

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'Lİ DROSOPHILA
MELANOGASTER MODELİNDE RPD3 PROTEİNİ
VE HİSTON ASETİLASYON DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Cem HAZIR

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2021**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'Lİ DROSOPHILA
MELANOGASTER MODELİNDE RPD3 PROTEİNİ
VE HİSTON ASETİLASYON DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Cem HAZIR

**Tıbbi Biyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hayat ERDEM-YURTER

ANKARA

2021

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'Lİ DROSOPHILA MELANOGASTER
MODELİNDE RPD3 PROTEİNİ VE HİSTON ASETİLASYON
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Öğrenci: Cem HAZIR

Danışman: Prof. Dr. Hayat ERDEM-YURTER

Bu tez çalışması 19.04.21 tarihinde jürimiz tarafından “ Tıbbi Biyoloji Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof.Dr. Serap DÖKMECİ</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>
Tez Danışmanı:	<i>Prof.Dr. Hayat ERDEM-YURTER</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof.Dr. Belgin ATAÇ</i> <i>Başkent Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof.Dr. Pervin DİNÇER</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Doç.Dr. Gamze BORA</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

28 Nisan 2021

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

19/04/2021

Cem HAZIR

i

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlarda uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Tez Danışmanım Prof. Dr. Hayat ERDEM-YURTER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Cem HAZIR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim sürecinde tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini hiçbir şekilde esirgemeyerek bana doğru yolu gösteren danışman hocam Prof. Dr. Hayat YURTER'e, Çalışmamın her aşamasında değerli fikirleri ile katkıda bulunan hocam Doç. Dr. Gamze BORA'ya,

Tez savunma sınavım sırasında değerli fikir ve katkılarını sunan jüri üyeleri Prof. Dr. Belgin ATAÇ'a, Prof. Dr. Serap DÖKMECİ'ye, Prof. Dr. Pervin DİNÇER'e ve Doç. Dr. Gamze BORA'ya,

Bu tez çalışmasının gerçekleştirildiği Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm hocalarıma, sevgili çalışma arkadaşlarıma,

D.melanogaster soylarının çoğaltılması ve fenilbütirik asit çalışmalarındaki desteklerinden dolayı, Prof. Dr. Ergi Deniz ÖZSOY'a, Öğr.Gör.Dr. Güzin EMECEN'e, Memet GÖZÜBÖYÜK'e,

Tez çalışmam sürecinde daima arkamda olup sevgilerini, desteklerini ve tecrübelerini benimle paylaşan canım anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: TYL-2020-18470).

ÖZET

Hazır, C., Spinal Müsküler Atrofi’li *Drosophila melanogaster* Modelinde Rpd3 Proteinini ve Histon Asetilasyon Düzeylerinin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. DNA-histon ilişkisinin gevşemesine ve transkripsiyonun aktivasyonuna neden olabilen histon asetilasyonu, histon proteinlerinin amino ucu kuyruk bölgelerindeki lizin amino asitlerine asetil grubu ekleyen histon asetil transferaz (HAT) enzimleri ve bu enzime tersinir olarak çalışan histon deasetilaz enzimleri (HDAC) arasındaki denge sayesinde kontrol edilmektedir. Bu dengenin bozulması nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiş ve HDAC enzimlerini inhibe edebilen bileşikler geliştirilmiştir. Anabilim Dalı’ımızda yürütülen bazı çalışmalarda da HDAC inhibitörleri sentezlenmiş, *in vitro* ortamda HDAC1 spesifik inhibisyon aktivitelerinin olduğu saptanmış ve bu etkinin *in vivo* ortamda araştırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu tez çalışması kapsamında, HDAC inhibitör aktivitesi olduğu bilinen fenilbütirik asit kullanılarak SMA’lı *Drosophila melanogaster* modelinde HDAC inhibitör araştırmalarında kullanılabilecek uygun evre ve koşulların belirlenmesi ve daha önce sentezlenmiş olan HDAC inhibitörlerinin etkilerinin *in vivo* ortamda araştırılabilmesine uygun altyapının oluşturulması amaçlanmıştır. HDAC1 enziminin *Drosophila* ortoloğu olan Rpd3 proteinin ifade düzeyi yabani tip ve SMA’lı sineklerin larva ve ergin dönemlerinde araştırılmış, ergin dönemde daha yüksek ifade edildiği görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir. Bundan sonraki çalışmalara Rpd3 proteinin daha fazla ifade edildiği ergin dönem ile devam edilmiştir. Pupadan çıktıkları gün toplanan ergin sineklere 5 gün süreyle 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit uygulanmış, yapılan Western blot analizlerinde H3K18 asetilasyon düzeyinde değişiklik gözlenmezken H3K27 asetilasyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit 10 gün süreyle uygulandığında ise H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeyleri değişmemiştir. Bu tez çalışması ile fenilbütirik asit’in SMA’lı *Drosophila melanogaster*’deki H3K27 asetilasyonunu anlamlı olarak artırdığı ilk kez gösterilmiş ve bundan sonra yapılacak olan HDAC inhibitör aktivitesi tarama çalışmalarında takip edilebilecek kriterler belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *D.melanogaster*, histon, asetilasyon, fenilbütirik asit

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: TYL-2020-18470).

ABSTRACT

Hazır, C., Investigation of Rpd3 Protein and Histone Acetylation Levels in *Drosophila melanogaster* Model of Spinal Muscular Atrophy. Hacettepe University Graduate School Health Sciences, M. Sc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2021. Histone acetylation causes relaxation of the DNA-histone interactions and transcriptional activation. It is controlled by the balance between histone acetyl transferase (HAT) enzymes which add acetyl groups to lysine amino acids on the N-terminal tail regions of histone proteins, and histone deacetylase enzymes (HDAC) that work reversibly to it. Disruption of this balance has been associated with the pathophysiology of neurodegenerative diseases and compounds that inhibit HDAC enzymes have been developed. In our previous studies, several HDAC inhibitors were synthesized and their HDAC1 specific inhibition activities were determined *in vitro*, however, *in vivo* effects of these compounds were needed to be investigated. This study aims to determine the appropriate stages and treatment conditions which can be used in HDAC inhibitor research in the *Drosophila melanogaster* model of SMA. In our study, the infrastructure to investigate *in vivo* effects of previously synthesized HDAC inhibitors were developed by using phenylbutyric acid as an HDAC inhibitor. The expression level of Rpd3 protein, -the *Drosophila* ortholog of human HDAC1- was investigated at larval and adult stages of wild type and SMA flies. Rpd3 protein level was found to be higher in adult stage than larval, however, the difference was not statistically significant, therefore, further studies were carried out with the adult stage. Flies were treated with 5 mM and 10 mM phenylbutyric acid for 5 days and then H3K27 and H3K18 acetylation levels analyzed by Western blot. Our results showed a significant increase in H3K27, but not H3K18 acetylation levels at 5 mM and 10 mM treatment. Besides, flies were treated with the same concentrations of phenylbutyric acid for 10 days and acetylation levels of H3K27 and H3K18 were analyzed. No significant change was observed neither in H3K27 nor in H3K18 acetylation levels. In conclusion, *in vivo* drug treatment conditions on HDAC inhibition were identified through phenylbutyric acid application and it has been shown for the first time that it increases the H3K27 acetylation level of SMA *Drosophila melanogaster* model.

Keywords: *D.melanogaster*, histone, acetylation, phenylbutyric acid

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit (Project number: TYL-2020-18470).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Histon Proteinleri	2
2.2. Post-Translasyonel Histon Modifikasyonları	5
2.2.1. Histon Metilasyonu	7
2.2.2. Histon Fosforilasyonu	7
2.2.3. Histon Ubikuitinasyonu	7
2.2.4. Histon Sumolasyonu	7
2.2.5. Histon Laktilasyonu	8
2.2.6. Histon Asetilasyonu	8
2.3. <i>Drosophila melanogaster</i>	12
2.3.1. <i>D.melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü	13
2.4. Hastalıkların Araştırılmasında <i>D.melanogaster</i>	14

2.4.1. Nörodejeneratif Hastalıklar ve <i>D.melanogaster</i>	16
2.4.2. Spinal Müsküler Atrofi Araştırmalarında <i>D.melanogaster</i>	17
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	21
3.1 GEREÇLER	21
3.1.1. <i>D.melanogaster</i> Soyları ve Çoğaltılmaları	21
3.1.2. Fenilbütirik Asit	23
3.1.3. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	23
3.1.4. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	24
3.1.5. Western Blot	26
3.1.6. Histon Protein Ekstraksiyonu	30
3.2 YÖNTEMLER	31
3.2.1. Larvadan Total Protein İzolasyonu	32
3.2.2. Ergin Sinekten Total Protein İzolasyonu	33
3.2.3. Ergin Sinekten Histon Proteininin Ekstraksiyonu	34
3.2.4. Protein Miktar Tayini	35
3.2.5. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	36
3.2.6. Western Blot	37
3.2.7. Fenilbütirik Asit Uygulama Çalışmaları	39
3.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	40

4. BULGULAR	41
4.1. Yabanıl tip ve SMA'lı Sineklerin Larva ve Ergin Dönemlerindeki Rpd3 Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Analizi	41
4.1.1. Histon Asetilasyon Analizlerinde Total Protein ve Histon Proteini Karşılaştırılması	42
4.1.2. Fenilbütirik Asit Uygulaması Öncesinde Yabanıl Tip ve SMA'lı Sineklerde H3K27 ve H3K18 Asetilasyon Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Araştırılması	43
4.2. 5 gün Süreyle Gerçekleştirilen Fenilbütirik Asit Uygulamasının Yabanıl Tip ve SMA'lı <i>D.melanogaster</i> modelindeki H3K27 ve H3K18 Asetilasyon Düzeylerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi	44
4.3. 10 gün Süreyle Gerçekleştirilen Fenilbütirik Asit Uygulamasının Yabanıl Tip ve SMA'lı <i>D.melanogaster</i> modelindeki H3K27 ve H3K18 Asetilasyon Düzeylerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi	46
4.4. Fenilbütirik Asit Uygulamasının Yabanıl Tip ve SMA'lı <i>D.melanogaster</i> modelinde İrkilme-Sıçrama Davranışı Üzerine Etkisinin Analizi	48
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
6.1. Sonuçlar	55
6.2. Öneriler	56
7. KAYNAKLAR	57
8. EKLER	67
EK1- Tez Orijinallik Raporu	67
EK2- Dijital Makbuz	68
9. ÖZGEÇMİŞ	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

Aβ42	<i>Plasma amyloid β-peptide 42</i>
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	Bicinchocininic acid
BSA	Bovine Serum Albumin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dH₂O	Distile Su
DTT	<i>(2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butan e-2,3-diol</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
GBA	<i>Glucosylceramidase beta</i>
HAT	Histon Asetil Transferaz
HCl	Hidroklorik asit
HDAC	Histon Deasetilaz
kDa	Kilo Dalton
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
NaCl	Sodyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
nm	Nanometre
µg	Mikrogram

µl	Mikrolitre
Park7	<i>Protein deglycase DJ-1</i>
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
Rpd3	<i>Reduced Potassium Dependency-3</i>
SMA	Spinal Müsküler Atrofi
SMN1	<i>Survival of motor neuron 1</i>
SMN	<i>Survival of motor neuron protein</i>
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD1	<i>Superoxide dismutase</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline with tween-20</i>
TBP	TATA kutusu bağlanma proteini
TEMED	N,N,N,N' Tetrametilendiamin
VAPB	<i>VAMP-associated protein B</i>
%	Yüzde
°C	Derece Santigrat

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Kor histon proteinlerinin organizasyonu	3
2.2.	Nükleozom yapısı	4
2.3.	DNA paketlenmesi	5
2.4.	Histon modifikasyonları	6
2.5.	<i>D.melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü	13
2.6.	İnsandaki SMN protein sentezinin şematik gösterimi	17
2.7.	dSmn geni	18
2.8.	SMA'lı <i>D.melanogaster</i> modelleri	19
3.1.	piggyBac transpozon sistemi ile oluşturulan Smn ^C (f05960 kodlu) mutasyonu	21
3.2.	Tez çalışmasında kullanılan SMA'lı <i>D.melanogaster</i> modeli ve yabanıl tip (yt) kontrol soyu	22
3.3.	3.evre larva ve 5 günlük ergin sineklerin toplanma günlerini gösteren zaman çizelgesi	31
3.4.	Yabanıl tip (yt) ve SMA'lı sineklere fenilbütirik asit uygulama süresini gösteren zaman çizelgesi	39
4.1.	Yabanıl tip (yt) ve SMA'lı sineklerin (3. evre larva ve 5 günlük ergin dönemlerindeki) Rpd3 protein düzeylerinin analizi	41
4.2.	H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeyinin total protein ve histon protein örneklerinde karşılaştırılması	42
4.3.	Yabanıl tip (yt) ve SMA'lı ergin sineklerde fenilbütirik asit uygulaması öncesi H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerinin karşılaştırılması	43

- 4.4. 5 gün süreyle uygulanan fenilbütirik asit'in yabancı tip (yt) ve SMA'lı *D.melanogaster*'deki H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerine etkisi 44-45
- 4.5. 10 gün süreyle uygulanan fenilbütirik asit'in yabancı tip (yt) ve SMA'lı *D.melanogaster*'deki H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerine etkisi 46-47
- 4.6. Fenilbütirik asit'in yabancı tip (yt) ve SMA'lı *D.melanogaster*'in irkilme-sıçrama davranışı üzerine etkisi 48

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Histon deasetilaz enzimlerinin sınıflandırılması	9
2.2. HDAC inhibitörlerinin sınıflandırılması	11
2.3. <i>D.melanogaster</i> 'in insan hastalıklarında model organizma olarak kullanılmasındaki avantajlar ve hastalıklarla ilgili çalışmalara sağladığı katkılar	15
3.1. Protein miktar tayininde standart eğrinin belirlenmesi için kullanılan BSA konsantrasyonları	35

1. GİRİŞ

Post-translasyonel histon modifikasyonları histon proteinlerinin amino ucu kuyruk bölgelerinde bulunan çeşitli amino asitler üzerinde meydana gelmekte, kromatinin yapı, erişilebilirlik ve fonksiyonunda değişikliklere neden olarak genlerin aktivasyon ve inhibisyonunu kontrol etmektedir. Bu modifikasyonlar aynı zamanda eklendikleri histon proteinlerinin yapılarını, aktivitelerini ve diğer moleküllerle etkileşimlerini de etkilemektedir. Histon modifikasyonlarının en sık görülen tiplerinden olan asetilasyon, negatif yüklü asetil gruplarının lizin amino asitlerine eklenmesiyle oluşmaktadır. Asetilasyon tipi modifikasyon, birbirine tersinir olarak çalışan histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri tarafından kontrol edilir. Lizin amino asitlerine asetil gruplarının eklenmesi HAT enzimleri, çıkarılması ise HDAC enzimleri tarafından katalize edilmektedir. İki enzim arasında bulunan dengenin bozulması, çeşitli kanser tipleri ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiş ve HDAC enzimlerini inhibe edebilen inhibitör bileşikler geliştirilmiştir.

