4 shRNA ile SIRT4 shRNA +KA). Eksitotoksisite oluşturulmuş hücreler

karşılaştırıldığında ise SIRT4'ün susturulması yine bağlanmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (KA ile AIRT4 shRNA + KA). Bu sonuçlar Şekil 15b'de gösterilmiştir.

REST transkripsiyon faktörünün 2. bölgesi için gözlemlenen qPCR sonucunda SIRT4'ün susturulması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değişimlere yol açtığını gördük. Eksitotoksisite modeli oluşturulmuş gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlemledik (Şekil 15c). KA verilerek eksitotoksisite oluşturulan hücrelerde, REST'in GLT-1 bölgesinde bağlandığı 2. bölgeye bağlanması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Kontrol ile KA). SIRT4'ün susturulması ile REST'in GLT-1 promotorunda bağlandığı 2. bölgeye bağlanması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Kontrol ile SIRT4 shRNA). SIRT4 susturulmuş hücrelerde, KA verildiğinde ise REST'in 2. bölgeye bağlanması istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (SIRT4 shRNA ile SIRT4 shRNA+KA). Eksitotoksisite oluşturulmuş hücreler karşılaştırıldığında ise SIRT4'ün susturulması bağlanmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırmıştır (KA ile SIRT4 shRNA + KA). SIRT4'ün susuturulduğu hücrelerde, KA verildiğinde bağlanma istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu sonuçlar Şekil 15c'de gösterilmiştir.

Ancak GLT-1 mRNA seviyelerinde gruplar arasında bir değişiklik gözlenmemiş olması, CREB ve REST transkripsiyon faktörlerinde gördüğümüz bağlanma farklılıklarının, SHSY-5Y hücrelerinde, mRNA transkripsiyon sonucunu etkilemediğini göstermektedir. Bu koşullarda farklı transkripsiyon faktörlerinin etkili olabileceği düşünülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada SIRT4'ün, insan nöroblastoma hücrelerinde (SH-SY5Y) birçok beyin hastalığında rol oynayan eksitotoksitenin oluşmasında etken molekül olan GLT-1'in ekspresyonunu ve degradasyonunu nasıl düzenlediği ve GLT-1 promotorundaki transkripsiyon faktörleri üzerine etkisinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Ayrıca, özellikle kainik asit kaynaklı eksitotoksiste durumunda bu düzenlemelerin nasıl değiştiğinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

SH-SY5Y hücrelerinde SIRT4 shRNA içeren lentiviral partiküller aracılığıyla SIRT4'ün susturulması hedeflendi ve bu çalışma sonucunda SIRT4 geni susturulmuş beş farklı kararlı hücre hattı elde edilmiştir. Kontrol SH-SY5Y ve oluşturulan SIRT4 geni susturulmuş beş farklı kararlı hücre hattı gruplarından izole edilen proteinler ile gerçekleştirilen Western Blot sonucunda SIRT4 geninin tüm hücre hatlarında başarılı bir şekilde susturulduğu gösterilmiştir. Uygun şartları sağlayan tek bir hücre hattı seçilerek diğer deneylerde kullanılmak üzere çoğaltılmaya devam etmiştir.

Daha sonra SH-SY5Y kontrol hücrelerinde ve SIRT4 geni susturulmuş SH-SY5Y hücrelerinde 24 saatlik kainik asit muamelesi yardımıyla eksitotoksiste modeli oluşturulmuştur. Bunun sonucunda toplam dört deney grubu elde edilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde kontrol grubu, kainik asit ile eksitotoksiste modeli oluşturulmuş grup, SIRT4 susturulmuş grup ve kainik asit ile eksitotoksiste modeli oluşturulan SIRT4 susturulmuş gruplarındaki GLT-1 ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için her gruptan protein izolasyonu yapılarak Western Blot yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda GLT-1'in nöroblastoma hücrelerinde oligomerik yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir. GLT-1 monomer oluşumunda, eksitotoksiste modeli oluşturmanın, kontrol hücrelerine göre anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı görülmüştür. Ancak SIRT4 geni susturulmuş grupta eksitotoksiste oluşturmanın, SIRT4 geni susturulmuş kontrol grubun arasında anlamlı bir azalma gösterdiği bulunmuştur. Bunun yanı sıra eksitotoksiste oluşturulmuş gruplarda SIRT4 geninin susturulmasının GLT-1 monomer oluşumunu azaltmakta olduğu gösterilmiştir. GLT-1 dimer oluşumunda sadece, SIRT4 geni susturulmuş iki grup arasında eksitotoksiste oluşturmanın, GLT-1 dimer oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. Toplam GLT-1 ifadesi ise monomer GLT-1 ekspresyonu ile benzerlik

göstermektedir. SIRT4 geni susturulmuş iki grup arasında eksitotoksisite oluşturmak toplam GLT-1 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmaktadır. Bunun yanında eksitotoksisite oluşturulmuş iki grup arasında SIRT4 geninini susturmak yine toplam GLT-1 ifadesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmaktadır.

Ardından dört deney grubunda GLT-1 mRNA seviyeleri, qPCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre dört deney grubu arasında, GLT-1 mRNA seviyesinin, istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği gözlemlenmiştir.

Son olarak, GLT-1 promotorunda yer alan CREB ve REST transkripsiyon faktörlerinin, GLT-1 promotoruna bağlanıp bağlanmadığı yapılan CHIP (Kromatin İmmünopresipitasyon) deneyleri ile gösterilmiştir. CHIP analizinde, transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı DNA bölgeleri qPCR ile çoğaltılmıştır. Gerçekleştirilen qPCR deneylerinin sonucunda CREB ve REST transkripsiyon faktörlerinin GLT-1 promotoruna bağlandıkları doğrulanmıştır. Ancak transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasında gözlemlenen farklılık GLT-1 mRNA ifadesine sirayet etmemiştir. Bu sonuç, SH-SY5Y hücrelerinde bu koşullarda farklı transkripsiyon faktörlerinin etkili olabileceğini göstermiştir. İleriki çalışmalarda, GLT-1 promotoruna +32. sekansta bağlanan YY1 (Yin-Yang 1) transkripsiyon faktörünün denenebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Ahuja, N., Schwer, B., Carobbio, S., Waltregny, D., North, B. J., Castronovo, V., Maechler, P., and Verdin, E. (2007). Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 282(46), 33583–33592.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. and Mirsky, A. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(5), 786–794.
- Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C., and Mandel, G. (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*, 121(4), 645–657.
- Benarroch, E.E. (2010). Glutamate transporters. *Neurology*, 74(3), pp. 259–264.
- Bhatnagar, A., Parmar, V., Barbieri, N., Bearoff, F., Elefant, F., and Kortagere, S. (2023). Novel EAAT2 activators improve motor and cognitive impairment in a transgenic model of Huntington's disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 17, 1176777.
- Blackshaw, L.A., Page, A.J. and Young, R.L. (2011). Metabotropic glutamate receptors as novel therapeutic targets on visceral sensory pathways. *Frontiers in Neuroscience*, 5,40.
- Boston-Howes, W. et al. (2006). Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), pp. 14076–14084.
- Bruce, A. W., López-Contreras, A. J., Flicek, P., Down, T. A., Dhami, P., Dillon, S. C., ... and Vetrie, D. (2009). Functional diversity for REST (NRSF) is defined by in vivo binding affinity hierarchies at the DNA sequence level. *Genome research*, 19(6), 994-1005.41
- Chekan, J.R. et al. (2019). Scalable biosynthesis of the seaweed neurochemical, Kainic acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(25), pp. 8454–8457.
- Chi-Castañeda, D., and Ortega, A. (2017). The Role of Mammalian Glial Cells in Circadian Rhythm Regulation. *Neural plasticity*, 2017, 8140737.