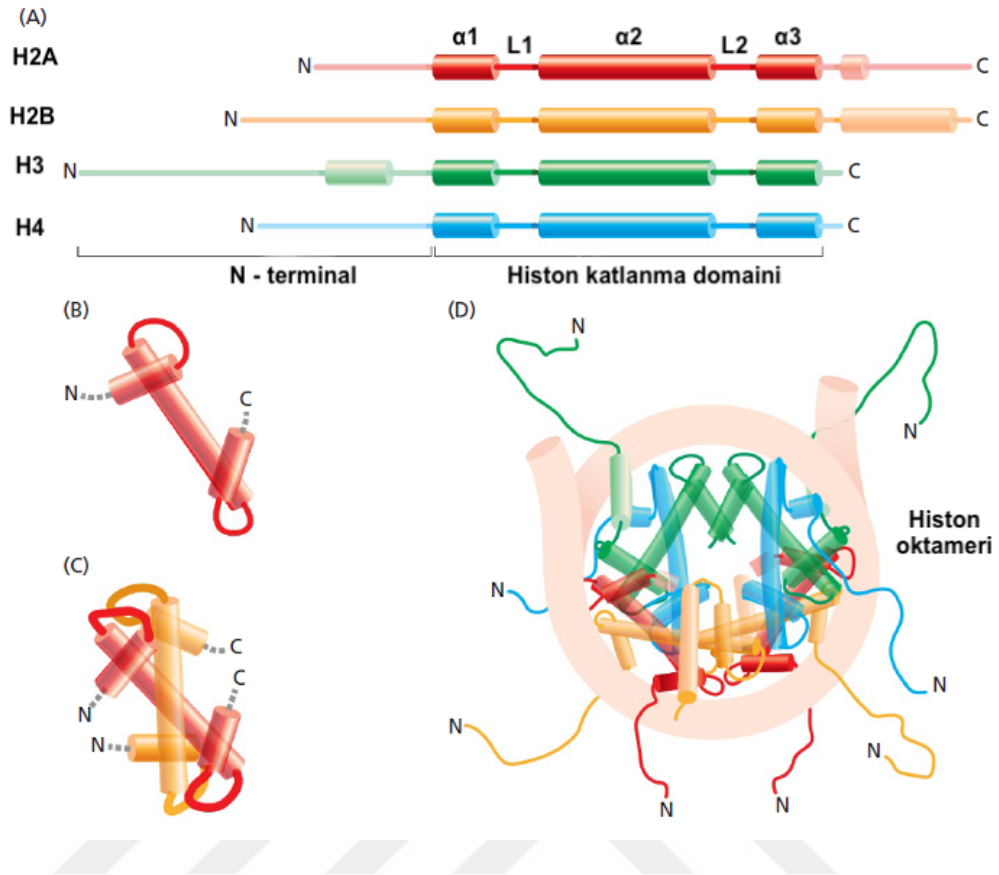
Drosophila melanogaster kısa sürede hızlı çoğalması, yaşam döngüsünün kısa olması, nükleotit dizisi bilinen küçük bir genoma sahip olması, düşük maliyetle yetiştirilebilmesi ve insanda hastalığa neden olan genlerin birçoğunun ortoloğunu bulundurması gibi özellikleri nedeni ile insan hastalıklarının modellenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan bir model organizmadır. Kan beyin bariyeri tarafından korunan kompleks bir merkezi sinir sistemi, iki loblu beyin yapısı ve 100.000'den fazla nöron bulundurması *D.melanogaster*'in nörodejeneratif hastalıkların modellenmesinde tercih edilmesine neden olmaktadır.

Anabilim Dalı'mızda daha önce sentezlenmiş olan HDAC inhibitörlerinin *in vitro* ortamda gösterilen spesifik etkilerinin *in vivo* ortamda araştırılmasına ihtiyaç duyulmuş ve uygun model olarak SMA'lı *D.melanogaster* seçilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, HDAC inhibitör aktivitesi olduğu bilinen fenilbütirik asit kullanılarak SMA'lı *D.melanogaster* modelinde HDAC inhibitör araştırmalarında kullanılabilecek uygun evre ve koşulların belirlenmesi ve daha önce sentezlenmiş olan HDAC inhibitörlerinin etkilerinin *in vivo* ortamda araştırılabilmesine uygun altyapının optimize edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

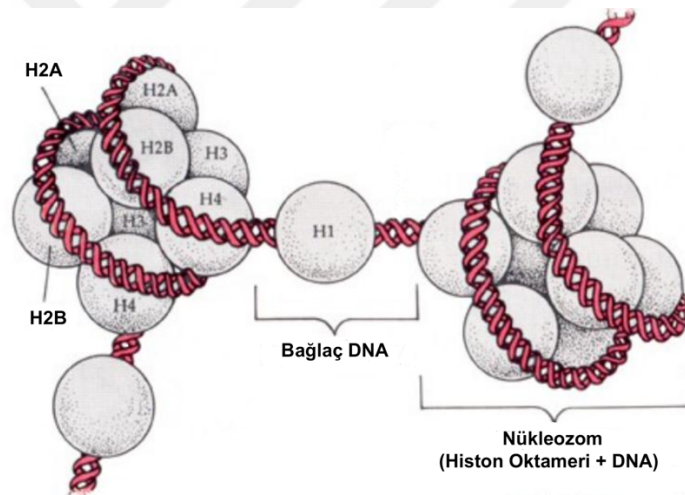
2.1. Histon Proteinleri

Genetik bilgi, insan genomunu oluşturan 3 milyar baz çiftine sahip DNA molekülü tarafından aktarılır. DNA, ökaryotik hücrelerde çekirdek içerisinde paketlenmekte ve histon adı verilen özelleşmiş proteinlerin etrafına sarılarak kromatin yapısını oluşturmaktadır. Histonlar, arjinin ve lizin gibi bazik amino asitler bakımından zengin olan pozitif yüklü proteinlerdir. H2A, H2B, H3, H4 ve H1 olmak üzere, 5 adet temel histon proteini bulunmaktadır. H1 proteini bağlayıcı histon, H2A, H2B, H3 ve H4 proteinleri ise kor histonlar olarak adlandırılır. Kor ve bağlayıcı histon proteinlerinin yanı sıra histon varyantları olarak adlandırılan bazı özel histon proteinlerinin de varlığı ve kromatin yapısında değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir. Histon varyantları (H2A.Z, H2A.X, H3.1, H3.3, H3.5) transkripsiyon, kromozom segregasyonu ve DNA tamiri gibi hücresel olaylarda görev yapmakta ve kor histon proteinlerinden farklı bazı özellikler taşımaktadır. Örneğin, kor histonlar replikasyon bağımlı oldukları için hücre döngüsünün S fazında ifade olurken, histon varyantları replikasyondan bağımsız bir şekilde hücre döngüsünün tüm evrelerinde ifade olabilmektedir. Kor histon proteinleri karboksil ucu, histon katlanma bölgesi (*histone fold domain*) ve amino ucu kuyruk bölgesinden oluşmaktadır. Histon katlanma bölgesi, oktamer oluşumu ve oktamer-DNA etkileşiminden sorumludur. Bu bölgede L1 ve L2 olarak adlandırılan iki protein ilmeği tarafından birbirine bağlanan 3 adet alfa sarmal yapı bulunur. (Şekil 2.1.). Bağlayıcı histon proteinlerinde ise, DNA'nın nükleozom yapısına giriş ve çıkış yaptığı noktaya bağlanarak DNA'nın stabilizasyonunu sağlayan globüler bölge (*globular domain*) bulunmaktadır.



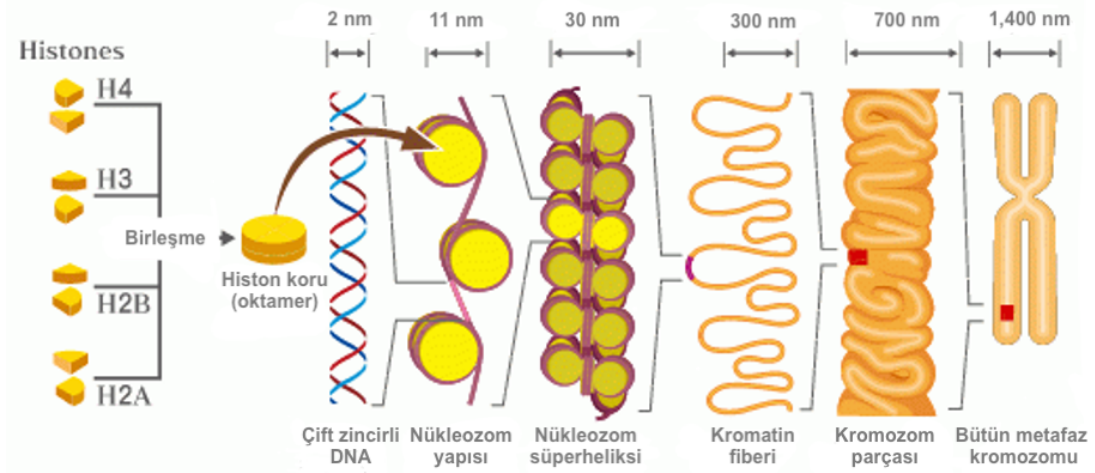
Şekil 2.1. Kor histon proteinlerinin organizasyonu. **A)** Kovalent modifikasyonlara uğrayan amino ucu bölgesi ve DNA etkileşimini kolaylaştıran histon katlanma domaini **B)** Histon katlanması. **C)** Dimer yapısı **D)** Oktamer yapısı (7). $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$: alfa sarmal yapı. L1, L2: Protein ilmeği 1, protein ilmeği 2.

Histon-DNA etkileşimi için gerekli olan protein ilmeği yapısı H2A-H2B, H3-H4 heterodimerizasyonunu da kolaylaştırmaktadır (Şekil 2.1.). DNA iskeleti yapısında bulunan negatif yüklü fosfat grupları DNA'nın negatif yüklenmesini sağlayarak, pozitif yüke sahip histon proteinleri ile sıkı bir şekilde paketlenmesine yardımcı olmaktadır. İkişer adet H2A, H2B, H3 ve H4 proteininin bir araya gelmesi ile histon oktameri oluşmakta, 147 baz çifti uzunluğundaki DNA'nın bu oktamer yapı etrafına sıkıca sarılmasıyla da 10 nm çaplı kor nükleozom meydana gelmektedir (Şekil 2.2.). Nükleozom yapısı, bağlayıcı histon olarak bilinen H1'in kor nükleozoma bağlayıcı DNA yardımıyla dışarıdan bağlanmasıyla tamamlanır. H1 histon proteininin görevi, DNA molekülünün nükleozom yapıdan ayrılmasını engellemek ve kromatin ağının sıkıca paketlenmesini sağlayarak kararlılığını korumasına katkı sağlamaktır (1-10).



Şekil 2.2. Nükleozom yapısı (11).

Nükleozomlar, oluştuktan sonra yoğunlaşarak 30 nm çapındaki fiberler şeklinde paketlenirler. Bundan sonra oluşan kıvrılma ve katlanmalar ile kondenzasyon artar ve bu sayede, kromozomu oluşturacak sıkı paketlenme seviyesine ulaşılır (12-14). (Şekil 2.3.)