- Choudhary, C., Kumar, C., Gnäd, F. et al. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 325, 834–840.
- Dagdelen, D.N., Akkulak, A. and Donmez Yalcin, G. (2021). The investigation of glutamate transporter 1 (GLT-1) degradation pathway in glioblastoma cells. *Molecular Biology Reports*, 48(4), pp. 3495–3502.
- Danbolt N. C, Furness D. N, Zhou Y. (2016). Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochemistry International*, 98, 29-45.
- Danbolt N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1), 1–105.
- Dong, X., Wang, Y. and Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), pp. 379–387.
- Dönmez G, Guarente L. (2010). Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging cell*, 9(2), 285-290.
- Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., and Amara, S. G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, 375(6532), 599–603.
- Falkenberg, K.J. and Johnstone, R.W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(9), 673–691.
- García-Gaytán, A.C. et al. (2022). Glutamatergic system components as potential biomarkers and therapeutic targets in cancer in non-neural organs. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1029210.
- Gasparini, F., Di Paolo, T., and Gomez-Mancilla, B. (2013). Metabotropic glutamate receptors for Parkinson's disease therapy. *Parkinson's disease*, 2013, 196028.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U. et al. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 11–15.
- Haigis, M. C., and Sinclair, D. A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annual review of pathology*, 5, 253–295.

- Hamaidi, I., Kim, S. (2022). Sirtuins are crucial regulators of T cell metabolism and functions. *Experimental and Molecular Medicine*, 54, 207–215.
- Hardingham, G., Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Review Neuroscience*, 11, 682–696.
- Haugeto, Ø. et al. (1996). Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27715–27722.
- Hay R. T. (2005). SUMO: a history of modification. *Molecular cell*, 18(1), 1–12.
- Hermans E, Challiss RA. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *The Biochemical journal*, 359 (Pt 3), 465–484.
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425–479.
- Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y. H., Follin-Arbelet, V. V., Grutle, N. J., Mylonakou, M. N., Plachez, C., Zhou, Y., Furness, D. N., Bergles, D. E., Lehre, K. P., & Danbolt, N. C. (2012). The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(17), 6000–6013.
- Hong, J. et al. (2018). Study of expression analysis of sirt4 and the coordinate regulation of bovine adipocyte differentiation by sirt4 and its transcription factors, *Bioscience Reports*, 38(6), BSR20181705.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., & Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), 225–238.
- Huang, X., Chen, J., Cao, W. et al. (2019). The many substrates and functions of NEDD4-1. *Cell Death & Disease*, 10, 904.
- Hung, T. M., Na, M., Thuong, P. T., Su, N. D., Sok, D., Song, K. S., Seong, Y. H., and Bae, K. (2006). Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *Journal of ethnopharmacology*, 108(2), 188–192.
- Imai, S., and Guarente, L. (2014). NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends in cell biology*, 24(8), 464–471.

- Jackson, S. P., and Durocher, D. (2013). Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Molecular cell*, 49(5), 795–807.
- Karaca, M., Frigerio, F. and Maechler, P. (2011). From pancreatic islets to central nervous system, the importance of glutamate dehydrogenase for the control of energy homeostasis, *Neurochemistry International*, 59(4), pp. 510–517.
- Kazemi Shariat Panahi, H., Dehhaghi, M., Heng, B., Lane, D. J. R., Bush, A. I., Guillemin, G. J., and Tan, V. X. (2022). Neuropathological Mechanisms of β -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) with a Focus on Iron Overload and Ferroptosis. *Neurotoxicity research*, 40(2), 614–635.
- Kew, J. N., and Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 179(1), 4–29.
- Kim K, Lee SG, Kegelmann TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, Dasgupta S, Barral PM, Hedvat M, Diaz P, Reed JC, Stebbins JL, Pellecchia M, Sarkar D, Fisher PB (2011). Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *Journal of Cellular Physiology*, 226(10): 2484-2493.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 203-229.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *The EMBO journal*, 19(6), 1176–1179.
- Lambert, S.A. et al. (2018). The human transcription factors, *Cell*, 172(4), pp. 650–665.
- Latchman D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(12), 1305–1312.
- Lau, A., and Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 460(2), 525-542.
- Laurent, G., de Boer, V. C., Finley, L. W., Sweeney, M., Lu, H., Schug, T. T., Cen, Y., Jeong, S. M., Li, X., and Auwerx, J. (2013). SIRT4 represses peroxisome proliferator-activated receptor α activity to suppress hepatic fat oxidation. *Molecular and Cellular Biology*, 33(22), 4552–4561.