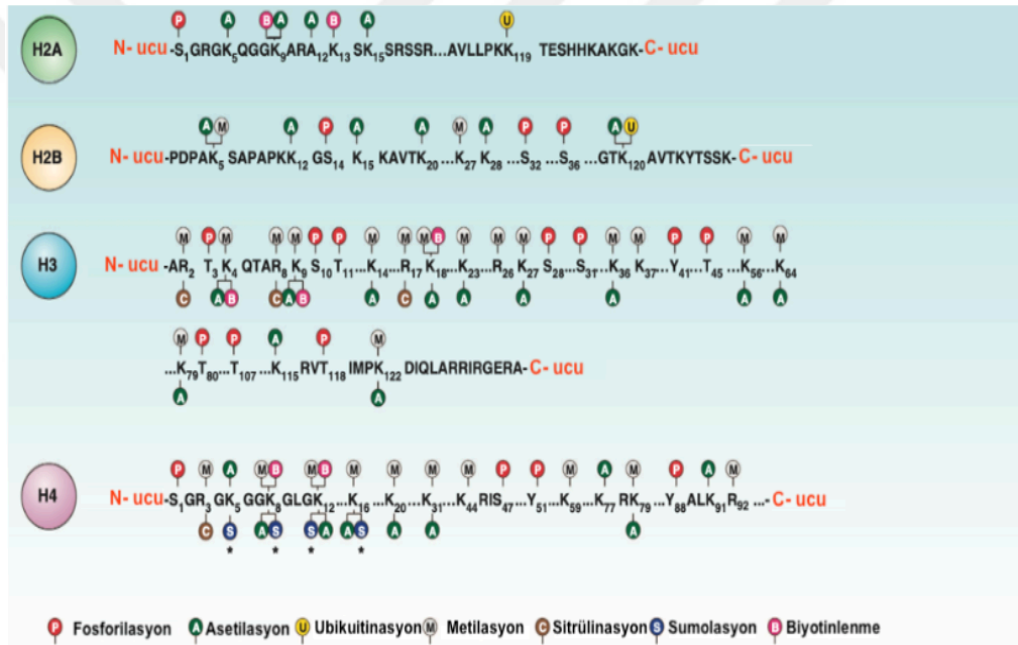
Şekil 2.3. DNA Paketlenmesi (15).

2.2. Post-Translasyonel Histon Modifikasyonları

Histon proteinleri, kromatin yapısını ve fonksiyonunu değiştiren kovalent post-translasyonel modifikasyonlara uğramaktadır. Bu modifikasyonlar, kromatinin paketlenmesini ve erişebilirliğini etkiler. Kromatinin, ökromatin ya da heterokromatin yapısını alması ve gen ifadesinin düzenlenmesi histon modifikasyonları ile kontrol edilmektedir. Histon proteinlerinin amino ucu kuyruk bölgeleri nükleozomun dış yüzeyinde yer alarak kromatin yapısının stabilizasyonunu sağlamakta ve bu bölgelerdeki amino asitler histon modifikasyonları için temel hedef bölgeler haline gelmektedir. Bununla birlikte, histon proteinlerinin globüler domainleri ve karboksil ucundan da modifikasyonlara uğradığı bilinmektedir (16,17).

Post-translasyonel modifikasyonların düzenlenmesinde görev alan 3 farklı enzim grubu bulunmaktadır: Yazıcılar (*writers*), okuyucular (*readers*) ve siliciler (*erasers*). Lizin metiltransferazlar, histon asetiltransferazlar, histon fosfokinazlar gibi yazıcı enzimler histon modifikasyonlarını gerçekleştirirken, lizin demetilazlar, histon deasetilazlar gibi silici enzimler bu modifikasyonları ortadan kaldırırlar. Okuyucular ise, özgül histon modifikasyonlarını tanıyarak aktivite gösterirler (örneğin kromatin *remodeling* kompleks). Bu enzim grupları hücre tiplerindeki farklı fizyolojik yanıtların anlaşılmasında önemli rol oynamaktadır (18,19).

Metilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, glikolizasyon ve ubiquitinasyon bugüne kadar tanımlanmış en önemli histon modifikasyonlarından bazılarıdır (20-24). Modifikasyonların işlevi, modifiye edilen amino asitlerin yerleşimi ve/veya modifikasyon sayısı tarafından belirlenir. Örneğin H3K4 bölgesinin mono metilasyonu transkripsiyon aktivasyonu ile ilişkiliyken, H3K27 trimetilasyonu transkripsiyonun baskılanmasında rol oynamaktadır. Ayrıca, bir amino asitin üzerine farklı enzimler tarafından birden fazla modifikasyon da yapılabilmektedir. Histon modifikasyonlarının oluşturduğu kombinasyonun kromatin yapısını değiştirmesi ve biyolojik fonksiyona olan yansıması histon kod hipotezi olarak adlandırılır (25). (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. Histon Modifikasyonları (26).

2.2.1. Histon Metilasyonu

Histon metilasyonu, histon metiltransferaz enzimlerinin çoğunlukla lizin ve arjinin amino asitlerine metil grubu eklemesiyle oluşur. Metilasyon dengesi, metil grubu ekleyen metiltransferazlar ve metil grubunu çıkaran demetilaz enzimleri tarafından sağlanır. Fosforilasyon ve asetilasyonun aksine histon proteinlerinin yükünü değiştirmez, bununla birlikte transkripsiyon aktivasyonu ve baskılanmasında önemli rol oynarlar (27-29).

2.2.2. Histon Fosforilasyonu

ATP molekülünden koparılan fosfat grubunun, kinaz enzimleri tarafından serin, treonin ve tirozin amino asitlerinin (-OH) grubuna eklenmesiyle oluşan modifikasyon tipidir. Eklenen fosfat grupları, kinaz enzimlerine tersinir olarak çalışan fosfataz enzimleri tarafından çıkartılır. Histon proteinlerinin yükünü değiştirerek gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev yaparlar (16, 30, 31).

2.2.3. Histon Ubikuitinasyonu

76 amino asit uzunluğundaki ubikuitin proteini, ubikuitin aktivatör enzimi, ubikuitin konjugasyon enzimi ve ubikuitin ligaz enzimlerinin kademeli yardımı ile lizin amino asitine eklenir. Bu enzimler, ubikuitinasyon derecesini (mono veya poliübikuitinasyon) ve hangi lizin amino asitinin hedef olacağını belirler. Histon proteinlerinin ubikuitinasyonu diğer modifikasyonların gerçekleşmesini ve transkripsiyonun aktivasyon/inaktivasyonunu etkiler (16, 32, 33).

2.2.4. Histon Sumolasyonu

Histon proteinlerinin lizin amino asitine yaklaşık 100 amino asit uzunluğundaki *Small ubiquitin related modifier protein* (SUMO) grubunun eklenmesidir. Histon H2A, H2B, H3 ve H4'te sumolasyon tespit edilmiştir. Bu modifikasyon tipinin, transkripsiyon kontrolü, hücre döngüsü, bölünmesi, apoptoz, stres yanıtı gibi hücresel süreçlerde rolü olduğu gösterilmiştir (34-36).

2.2.5. Histon Laktilasyonu

En son keşfedilen histon modifikasyonlarından olan laktilasyon, hücre içerisindeki laktatın histon kuyruklarındaki lizin amino asitlerine eklenmesiyle meydana gelmektedir. Gen transkripsiyonunda ve makrofaj polarizasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (37, 38).

2.2.6. Histon Asetilasyonu

Histon asetilasyonu, lizin amino asitlerine asetil gruplarının takılmasıyla meydana gelen bir modifikasyondur. Bu modifikasyon tipi, birbirine tersinir şekilde çalışan histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri tarafından kontrol edilmektedir. HAT, asetil KoA'yı kofaktör olarak kullanarak lizin amino asitlerini asetilleyen enzim grubudur. Histon asetilasyonu, lizin amino asitinin pozitif yükünü nötralize ederek DNA-histon paketlenmesinin gevşemesini sağlar. Aynı zamanda histon-histon etkileşimlerini değiştirerek, TATA dizisi bağlanma proteinleri (TBP) ve RNA polimeraz II için bağlanma bölgesi yaratarak transkripsiyonun aktivasyonuna neden olur (39,40). Örneğin, H3 ve H4 lizin asetilasyonları bazı transkripsiyon faktörlerinde bulunan *bromodomain* bölgesi tarafından tanınmaktadır (41). Histon asetilaz transferaz enzimlerinin HAT-A ve HAT-B olarak adlandırılan iki tipi vardır. HAT-B, sitoplazmada yeni sentezlenen histonların asetillenmesinde görev alırken, HAT-A grubu amino asit dizisi ve yapısal özelliklerine göre MYST, GNAT, CBP/p300 vb farklı gruplara ayrılır (42). Transkripsiyon üzerinde pozitif etkisi olduğu bilinen CBP/p300 ailesi, H3 histon kuyruğunda bulunan K18 ve K27 asetilasyon modifikasyonlarının %90'ından sorumludur. Örneğin, H3K27 asetilasyonunun (H3K27ac) *enhancer* ve promotor bölgelerinde, H3K18 asetilasyonun (H3K18ac) ise transkripsiyon başlangıç bölgesinde yüksek düzeyde bulunduğu ve bu modifikasyonun nöronal gelişime paralel olarak arttığı gözlenmiştir (43,44). Bu durum, H3K27 ve H3K18 asetilasyonlarının transkripsiyon aktivasyonuna katkı sağladığının bir göstergesidir. Aynı zamanda, H3K27 asetilasyonunun *Drosophila melanogaster*'in tükrük bezlerinde bulunan *polycomb* kromozomunun susturulmasını olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada HDAC1'in ortoloğu olan Rpd3 enziminin,

D.melanogaster'deki H3K27 asetilasyonunun baskılanmasına yardımcı olduğu gösterilebilmiştir (45).

HDAC enzimleri, lizin amino asitlerindeki asetil gruplarının çıkarılmasını sağlayarak lizin'in pozitif yükünü yeniden kazanmasına ve DNA-histon paketlenmesini sıkılaştırarak transkripsiyonun baskılanmasına sebep olur (46-48). Sınıf I, II, III ve IV olmak üzere 4 adet HDAC sınıfı ve toplam 18 HDAC enzimi bulunmaktadır. Sınıf I, II ve IV kofaktör olarak çinko bağımlı, sınıf III (sirtüinler) HDAC enzimleri ise NAD⁺ bağımlı olarak çalışır. **(Tablo 2.1)**

Tablo 2.1. Histon deasetilaz enzimlerinin sınıflandırılması.

HDAC Enzim Sınıfı	HDAC Enzimi	Hücredeki Yerleşimi	Kofaktör
I	HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC8	Çekirdek Çekirdek Çekirdek/Sitoplazma Çekirdek	Zn ⁺²
IIa	HDAC4 HDAC5 HDAC7 HDAC9	Çekirdek/Sitoplazma Çekirdek/Sitoplazma Çekirdek/Sitoplazma Çekirdek/Sitoplazma	Zn ⁺²
IIb	HDAC6 HDAC10	Sitoplazma Sitoplazma	Zn ⁺²
III	SIRT1 SIRT2 SIRT3 SIRT4 SIRT5 SIRT6 SIRT7	Çekirdek Sitoplazma Mitokondri Mitokondri Mitokondri Çekirdek Nükleolus	NAD ⁺
IV	HDAC11	Sitoplazma	Zn ⁺²

HDAC enzim sınıfları omurgalı ve omurgasız canlılarda kısmi homoloji göstermektedir (49). Örneğin, insandaki HDAC1 enziminin ortoloğu, *D.melanogaster*'de 521 amino asit uzunluğunda ve 65 kDa ağırlığında olan çinko bağımlı olarak aktivite gösteren Rpd3 (*reduced potassium dependency-3*) enzimidir. HDAC1, histon proteinlerinin kor yapısından dışarıya uzanan, amino ucu kuyruklarında yer alan lizin amino asitlerinde meydana gelen asetilasyon modifikasyonunu ortadan kaldıran ve gen ifadesinin düzenlenmesine yardımcı olan enzim grubunun bir üyesidir. Eksikliği, *D.melanogaster*'de yaşam uzunluğu artışı ile ilişkilidir. HDAC1 ve Rpd3 enzimleri %77 aynılık (*identity*) ve %88 benzerlik (*similarity*) göstermektedir. 3. kromozomun uzun kolunda yer alan Rpd3 enzimi, çekirdekte yerleşim gösterse de DNA bağlanma domainine sahip değildir, fonksiyon gösterebilmek için çok alt birimden oluşan proteinlerle (Sin3, NuRD, CoREST) kompleks oluşturur. Yapılan çalışmalar, Rpd3/sin3 kompleksinin *D.melanogaster*'de bulunan genlerin %2-%13'ünün düzenlenmesinden sorumlu olduğunu göstermiştir. HDAC enzimleri, transkripsiyonun baskılanması ve histon modifikasyonlarının düzenlenmesi gibi mekanizmaları etkileyerek; hücre farklılaşması, hücre döngüsü, apoptoz ve otofaji gibi hücreyel olaylarda rol almaktadır (50-53).

HDAC inhibitörleri ise HDAC enzimlerini baskılayarak, histon gruplarına takılan asetil gruplarının korunmasını sağlayan bileşiklerdir. Yapısal özelliklerine bağlı olarak; kısa zincirli yağ asitleri, elektrofilik ketonlar, benzamidler, hidroksamik asitler olarak sınıflandırılırlar (**Tablo 2.2**). Panobinostat, valproat, sodyum bütirat, fenilbütirik asit üzerlerinde çok sayıda çalışma yapılan HDAC inhibitör örnekleridir (54-58).

Tablo 2.2. HDAC inhibitörlerinin sınıflandırılması.

Grup	HDAC İnhibitör Grupları	HDAC İnhibitör Örnekleri
1	Hidroksamik Asit	TSA, SAHA
2	Kısa Zincirli Yağ Asitleri	Bütirat, Fenil Bütirik Asit, Valproat,
3	Benzamidler	MS-275, N-acetyldinaline
4	Siklik Peptidler	Tropaksin A, Depsipeptit
5	Siklik Hidroksamit İçeren Peptidler	Hidroksamik Asitlerin Sentetik Hibritleri, Siklik Tetrapeptidler

Normal koşullarda HAT ve HDAC enzimlerinin aktivitesi uyum içerisinde ve denge durumundadır. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki denge, hücrenin kaderini belirleyen önemli faktörlerden birisidir. Örneğin, nörodejeneratif hastalıklarda nöron hücrelerindeki histon asetilasyon düzeyinin global olarak azalması, HDAC aktivite artışı ve/veya HAT düzeyinin azalması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu hastalık grubunda HDAC inhibitörlerinin asetilasyon dengesinin korunmasına yardımcı olduğu düşünülmüş ve HDAC enzim aktivitesini azaltarak asetilasyon dengesinin yeniden kurulmasını hedefleyen yaklaşımlar geliştirilmiştir (59,60). HDAC inhibitörlerinin uygulanması, bozulan asetilasyon dengesinin korunmasına ve gen ifade düzeylerinin değiştirilmesine yardımcı olan epigenetik tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmektedir (40). Örneğin, HDAC inhibitörleri olan fenilbütirik asit ve valproatın Spinal müsküler atrofi (SMA) hastalarının fibroblast hücrelerinde SMN2 protein ekspresyon düzeyini artırdığı gösterilmiştir (61).

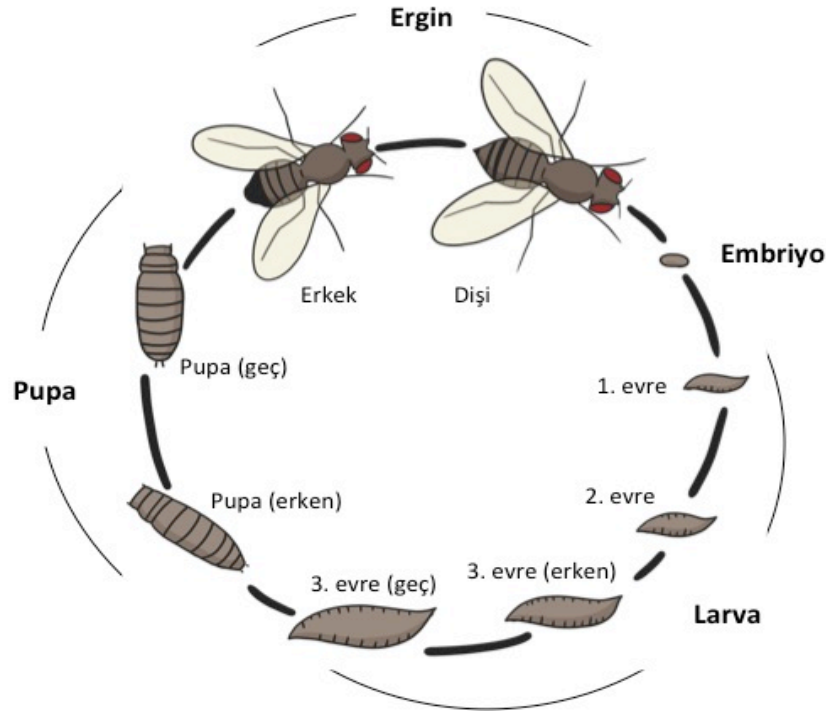
2.3. *Drosophila melanogaster*

D.melanogaster, bilinen diğer adıyla meyve sineği, genetik alanındaki çalışmalarda 100 yılı aşkın süredir kullanılan bir model organizmadır. Thomas Hunt Morgan'ın, *Drosophila*'da beyaz göz genini keşfederek kromozomların kalıtımdaki rolünü aydınlattığı çalışması, 1933 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'nü kazanmasını sağlamıştır. Sonraki yıllarda *D.melanogaster* kullanılarak yapılan çalışmalarda X ışınlarının mutasyon oranları üzerindeki etkisi, embryonik gelişimin genetik kontrolü, doğuştan gelen bağışıklık ve sirkadyan ritmi kontrol eden moleküler mekanizmalar aydınlatılabilmektedir. *D.melanogaster* genomu dizilen ilk kompleks organizmadır. 2003 yılında insan genomunun dizilenmesiyle iki türün genomu arasındaki homolojinin fark edilmesi, bu modelin insan biyolojisini ve hastalık mekanizmalarını anlamadaki rolünü güçlendirmiştir (62-64).

Hızlı çoğalmaları, düşük maliyetle yetiştirilebilmeleri, 180,000 baz çifti ve 13,600 gen bulunduran, 4 çift kromozomdan oluşan küçük bir genomunun olması (ayrıca, tükrük bezlerinde transkripsiyonun takibini kolaylaştıran politen kromozomlar bulundurulur), genomlarında değişiklik yapılabilmesi (transpozon sisteminin gen bölgesine özgü fonksiyon kaybı mutasyonları oluşturmak için kullanılması veya GAL4/UAS sistemiyle dokuya özgü ekspresyon/baskılamının yapılabilmesi) ve yaşam döngüsünün kısa olması *D.melanogaster*'in araştırmalar için uygun bir model organizma olmasını sağlayan özellikleri arasında yer almaktadır (65-68).

2.3.1. *D.melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

Tüm metamorfoz geçiren organizmalarda olduğu gibi, *D.melanogaster*'in vücut yapısı da yaşam döngüsü boyunca ciddi değişikliklere uğramaktadır. 25°C'de yaklaşık 10 gün içinde tamamlanan yaşam döngüsü, farklı ortam koşullarında değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, 19°C'de beslenen yumurtanın ergin döneme geçmesi 19 gün sürmektedir (69). Sıcaklık haricinde, laboratuvar koşulları ve beslenme şekilleri de gelişim süresini etkileyen diğer faktörler arasında yer almaktadır. *D.melanogaster*'in yaşam döngüsü: embriyo (yumurta), larva (1.evre, 2.evre ve 3.evre), pupa ve ergin dönemlerinden oluşur. Ergin döneme ulaşan canlı, uygun laboratuvar koşullarında 50-60 gün arasında yaşayabilmektedir (68,70).



Şekil 2.5. *D.melanogaster*'in yaşam döngüsü (71).

Dişi sineğin yumurtlamasının ardından gerçekleşen embriyogenez süreci yaklaşık bir gün sürer. Bu süreçte anneden aktarılan RNA'lar larva için gerekli olan proteinlerin sentezlenmesinde kullanılır. Embriyogenezin tamamlanması ile 1.evre larva yumurtadan çıkarak beslenmeye ve aynı zamanda besin depolamaya başlar. Ortalama 5 günün sonunda 3.evre tamamlanır ve pupa dönemine geçiş yapılır. Metamorfozun gerçekleştiği pupa döneminde çoğunluğunu epitel hücrelerin oluşturduğu imajinal disk hücrelerinin farklılaşmasıyla organlar gelişir. Metamorfoz sürecinde dış ortamdan beslenemeyen pupa, hayatta kalması için gerekli olan enerjiyi daha önce depoladığı besinlerden sağlayarak ergin döneme ulaşır (62,68).

2.4. Hastalıkların Araştırılmasında *D.melanogaster*

Genom dizileme çalışmalarının tamamlanmasının ardından, insan hastalıklarıyla ilişkili genlerin yaklaşık %75'inin homologunun *D.melanogaster*'de bulunduğu ve insana benzer fonksiyonlara sahip olduğu görülmüştür. İki canlı arasındaki homolog genlerin dizi benzerlik oranının, nükleotit ve amino asit dizisi bakımından yaklaşık %40 olduğu biliniyorsa da, bu oran korunmuş fonksiyonel bölgelerde %80 - %90'a kadar çıkmaktadır. Bu genetik benzerliğe dayanarak, *D.melanogaster* insan hastalıklarını anlamak için bir araç olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ergin canlılar, 2-3 mm kadar küçük olmasına karşın kompleks organizmalardır ve memelilerde bulunan kalp, akciğer, böbrek, bağırsak gibi organların işlevlerini yerine getiren benzer yapılara sahiptir. 100.000'den fazla nörona, iki loblu beyin yapısına ve kan-beyin bariyeri tarafından korunan kompleks bir merkezi sinir sistemine sahiptir. Bu bilgiler *D.melanogaster*'in Amyotrofik lateral skleroz, Parkinson, Alzheimer, SMA gibi nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra sirkadyan ritm, öğrenme ve hafıza, uyku, bağımlılık gibi karmaşık sistemleri modellemek ve çalışmak için de elverişli bir model olduğuna işaret etmektedir (62,72,73).

Tablo 2.3. *D.melanogaster*'in insan hastalıklarında model organizma olarak kullanılmasıdaki avantajlar ve hastalıklarla ilgili çalışmalara sağladığı katkılar.

Avantajlar	Temel Bilgi Üretilmesi
• Kısa yaşam süresinin olması • Kısa yaşam döngüsünün olması • Bakım maliyetlerinin pahalı olmaması • Etik problemlerinin olmaması • Temel hücrel olayların ve sinyal yollarının korunmuş olması • Küçük bir genomunun olması ve genom dizisinin bilinmesi • Genom manipülasyonunun kolaylığı • Transgenik modellerin kolay ve hızlı şekilde oluşturulabilmesi • Kompleks merkezi sinir sisteminin, kan beyin bariyerinin venöromüsküler sistemin varlığı	• Gen fonksiyonlarının anlaşılması • Yeni genlerin tanımlanması • Genetik düzenleyicilerin tanımlanması • Moleküler ağların açıklanması
Dezavantajlar	Translasyonel Yararlar
• Omurgalı olmaması • İnsandaki tüm doku (ör;kan, kemik, kıkırdak) ve organları (ör; karaciğer) bulundurmaması • İnsandaki tüm hastalıkların modellenememesi	• Hastalık patolojilerinin açıklanması • Klinik çeşitliliğin anlaşılması • Yeni tanı yaklaşımlarının geliştirilmesi • Tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi • İlaç geliştirilmesi

2.4.1. Nörodejeneratif Hastalıklar ve *D.melanogaster*

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), beyin ve spinal kortta bulunan alt ve üst motor nöronların kaybı ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığa neden olan mutasyonlar ilk olarak süperoksit dismutaz (*SOD1*) geninde tanımlanmış ve daha sonraki yıllarda hastalığa neden olan (*TDP43*, *VAPB*, *FUS/TLS*, *C9orf72*, *TBK1*, *CHCHD10*, *PFN1* vb) çok sayıda gen bildirilmiştir (74). Bu genler için *D.melanogaster* modeli oluşturulması ve incelenmesi hastalığın patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve tedavi geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Örneğin, *D.melanogaster*'de *SOD1* proteininin aşırı ifade edildiği bir çalışmada, motor nöronlarda protein birikimi ve hasar olduğu gözlenmiş, elde edilen bu bulgular, ALS'nin protein birikimi görülen nörodejeneratif hastalıklar sınıfına katılabileceğini ilk kez düşündürmüştür (73,75).

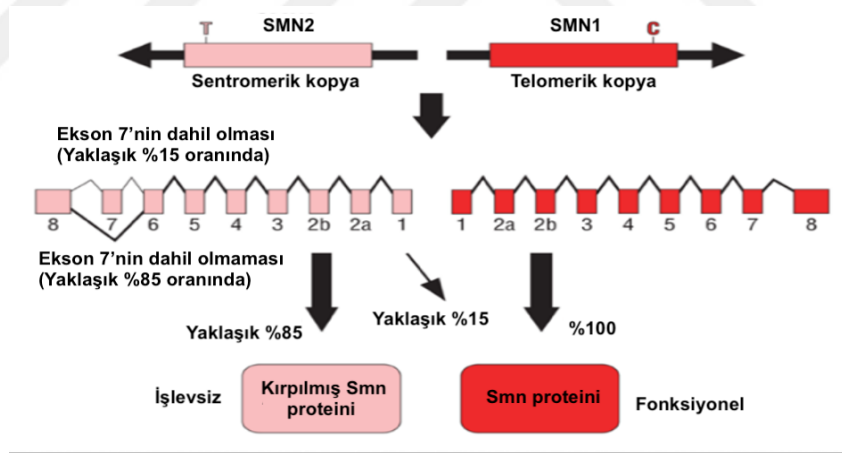
Parkinson hastalığı, alfa sinüklein proteini birikmesi sonucunda dopaminerjik nöron hasarı/kaybının ortaya çıktığı ve motor fonksiyon hataları gözlenen nörodejeneratif bir hastalıktır (76). Hastalığa neden olduğu bilinen genlerin (*Parkin*, *Dardarin/LRRK2*, *PINK1*, *Park7*, *GBA* vb) homologlarının *D.melanogaster*'de bulunması Parkinson hastalığının modellenenbilmesine imkan sağlamıştır. *D.melanogaster* modeli kullanılarak Parkinson hastalığına neden olabilecek protein etkileşimlerinin ve sinyal yollarının aydınlatılması ve *in vivo*'da etkili olabilecek potansiyel tedavi yaklaşımlarını araştırılması mümkün olmuştur (77). Örneğin, *Parkin* ve *PINK1* mutant modellerde kas dejenerasyonu ve mitokondri hasarı gibi benzer bulguların gözlenmesi bu iki gen ürünlerinin aynı yolda görev yaptığını düşündürmüştür. *PINK1* mutant *Drosophila*'da gözlenen fenotipik bulgular, *Parkin* geninin aşırı ifadesi ile düzeltilebilirken, *Parkin* mutantların bulgularının *PINK1* geninin aşırı ifadesi ile düzeltilememesi, rol aldıkları yolda *PINK1* 'in *Parkin*'in üstünde yer aldığını göstermiştir (78).