- Lee, A., Anderson, A. R., Stevens, M., Beasley, S., Barnett, N. L., and Pow, D. V. (2013). Excitatory amino acid transporter 5 is widely expressed in peripheral tissues. *European journal of histochemistry: EJH*, 57(1), e11.
- Lewerenz, J., and Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Frontiers in neuroscience*, 9, 469.
- Li J, Vicknasingam B, Cheung, Zhou, Nurhidayat, Jarlais D, Schottenfeld R. (2011). To use or not to use: an update on licit and illicit ketamine use. *Subst Abuse Rehabilitation*, 2,11-20.
- Lonze, B.E. and Ginty, D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system, *Neuron*, 35(4), pp. 605–623.
- Magi, S., Piccirillo, S., Amoroso, S., and Lariccia, V. (2019). Excitatory amino acid transporters (EAATs): Glutamate transport and beyond. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5674.13.
- Malik and Willnow (2019). Excitatory amino acid transporters in physiology and disorders of the Central Nervous System, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), p. 5671.
- Mampay, M., & Sheridan, G. K. (2019). REST: An epigenetic regulator of neuronal stress responses in the young and ageing brain. *Frontiers in neuroendocrinology*, 53, 100744.
- Martínez-Lozada, Z., and Ortega, A. (2015). Glutamatergic Transmission: A Matter of Three. *Neural plasticity*, 2015, 787396.
- Mayer, M. L., and Armstrong, N. (2004). Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annual Review of Physiology*, 66, 161-181.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 599-609.
- Mori, N. (2002). Neuronal gene regulation by the neural — restrictive Silencer (NRS), *Catecholamine Research*, pp. 205–208.

- Mozzi, A., Guerini, F. R., Forni, D., Costa, A. S., Nemni, R., Baglio, F., Cabinio, M., Riva, S., Pontremoli, C., Clerici, M., Sironi, M., and Cagliani, R. (2017). REST, a master regulator of neurogenesis, evolved under strong positive selection in humans and in non human primates. *Scientific reports*, 7(1), 9530.
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 4525487, Glutamate. Retrieved May 18, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutamate>.
- Nieoullon A, Canolle B, Masméjean F, Guillet B, Pisano P, Lortet S. (2006). The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse?. *Journal of Neurochemistry*, 98(4): 1007-1018.
- Niswender CM, Conn PJ. (2017). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 295–322.
- O'Donovan, S.M., Sullivan, C.R. and McCullumsmith, R.E. (2017). The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *NPJ schizophrenia*, 3(1), 32.
- Olloquequi, J., Cornejo-Córdova, E., Verdaguer, E., Soriano, F. X., Binvignat, O., Auladell, C., and Camins, A. (2018). Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. *Journal Of Psychopharmacology*, 32(3), 265-275.
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(3880), 719-721.30
- Pajarillo, E., Digman, A., Nyarko-Danquah, I., Son, D. S., Soliman, K. F., Aschner, M., and Lee, E. (2021). Astrocytic transcription factor REST upregulates glutamate transporter EAAT2, protecting dopaminergic neurons from manganese-induced excitotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 297(6).42
- Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., and Lee, E. (2019). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, 161, 107559.23
- Park, G., Tan, J., Garcia, G. et al. (2016). Regulation of histone acetylation by autophagy in Parkinson disease. *The Journal of biological chemistry*, 291(7), 3531–3540.