En yaygın demans türü olarak bilinen Alzheimer hastalığı, 85 yaş üstü bireylerin yaklaşık %50'sini etkilemektedir. Alzheimer hastalarının beyinlerinde nörofibriler düğümler ve amiloid plak birikimi görülür (79). *D.melanogaster* modelleri kullanılarak yapılan araştırmalarda, A β 42 ve Tau proteinlerinin Alzheimer

hastalığının patolojisinde rol oynadığı kanıtlanmış, amiloid beta toksisitesinin mekanizmaları aydınlatılabilmektedir (80, 81).

2.4.2. Spinal Müsküler Atrofi Araştırmalarında *D.melanogaster*

Spinal müsküler atrofi (SMA), spinal kord ön boynuz motor nöron hücrelerinin dejenerasyonu sonucu oluşan nöromüsküler bir hastalıktır. 5q11.2-13.3 kromozom bölgesinde bulunan *Survival Motor Neuron 1 (SMN1)* geninde meydana gelen delesyonlar veya nokta mutasyonları sonucunda, SMN proteininin eksikliği ile ortaya çıkmaktadır. *SMN* geni tarafından kodlanan SMN proteini, hücrenin çekirdeği ve sitoplazmasında yerleşim gösteren 38 kDa ağırlığında, 294 amino asit uzunluğunda bir proteindir. mRNA trafiği, *splicing*, endositoz, hücre iskelet dinamiği, nöromüsküler kavşak stabilitesi gibi önemli hücresel olaylarda görev yapmaktadır. SMA'nın hastalık fenotipine bağlı olarak, 4 klinik tipi bulunur: Tip I (Werdnig-Hoffmann), tip II, tip III (Kugelberg-Walender) ve tip IV (82-85). SMA geni, SMN1 ve SMN2 olarak bilinen iki kopyaya sahiptir (Şekil 2.6).

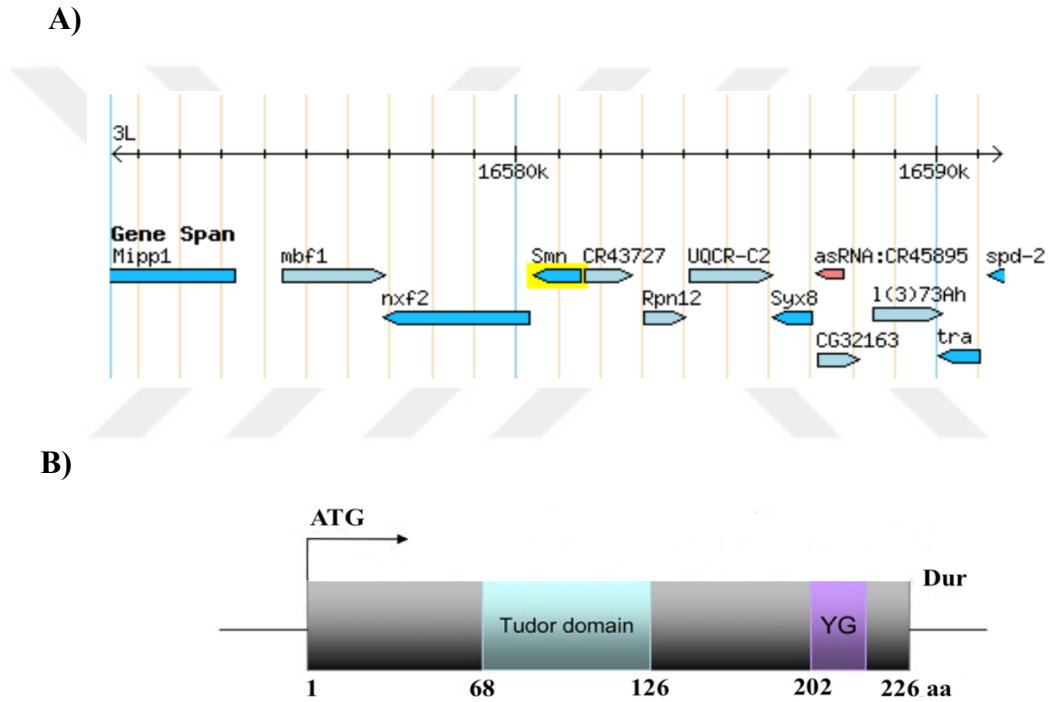


Şekil 2.6. İnsandaki SMN protein sentezinin şematik gösterimi (86).

SMN2 geninin 7. ekzon bölgesi, *SMN1* geninden farklı olarak sitozinin timine transisyonunu (840C>T) içerir (87). Bu transisyon, *SMN2* genindeki ekson 7 bölgesinin olgun mRNA içerisine alınmasını sağlayan *exonic splicing enhancer* (ESE) bölgesini ortadan kaldırarak %90 oranında kararsız, çabuk yıkılan ve farklı karboksil uçlarına sahip SMN proteininin sentezine yol açar. Tam uzunlukta sentezlenen SMN proteini (%10), hastalığın önlenmesi için yeterli değildir (88). *SMN*

genlerinin stabil olmayan genomik bölgede bulunması, *SMN2* gen kopya sayısının bireyler arasında farklılık göstermesine neden olmakta ve hastalığın fenotipe yansımaları değiştiren faktörlerden biri olarak bilinmektedir (89-91). Bunun yanında *Plastin3*, *Coronin*, *Zinc Finger Protein 1* gibi hastalık şiddetini değiştiren bazı genler de tanımlanmıştır (92).

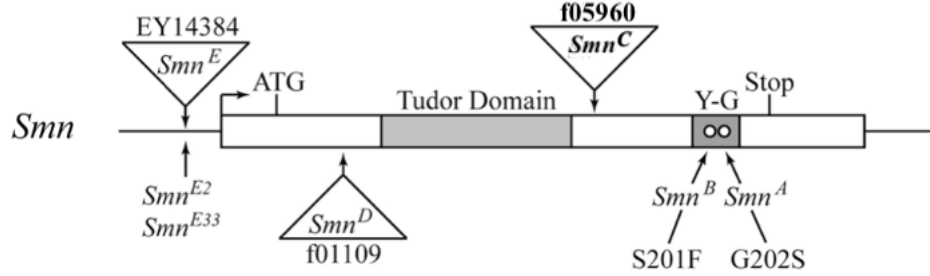
D.melanogaster'deki *SMN* geni, insandan farklı olarak 3. kromozomun uzun kolunda yalnızca tek bir kopya olarak bulunmakta ve bu özellik SMA modellenmesini oldukça elverişli hale getirmektedir (93) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. dSmn geni. **A)** dSmn geninin *Drosophila* genomundaki konumu. **B)** dSmn proteininin yapısı (50,89).

Smn^A , Smn^B , Smn^C , Smn^D ve Smn^E adı verilen SMA'lı *Drosophila* modelleri, Smn proteini üzerinde bulunan YG kutusu, tudor domaini ya da transkripsiyon başlama bölgesinde çeşitli mutasyonlar oluşturularak meydana getirilmiştir (Şekil 2.8). Örneğin, Smn^A ve Smn^B modelleri YG kutusunda nokta mutasyonlar yaratılarak oluşturulmuş, Smn^E modeli transkripsiyon başlama bölgesinin 94 baz çifti yukarısına P elementi eklenmesi ile meydana getirilmiştir. Smn^C ve Smn^D modelleri ise, piggybac transpozon sistemi kullanılarak Smn proteini

üzerinde sırasıyla I93 ve K136 amino asit bölgesinde erken dur kodonu yaratılarak oluşturulmuştur (94,95).



Şekil 2.8. SMA'lı *D.melanogaster* modelleri (95).

SMA'lı *D.melanogaster* modelleri, hastalığın etiyolojisinin açıklanmasına, patogenezi ile ilişkili mekanizmaların ve Smn proteininin görevlerinin aydınlatılmasına yardımcı olmuştur. Örneğin, dSmn geninde mutasyon oluşturulan sineklerde motor davranışlarda bozukluklar ve nöromüsküler kavşak hataları gözlenmiş, Smn proteininin hem nöronlarda hem de kasta ifade olması gerektiği açıklanmıştır (96). Bir başka çalışmada ise Smn protein eksikliğinin *Drosophila*'da kök hücre bölünmesini yavaşlattığı ve kök hücre bölünmesi için Smn protein varlığının önemli olduğu gösterilmiştir (97).

İnsan hücrelerindeki aktivitesi önceden bilinen bileşiklerin *Drosophila*'da benzer moleküler etki mekanizmasına sahip olduğunun gösterilmesi, *Drosophila*'yı ilaç tarama çalışmalarında kullanılması için uygun bir model haline getirmektedir (98). Örneğin, FDA/EMA onaylı bir potasyum kanalı inhibitörü olan 4-aminopyridin'in SMA'lı sineklere uygulanması ile küçülmüş olan kas yüzey alanı genişlemiş ve bozulan lokomotor aktivite düzeltilebilmiştir (99). Ayrıca, tek kopya *smn* geni bulunmasına rağmen, anneden aktarılan az miktardaki Smn proteini sayesinde embriyonik letalite olmaması, SMA hastalığının *Drosophila*'da modellenmesini elverişli hale getirmiştir (100,101).

Anabilim Dalı'mızda daha önce yapılan çalışmalarda yapısal olarak kısa zincirli yağ asidi grubu HDAC inhibitörlerine benzeyen bileşikler tanımlanmıştır. Bilinen HDAC inhibitörlerinin türevlendirilmesi yoluyla sentezlenen bu bileşiklerin HDAC1 ve HDAC8'e özgü inhibisyon aktivitesi gösterdikleri ve

SMA hastalarının fibroblast hücrelerinde SMN2 gen ifadesini artırdıkları saptanmıştır (102-104). Bileşiklerin *in vivo* etkilerinin SMA'lı *D.melanogaster* modelinde araştırılması için öncelikle HDAC inhibisyon aktivitesi gösterdiği bilinen fenilbütirik asit'in bu modelde çalışılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu tez çalışması kapsamında, *D.melanogaster*'in farklı gelişimsel dönemlerinde HDAC1 (Rpd3) protein düzeyleri ve fenilbütirik asit'in besin yoluyla verilmesini takiben histon H3K18 ve H3K27 asetilasyon düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır.



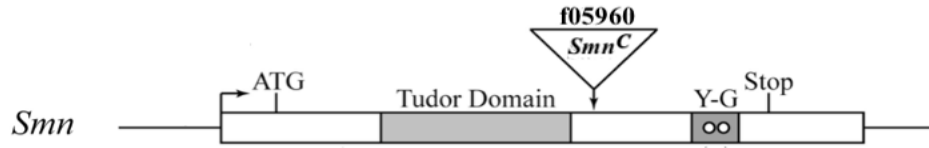
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. *D.melanogaster* Soyları ve Çoğaltılmaları

Tez çalışmaları kapsamında, Harvard Üniversitesi “Exelixis” koleksiyonundan getirilen iki *Drosophila* soyu kullanılmıştır. Bu soylar;

- 1) w^{118} (white geninin bir aleli) belirtecine sahip 06326 kodlu *white* kontrol soyu,
- 2) w^{118} kontrol soyundan üretilen ve (SMN^C) PBac{WH}Smn (f05960) olarak kodlanan SMA’lı *Drosophila* modeli. Bu model, *piggyBac* transpozon sistemi ile *Smn* gen bölgesinde erken dur kodonu yaratılarak oluşturulmuştur.



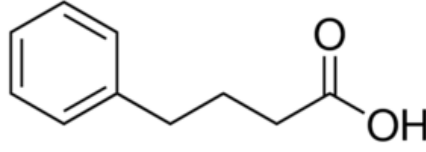
Şekil 3.1. piggyBac transpozon sistemi ile oluşturulan Smn^C (f05960 kodlu) mutasyonu (95).

- Standart *Drosophila* besi yeri,
 - Mısır unu : 80,4g
 - Maya : 45 g
 - Şeker : 128,55 g
 - Agar : 28,8 g
 - Su : 3 lt
 - Nipagin : 21,4 ml
 - Propiyonik Asit : 11,4 ml
- 25°C ve %60 nem koşullarını sağlayan 12 saat aydınlık/karanlık (gündüz/gece) döngüsüne ayarlanmış iklim odası (**Şekil 3.2**)



Şekil 3.2. Tez çalışmasında kullanılan SMA'lı *D.melanogaster* modeli ve yabanıl tip (yt) kontrol soyu. Soyların çoğaltılmasının ve devamlılığının sağlandığı iklim odası ve SMA'lı *D.melanogaster* (kırmızı gözlü), Yabanıl tip (beyaz gözlü).

3.1.2. Fenilbütirik asit



4-Fenil Bütirik Asit (Sigma-Aldrich)

Çözücüsü olan dH₂O içerisinde 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hazırlanarak standart besiyerlerine, besiyeri soğumak üzereyken eklenmiştir.

3.1.3. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

Protein lizis tamponu:

Tris-HCl 5M, pH 6,8	:625 µl
EDTA	:50 µl
%20 SDS	:2,5 ml
dH ₂ O	:1825 µl

Proteaz inhibitör tableti (Roche): ½ 5 ml

Filtreden geçirilip ependorf tüplerde alikotlanır, -20 °C’de saklanır.

Soğutmalı santrifüj (Boeco)

Sonikatör (Sonics Vibra Cell, işlemci modeli VCX 130, prob modeli CV 18)

Protein Konsantrasyon Tayini:

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

Spektrofotometre (SpektraMax M2)

3.1.4. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Akrilamid-Bisakrilamid Karışımı (%40):

Akrilamid (Sigma) :19.56 g

Bisakrilamid (Sigma) :0.54 g

dH₂O ile 50 ml'ye tamamlanır.

%12 - %15 Ayırıcı (*Separating*) Jel Tamponu (pH 8.8):

Tris Baz (Sigma) :13 g

SDS (Sigma) :0,3 g

pH değeri 0.1 N HCl ile 8.8'e ayarlanarak dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

%5 Toplayıcı (*Stacking*) Jel Tamponu pH (6.8):

Tris Baz (Sigma) :4,5 g

SDS (Sigma) :0,6 g

pH değeri 0.1 N HCl ile 6.8'e ayarlanarak dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

%10 Amonyum Persülfat (APS):

APS (Sigma) :0,1 g

dH₂O ile 1 ml'ye tamamlanır.

SDS - Poliakrilamid Jel İçerikleri:

%5 Poliakrilamid jel (Toplayıcı jel):

Toplayıcı jel hazırlama tamponu	:1 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	:750 ul
TEMED (Sigma)	:10 ul
APS	:60 ul
dH ₂ O	:4,2 ml

%12,5 Poliakrilamid jel (Ayırıcı jel):

Ayırıcı jel hazırlama tamponu	:6 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	:5,6 ml
TEMED (Sigma)	:10 ul
APS	:100 ul
dH ₂ O	:6,8 ml

%15 Poliakrilamid jel (Ayırıcı jel):

Ayırıcı jel hazırlama tamponu	:6 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	:6,75
TEMED (Sigma)	:10 ul
APS	:100 ul
dH ₂ O	:5,2 ml

Yükleme Tamponu (5X *Laemmli*):

1M Tris Baz, pH 8 (Merck)	:5 ml
Gliserol (Merck)	:5 ml
SDS (Sigma)	:1.5 g
Brom Fenol Mavisi	:5 mg
2-merkapttoetanol (Sigma)	:2.5 ml

3.1.5. Western Blot

Nitroselüloz Membran (Biorad)

Coomassie Brilliant Mavisi (Sigma)

Ponceau-S (Sigma)

ColorBurst™ Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich)

NuPAGE LDS Buffer, 4X (Invitrogen)

SuperSignal™ West Femto Kemilüminesans Substrat Kiti (ThermoFisher)

Immubilon (Millipore)

Miniprotean elektroforez sistemi ve güç kaynağı (Biorad)

GeneGnome 5 Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı (SynGene)

5X (Yürütme) Elektroforez Tamponu:

Tris Baz (pH:8)	:15.15 g
Glisin (Sigma)	:72 g
SDS	:5g

1X elde etmek için 200 ml stoktan alınarak, dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır.

5X Transfer Tamponu:

Tris Baz (pH:8)	:15,15 g
Glisin (Sigma)	:72 g
Metanol %20	:200 ml

1X elde etmek için 5X stoktan 200 ml stoktan alınır, 200 ml metanol eklenerek dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır.

10X TBS (pH:7.6):

Tris Baz (Sigma)	:24,4 g
NaCl (Sigma)	:80 g

dH₂O ile 1 lt'ye tamamlanır.

Yıkama Tamponu (TBS-T) %0,1 (pH:7.4)

Tween 20 (Sigma)	:1 ml
10X TBS	:100 ml
dH ₂ O ile 1 lt'ye tamamlanır.	

%5 Bloklama Çözeltisi:

BSA	:1 g
TBS-T %0,1	:20 ml

%2 Bloklama Çözeltisi:

BSA	:0,4 g
TBS-T %0,1	:20 ml

%20 SDS (pH:7.2):

SDS	:20 g
dH ₂ O	:100 ml

Coomassie Blue Çözeltisi:

<i>Coomassie Brilliant Blue</i> R-250	:%0.025
Metanol	:%40
Glasiyal Asetik Asit	:%7

Primer Antikorlar:

- Anti-Rpd3 (Tavşan poliklonal, Abcam) birincil antikor (1:1000)
- Anti-H3 Histon (Tavşan poliklonal, Abcam) birincil antikor (1:1000)
- Anti-H3K27ac (Tavşan poliklonal, Abcam) birincil antikor (1:1000)
- Anti-H3K18ac (Tavşan poliklonal, Abcam) birincil antikor (1:1000)

Sekonder Antikor:

- Anti-tavşan, *horseradish* peroksidaz-konjuge (HRP), Amersham (1:4000)

Bağlanan Antikoru Uzaklaştırma Solüsyonu (*Stripping*):

dH ₂ O	:4,15 ml
Tris HCl	:312 µl
2-merkaptotanol	:37,5 µl
%20 SDS (pH:7.2)	:500 µl

Membran 65 °C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında 30 dakika bekletilerek üzerine bağlanmış antikorlar uzaklaştırılır.

3.1.6. Histon Protein Ekstraksiyonu

Histon Ekstraksiyon Kiti (Abcam):

10X Pre-lizis tamponu

Balance tamponu

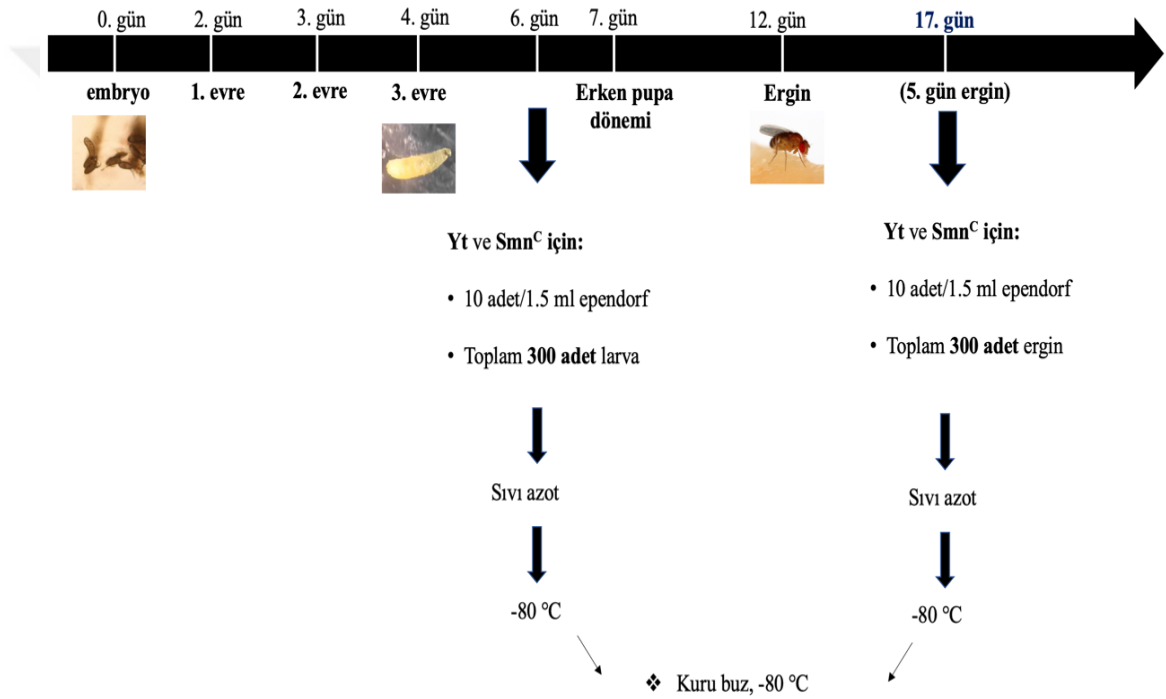
DTT solüsyonu

Lizis tamponu



3.2. YÖNTEMLER

Harvard Exelixis koleksiyonundan getirtilen f05960 kodlu SMA'lı *D.melanogaster* modeli, Hacettepe Üniversitesi Fonksiyonel ve Evrimsel Genetik Laboratuvarı iklim odasında çoğaltılmıştır. 3. evreye ulaşan larvalar 6. günde, ergin döneme ulaşan sinekler 17. günde (5 günlük ergin) toplanmış, ependorf tüpler içerisine alınarak 5 dakika sıvı azot içerisinde bekletilmiştir. -80 °C'ye kaldırılan sinekler kuru buz içerisinde Anabilim Dalı'mıza getirilerek -80°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmalara ait zaman çizelgesi **Şekil 3.3'**de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. 3.evre larva ve 5 günlük ergin sineklerin toplanma günlerini gösteren zaman çizelgesi.

3.2.1. Larvadan Total Protein İzolasyonu

- Spatül, havan, tokmak deterjan ile yıkanıp alkollendikten sonra kloros ile temizlenerek kurulandı ve soğuması için buza yerleştirildi.
- Havanın ve içinde spatülün bulunduğu 50 ml tüpün içerisine sıvı azot eklendi.
- Tüm hazırlıklar yapıldıktan sonra 3. evre larvalar 80°C derin dondurucudan çıkartıldı.
- Ependorfla birlikte sıvı azot içerisine alınarak 2-3 dakika bekletildi.
- Havan buzdan çıkartılarak içerisine sıvı azot eklendi. Sıvı azot uçurulduktan sonra larvalar şırınga ucu yardımıyla seramik havan içerisine aktarıldı ve üzerlerine tekrar sıvı azot eklenerek tokmak yardımıyla dikkatlice ezilerek parçalandı.
- Havanın içi ve tokmağın yüzeyi spatülle iyice kazınarak doku elde edildi.
- Toz halindeki doku şırınga ucu yardımıyla yeni bir ependorf tüpü içerisine alındı.
- Dokunun üzerine 50 ul protein lizis tamponu eklendi.
- Isı bloğu 100°C'ye ayarlanarak doku 3 dakika kaynatıldı.
- Dokunun bulunduğu ependorf buza alındı.
- Dokunun bulunduğu ependorf tüp 25 dakika boyunca sonike edildi.
- Sonikasyon işleminin ardından doku soğutmalı santrifüj kullanılarak 6°C'de 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüje edildi.
- Santrifüj işleminin ardından süpernatant temiz bir 1.5 ml tüpe aktarıldı.
- Protein konsantrasyonunu ölçmek için 5 ul örnek ayrıldı.
- Örnekler Western blot çalışmaları için -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.2. Ergin Sinekten Total Protein İzolasyonu

- Spatül, havan, tokmak deterjan ile yıkanıp alkollendi. Tokmak ve havan kloros ile temizlenerek kurulandı ve soğuması için buza yerleştirildi.
- Havanın ve içinde spatülün bulunduğu 50 ml tüpün içerisine sıvı azot eklendi.
- Ergin sinekler -80°C derin dondurucudan çıkartıldıktan sonra ependorfla birlikte sıvı azot içerisine alındı. 5 dakika sıvı azotta bekletilen sinekler, 30 saniye vortekslendi.
- Havan buzdan çıkartılarak içerisine sıvı azot eklendi. Sıvı azot uçurulduktan sonra sinekler şırınga ucu yardımıyla seramik havan içerisine aktarıldı ve üzerlerine tekrar sıvı azot eklenerek tokmak yardımıyla dikkatlice ezilerek parçalandı.
- Havanın içi ve tokmağı spatül ile iyice kazınarak doku elde edildi.
- Toz halindeki doku şırınga ucu yardımıyla yeni bir ependorf tüpü içerisine alındı.
- Dokunun üzerine 50 ul Blending tampon eklendi.
- Isı bloğu 100°C'ye ayarlanarak doku 5 dakika kaynatıldı.
- Dokunun bulunduğu ependorf tüp buza alınarak 10 dakika bekletildi.
- Doku buz içerisinde 10 kez 20 saniye boyunca sonike edildi.
- Sonikasyon işleminin ardından doku 10 dakika boyunca buzda bekletildi.
- Buzdan alınan doku soğutmalı santrifüj kullanılarak 6 °C'de 10 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüje edildi.
- Santrifüj işleminin ardından süpernatant temiz bir ependorf tüpe alındı.
- Protein konsantrasyonunu ölçmek için 5 ul örnek ayrıldı.
- Örnekler Western blot çalışmaları için -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