- Peterson, A. R., and Binder, D. K. (2019). Post-translational regulation of GLT-1 in neurological diseases and its potential as an effective therapeutic target. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 164.
- Pickart C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry*, 70, 503–533.
- Reiner, A., and Levitz, J. (2018). Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert. *Neuron*, 98(6), 1080-1098.
- Rimmele, T. S., and Rosenberg, P. A. (2016). GLT-1: The elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochemistry international*, 98, 19–28.
- Robinson M.B, Jackson J.G. (2016). Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochemistry International*, 98, 56-71.
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J., and Kuncl, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, 38(1), 73–84.
- Rothstein, J.D. et al. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate, *Neuron*, 16(3), pp. 675–686.
- Rueda, C. B., Llorente-Folch, I., Traba, J., Amigo, I., Gonzalez-Sanchez, P., Contreras, L., Juaristi, I., Martinez-Valero, P., Pardo, B., Del Arco, A., and Satrustegui, J. (2016). Glutamate excitotoxicity and Ca²⁺-regulation of respiration: Role of the Ca²⁺ activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochimica et biophysica acta*, 1857(8), 1158–1166.
- Sattler, R., and Rothstein, J. D. (2006). Regulation and dysregulation of glutamate transporters. Neurotransmitter Transporters, *Handbook of experimental pharmacology*, (175), 277–303.
- Schneider, N., Cordeiro, S., Machtens, J. P., Braams, S., Rauen, T., and Fahlke, C. (2014). Functional properties of the retinal glutamate transporters GLT-1c and EAAT5. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(3), 1815–1824.
- Seal, R.P. and Amara, S.G. (1999). Excitatory amino acid transporters: A family in Flux, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), pp. 431–456.

- Shahin Ramazi, Javad Zahiri, (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2021, baab012.
- Shaywitz, A. J., and Greenberg, M. E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual review of biochemistry*, 68, 821–861.
- Sheldon, A. L., González, M. I., Krizman-Genda, E. N., Susarla, B. T., and Robinson, M. B. (2008). Ubiquitination-mediated internalization and degradation of the astroglial glutamate transporter, GLT-1. *Neurochemistry International*, 53(6-8), 296-308.
- Sheldon AL., Robinson MB. (2007). The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International*, 51 (6-7), 333- 355.
- Shih, J. et al. (2014). Loss of SIRT4 decreases GLT-1-dependent glutamate uptake and increases sensitivity to kainic acid, *Journal of Neurochemistry*, 131(5), pp. 573–581.
- Soni, N., Reddy, B.V.K. and Kumar, P. (2014). GLT-1 transporter: An effective pharmacological target for various neurological disorders, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 127, pp. 70–81.
- Sontheimer H. (2008). A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. *Journal of neurochemistry*, 105(2), 287–295.
- Swatek, K. N., & Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research*, 26(4), 399-422.
- Tanaka K., Tanaka K., Watase K., Manabe T., Yamada K. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1 epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5319), 1699–1702.
- Tardón-García N, González-González IM, Martínez-Villarreal J, Fernández- Sánchez E, Giménez C, Zafka F. (2012). Protein Kinase C (PKC)-promoted Endocytosis of Glutamate Transporter GLT-1 Requires Ubiquitin Ligase Nedd4-2-dependent Ubiquitination but Not Phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 287(23), 19177–19187.

- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., and Gatto, G. J., Jr (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 44(45), 7342–7372.
- Wang, Y., Wang, Y., Zhang, H., Gao, Y., Huang, C., Zhou, A., Zhou, Y., and Li, Y. (2016). Sequential posttranslational modifications regulate PKC degradation. *Molecular biology of the cell*, 27(2), 410–420.
- Wang, C., Liu, Y., Zhu, Y., and Kong, C. (2020). Functions of mammalian SIRT4 in cellular metabolism and research progress in human cancer. *Oncology letters*, 20(4), 11.
- Wang, Y. C., Peterson, S. E., and Loring, J. F. (2014). Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell research*, 24(2), 143–160.
- Wilkie, C. M., Barron, J. C., Brymer, K. J., Barnes, J. R., Nafar, F., and Parsons, M. P. (2021). The Effect of GLT-1 Upregulation on Extracellular Glutamate Dynamics. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 661412.
- Wu, X., Xie, C., Zhang, Y. et al. (2015). Glutamate–glutamine cycle and exchange in the placenta–fetus unit during late pregnancy. *Amino Acids* 47, 45–53.
- Yalçın, A. (2012). Posttranslasyonel Modifikasyon ve Protein Fonksiyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 31(1), 29-38.
- Yalçın, G.D. and Colak, M. (2020). SIRT4 prevents excitotoxicity via modulating glutamate metabolism in glioma cells. *Human and Experimental Toxicology*, 39(7), pp. 938–947.
- Yeşilören, E. and Yalcin, G.D. (2023). The regulation of GLT-1 degradation pathway by sirt4, *Neurochemical Research*, 48(9), pp. 2847–2856.