3.2.3. Ergin Sinekten Histon Proteininin Ekstraksiyonu

- Spatül, havan, tokmak deterjan ile yıkanıp alkollendikten sonra kloros ile temizlenerek kurulandı ve soğuması için buza yerleştirildi.
- Havanın ve spatülün bulunduğu 50 ml tüpün içine sıvı azot eklendi.
- Ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra 90 adet ergin sinek -80°C derin dondurucudan çıkartıldı.
- Sinekler ependorfla birlikte sıvı azot içerisine alınarak 5 dakika inkübe edildi.
- Havan buzdan çıkartılarak içerisine sıvı azot eklendi. Sıvı azot uçurulduktan sonra sinekler havan içerisine aktarıldı ve üzerlerine tekrar sıvı azot eklenerek tokmak yardımıyla dikkatlice ezildi.
- Ezilen doku spatül ile kazınarak şırınga ucu yardımıyla temiz 1.5'luk bir ependorf içerisine alındı.
- Doku hassas terazide tartıldı.
- 100 ul 10X Pre-lizis tamponu 900 ul nükleaz içermeyen su içerisinde 1X'e seyreltildi.
- 1 mg doku üzerine 5 ul pre-lizis tamponu eklenecek şekilde hesaplandı.
- Üzerine 1X Pre-lizis tamponu eklenen doku vortekslendi.
- Doku buz içerisinde 5 kez 20 saniye süreyle prob sonikatör cihazında sonike edildi.
- Parçalanmış doku 4 °C'de 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüje edildi.
- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Peletin yaklaşık 3 katı olacak şekilde lizis tampon eklendi.
- Doku 30 dakika buz içerisinde inkübe edildi.
- İnkübasyon işleminin ardından 4°C'de 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi.
- Süpernatant dikkatlice temiz bir ependorf tüpe alınarak buz içerisine kaldırıldı.
- 0.5 ul DTT solüsyonu 250 ul Balance tamponu içerisine eklenerek Balance-DTT tamponu hazırlandı.
- 1 ml süpernatant için 300 ul Balance-DTT tamponu eklenecek şekilde hesap yapıldı.

- Eklenen Balance-DTT tamponunun ardından 5ul örnek protein konsantrasyonunu ölçmek için ayrıldı.
- Örnekler Western blot çalışmaları için -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.4. Protein Miktar Tayini

Protein konsantrasyonları *BCA Protein Assay* kiti kullanılarak ölçüldü. %1 SDS içerisinde farklı BSA konsantrasyonlarına sahip standartlar kullanılarak standart eğri çizildi.

Tablo 3.1. Protein miktar tayininde standart eğrinin belirlenmesi için kullanılan BSA konsantrasyonları.

Standart	%1 SDS Miktarı (µl)	BSA Miktarı (µl)	Konsantrasyon (µg/µl)
0	50	0	0
1	47,5	2,5	0,1
2	40	10	0,4
3	30	20	0,8
4	20	30	1,2

Protein örnekleri %1 SDS kullanılarak 10 kat seyreltilti. 50A:1B oranında hazırlanan çözelti (*working reagent*), standart ve protein örneklerinin üzerine 1 ml eklenerek karıştırıldı. İnkübatör içerisinde 37 °C'de 30 dakika bekletildi.

Proteinlerin 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri triplike olacak şekilde spektrofotometrik (SpectraMax M2, Molecular Devices) olarak ölçüldü. Standart eğri yardımıyla protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.5. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

- Camlar %70'lik etanol ve dH₂O ile temizlendi ve proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için camlar arasına ayırıcı jel döküldü. Jelin polimerize olması beklendi. Polimerizasyon işleminin ardından toplayıcı jel döküldü ve taraklar iki cam arasına yerleştirildi.
- Jelin polimerleşmesini takiben taraklar çıkartılıp jel *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Biorad) tankına yerleştirildi.

Rpd3 Elektroforez Koşulları

- Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için %15'lik ayırıcı ve %5'lik toplayıcı SDS poliakrilamid jelleri kullanıldı.
- Örnekler kuyucuklara 45 µg olacak şekilde 1:5 oranında 2-merkaptetanol içeren 5X laemmli tamponu ile karıştırıldı ve proteinlerin denatüre olması amacı ile 95°C'de 8 dakika kaynatılarak buz içerisine alındı. 10 µl protein moleküler ağırlık işaretleyicisi ve örnekler jele yüklendi.
- 120 V'da 3 saat boyunca yürütülerek protein ayırım işlemi gerçekleştirildi.

H3K27ac ve H3K18ac Elektroforez Koşulları

- Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için %12,5'luk ayırıcı ve %5'lik toplayıcı SDS poliakrilamid jelleri kullanıldı.
- Örnekler kuyucuklara 30 µg olacak şekilde 1:5 oranında 2-merkaptetanol içeren 5X laemmli tamponu ile karıştırıldı ve proteinlerin denatüre olması amacı ile 95°C'de 8 dakika kaynatılarak buz içerisine alındı.
- 120 V'da 1,5 saat boyunca yürütülerek protein ayırım işlemi gerçekleştirildi.

3.2.6. Western Blot

Rpd3 , H3K27ac ve H3K18ac Islak Transferleri

- 9/6 cm boy/en oranında kesilmiş nitroselüloz membran, 4 adet *Whatmann* kağıdı ve süngerler transfer tamponu (200 ml tampon + 200 ml metanol + 600 ml dH₂O) içerisinde 5 dakika bekletildi.
- Elektroforez işleminin ardından jel camlar arasından çıkartılarak toplayıcı jel kesilip atıldı ve ayırıcı jel tamponu içerisine alındı.
- Islak transfer için kasetin siyah kapağından başlayacak şekilde sırasıyla sünger, 2 *Whatmann* kağıdı, jel, membran, 2 *Whatmann* kağıdı, sünger yerleştirildi ve sandviç tamamlanarak kaset kapatıldı.
- Kaset, içerisinde transfer tamponu ve buz kalıbı bulunan tanka aktarılarak 120V'da 1,5 saat transfer işlemi gerçekleştirildi.

Hibridizasyon

Rpd3 Hibridizasyonu

- Transfer işleminin ardından membran özgül olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla %0,1 TBS-T içerisinde hazırlanmış olan %5 BSA içerisinde 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirildi.
- Birincil antikor, %5'lik BSA solüsyonu içerisinde 1:1000 (Rpd3/HDAC1 - rabbit) oranında seyreltildi ve +4 °C'de 16 saat süre ile çalkalayıcıda inkübe edildi.
- Ertesi gün membran yıkama tamponu ile 4 defa 10 dk. aralıklarla yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.
- Membran, *horse radish peroksidaz* (HRP) uyumlu sekonder antikor solüsyonu içerisinde 1:4000 (anti-rabbit) oranında seyreltildi ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında yıkama tamponu ile 4 defa 10 dk. aralıklarla yıkandı.

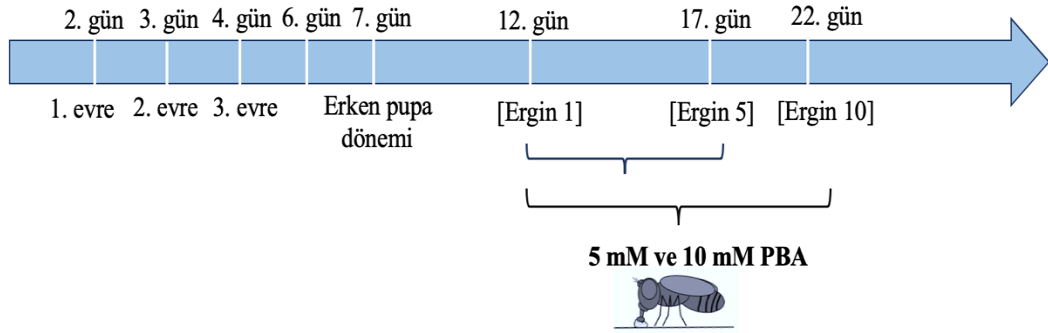
- Protein bantlarının görüntülenmesi amacıyla, *West Femto Supersignal* kemilüminesans kit solüsyonları 1:1 oranında kullanılarak görüntüleme solüsyonu hazırlandı. Membran görüntüleme solüsyonu ile 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. GeneGnome cihazında CCD kamera yardımıyla 1 ve 5 dakikalık pozlama süreleriyle görüntülendi.
- Rpd3 protein analizi için total protein kantitasyonu gerçekleştirildi. Bu işlem için Ponceau-S kırmızısı içerisinde 2 dakika boyunca tutulan membranın 30kDa ve yukarısında kalan kısmının görüntüsü kaydedilerek Image J programı ile analiz edildi.

H3K27ac ve H3K18ac Hibridizasyonu

- Birincil antikor %5 bloklama solüsyonu içerisinde 1:1000 oranında seyreltildi ve +4 °C'de 16 saat süre ile çalkalayıcıda inkübe edildi.
- Ertesi gün membran yıkama tamponu ile 3 defa 10 dk. aralıklarla yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.
- Membran, *horse radish peroksidaz* (HRP) uyumlu sekonder antikor solüsyonu içerisinde 1:4000 (anti-rabbit) oranında seyreltildi ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında yıkama tamponu ile 4 defa 10 dk. aralıklarla yıkandı.
- Protein bantlarının görüntülenmesi amacıyla *Immunobilon* kemilüminesans kiti 1:1 oranında karıştırıldı ve görüntüleme solüsyonu hazırlandı. Membran görüntüleme solüsyonu ile 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. Genegnome cihazı kullanılarak CCD kamera yardımıyla 30 saniye ve 1 dakikalık pozlama süreleriyle görüntülendi.
- Normalizasyon amacı ile ifadesi değişmeyen *housekeeping* protein olarak H3 histon kullanıldı. Proteinleri görüntüleyebilmek için önceden membran üzerine uygulanmış antikorlar *stripping* işlemi ile uzaklaştırıldı. Bu işlem sırasında membran 65°C'ye ayarlanmış olan hibridizasyon fırınında 30 dakika bekletildi. Ardından 3 kez hızlı, 3 kez 10'ar dakika %0.1'lik TBS-T ile yıkanarak bloklama ve antikor uygulamalarının arkasından görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Protein bantları ImageJ programı kullanılarak dansimetrik olarak analiz edildi.

3.2.7. Fenilbütirik Asit Uygulama Çalışmaları

Ergin evreye ulaşmış olan sinekler Hacettepe Üniversitesi Fonksiyonel ve Evrimsel Genetik Laboratuvarı'nda standart besiyerine 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit eklenerek 5 gün ve 10 gün süreyle beslenmiştir. Fenilbütirik asit eklenen besiyeri gün aşırı değiştirilmiş, kontrol grubunun besiyerlerine ise sadece distile su eklenmiştir. Fenilbütirik asit uygulama süresini gösteren zaman çizelgesi **Şekil 3.4**'te gösterilmiş olup bu örneklerle ait Western blot çalışmaları yukarıda açıklandığı şekilde yapılmıştır. Uygulama yapılan 100 ergin sinek takip edilerek ölüm olmadığı gözlenmiştir.



Smn ^C			Yabanıl Tip		
Kontrol	5 mM PBA	10 mM PBA	Kontrol	5 mM PBA	10 mM PBA

Şekil 3.4. Yabanıl tip (yt) ve SMA'lı sineklere fenilbütirik asit uygulama süresini gösteren zaman çizelgesi.

3.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

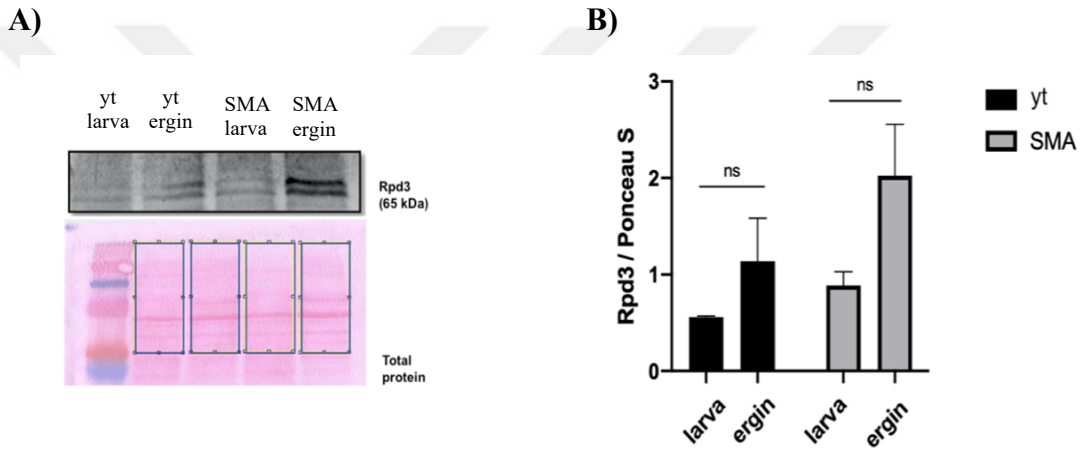
Western blot çalışmalarından elde edilen sonuçlar ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Grafik çizimlerinde ve gruplar arasındaki istatistiksel analizlerin değerlendirilmesinde GraphPadPrism8 programı kullanıldı. Kullanılan istatistiksel testler şekil altıyazılarında belirtildi. $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Yabanıl tip ve SMA'lı Sineklerin Larva ve Ergin Dönemlerindeki Rpd3 Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Analizi

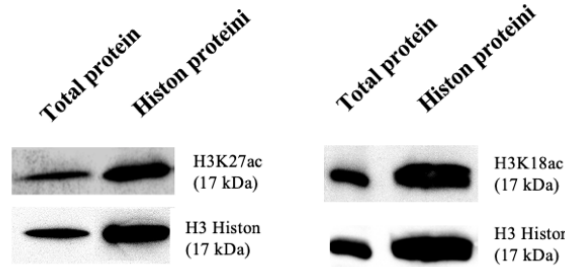
Fenilbütirik asit uygulamasından önce, yabanıl tip ve SMA'lı sineklerin 3. evre larva ve 5 günlük ergin dönemlerindeki Rpd3 düzeyleri Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Rpd3 protein düzeyinin ergin dönemde larva dönemine göre daha yüksek olduğu gözlenmekle birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (**Şekil 4.1.**).



Şekil 4.1. Yabanıl tip (yt) ve SMA'lı sineklerin (3. evre larva ve 5 günlük ergin dönemlerindeki) Rpd3 protein düzeylerinin analizi. **A)** Yabanıl tip ve SMA'lı *D.melanogaster*'in larva ve ergin dönemlerindeki Rpd3 düzeylerine ait örnek Western blot görüntüsü, **B)** Analiz sonuçlarını gösteren grafik. Rpd3 düzeyinin larva ve ergin dönemdeki düzeyinin anlamlı şekilde değişmediği gözlenmiştir. n=2, 10 örnek/tekrar, Unpaired t test, $p>0.05$, ns:anlamlı değil. Veri $\pm$ SEM.

4.1.1. Histon Asetilasyon Analizlerinde Total Protein ve Histon Proteinini Karşılaştırılması

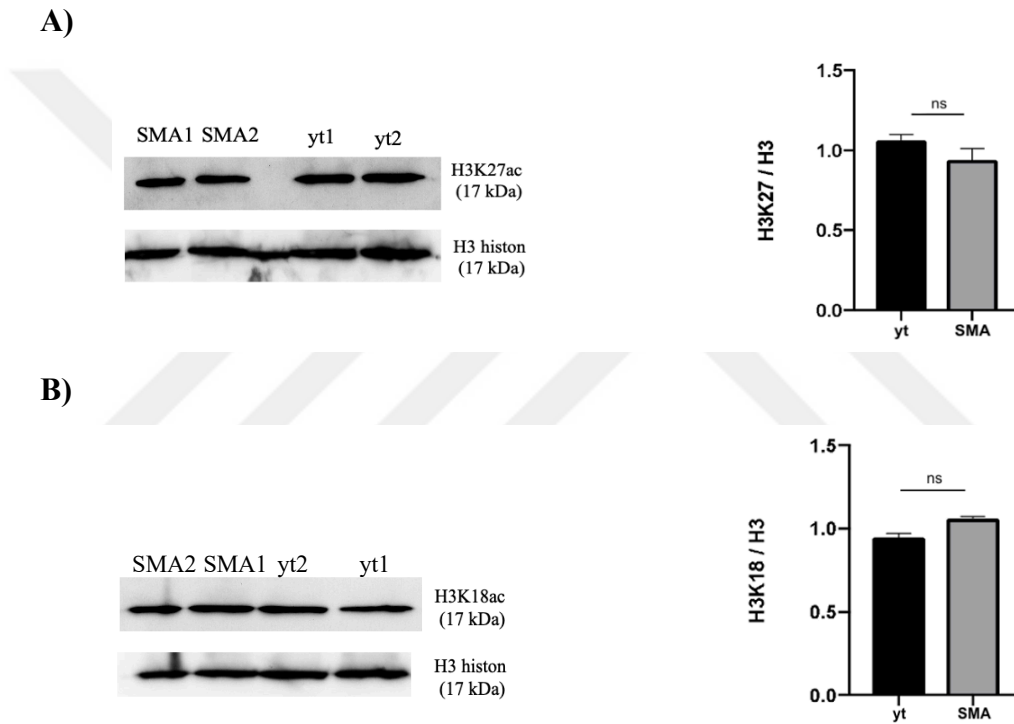
Histon proteinleri üzerindeki modifikasyonların tanımlanması, bu modifikasyonların biyolojik önemlerinin anlaşılması açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle; histon proteinlerini hücre içindeki diğer proteinlerden ayırabilmek amacı ile asit ekstraksiyonu yöntemi gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, araştırılacak olan örnekteki histon proteinlerinin modifikasyonlarının kaybedilmeden elde edilmesine imkan sağlamaktadır (105). Bu çalışmada, ergin sineklerden histon ekstraksiyonu ile elde edilen histon proteinleri ve protein izolasyonu ile elde edilen total protein karşılaştırılması H3K27 ve H3K18 asetilasyonlarının Western blot yöntemiyle gösterilmesiyle yapılmıştır. Histon proteinindeki asetilasyon düzeyinin total proteine göre daha iyi korunduğu gözlenmiş ve fenilbütirik asit uygulaması sonrasında ergin sineklerde yapılacak olan asetilasyon çalışmalarında histon ekstraksiyon yöntemi ile izole edilen histon proteinlerinin kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeyinin total protein ve histon protein örneklerinde karşılaştırılması. (total protein n=2 tekrar 30 örnek/tekrar, histon proteini n=2 tekrar, 90 örnek/tekrar.)

4.1.2. Fenilbütirik Asit Uygulaması Öncesinde Yabanıl tip ve SMA'lı Sineklerde H3K27 ve H3K18 Asetilasyon Düzeylerinin Western Blot Yöntemi ile Araştırılması

Yabanıl tip ve SMA'lı sineklerin H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerinin farklı olabileceği düşünülerek, fenilbütirik asit uygulaması öncesinde her iki gruptaki ergin sineklerin H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeyleri Western blot yöntemiyle analiz edilmiş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (**Şekil 4.3.**).

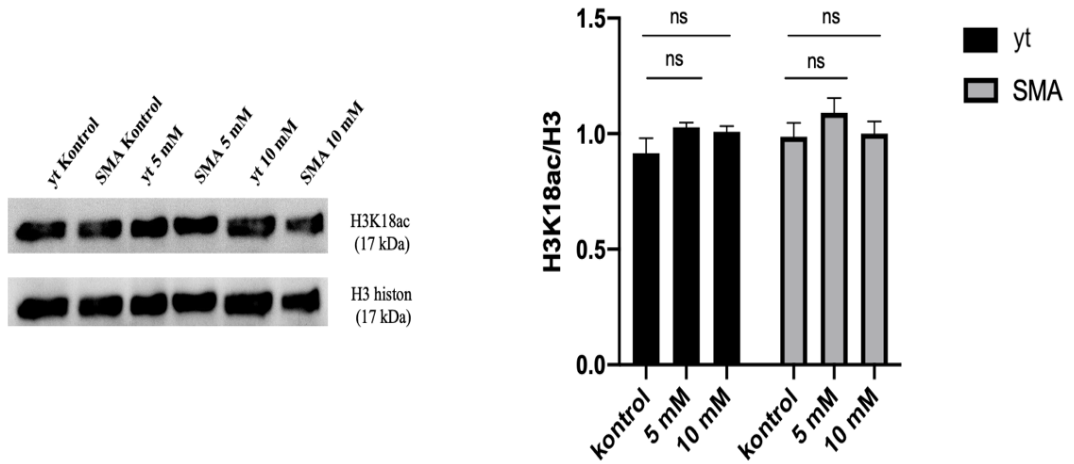


Şekil 4.3. Yabanıl tip (yt) ve SMA'lı ergin sineklerde fenilbütirik asit uygulaması öncesi H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerinin karşılaştırılması. **A)** H3K27 asetilasyon düzeylerine ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçlarını gösteren grafik. Yabanıl tip ve SMA'lı sineklerin H3K27 asetilasyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. n=2 tekrar (90 örnek/tekrar), Unpaired t test, $p>0.05$, ns:anlamlı değil. Veri $\pm$ SEM. **B)** H3K18 asetilasyon düzeylerine ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçlarını gösteren grafik. Yabanıl tip ve SMA'lı sineklerin H3K18 asetilasyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. n=2 tekrar (90 örnek/tekrar), Unpaired t test, $p>0.05$, ns:anlamlı değil. Veri $\pm$ SEM.

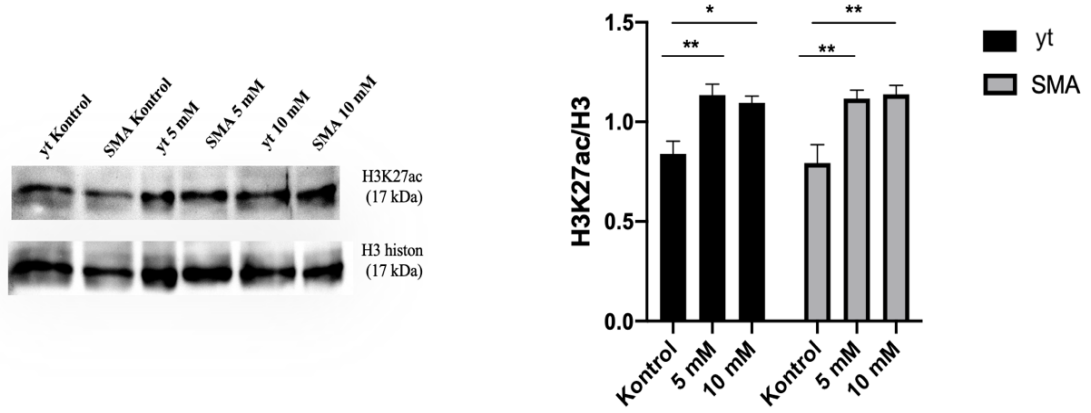
4.2. 5 Gün Süreyle Gerçekleştirilen Fenilbütirik Asit Uygulamasının Yabanıl Tip ve SMA'lı *D.melanogaster* modelindeki H3K27 ve H3K18 Asetilasyon Düzeylerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi

Fenilbütirik asit uygulaması sonrasında H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerini takip etmek amacıyla, yabanıl tip ve SMA'lı ergin sineklerin standart besiyerlerine 5 gün süreyle, 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit uygulanmıştır. Bu süre içinde besiyerleri her gün değiştirilerek taze fenilbütirik asit uygulanmış, kontrol gruplarına ise yalnızca dH₂O verilmiştir. 5 gün sonunda sineklerden histon protein izolasyonları gerçekleştirilerek, H3K18 ve H3K27 asetilasyon düzeyleri Western blot yöntemi ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Western blot sonuçları, 5 gün süreyle gerçekleştirilen 5mM ve 10 mM fenilbütirik asit uygulamasının yabanıl tip ve SMA'lı sineklerdeki H3K27 asetilasyon düzeyini kontrol sineklere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığını, H3K18 asetilasyonunda ise anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. (Şekil 4.4.)

A)



B)

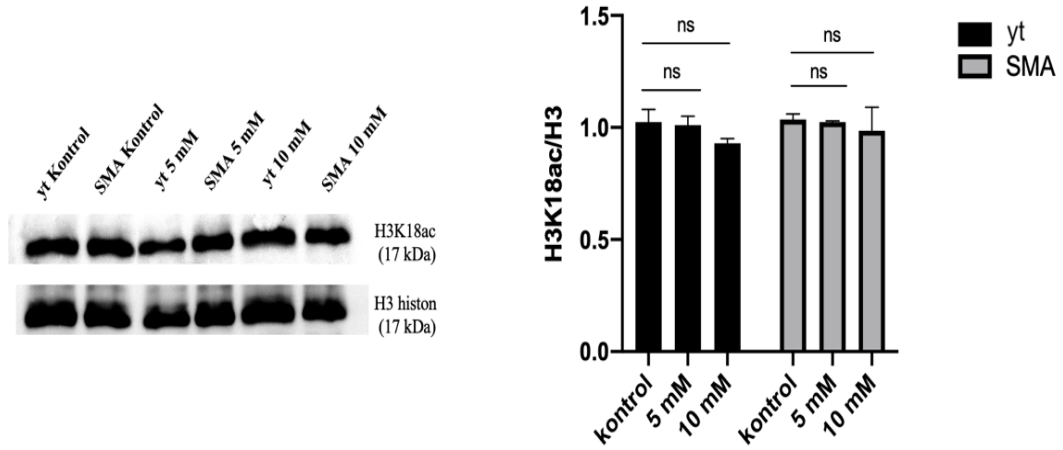


Şekil 4.4. 5 gün süreyle uygulanan fenilbütirik asit'in yabanıl tip (yt) ve SMA'lı *D.melanogaster*'deki H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerine etkisi. **(A)** H3K18 asetilasyon düzeylerine ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçlarını gösteren grafik. 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit'in yabanıl tip ve SMA'lı *D.melanogaster*'deki H3K18 asetilasyon düzeylerini kontrole göre değiştirmedığı saptanmıştır. n=2 tekrar 50 örnek/tekrar, Two-way ANOVA, $p>0.05$, ns: anlamlı değil. Veri $\pm$ SEM. **(B)** H3K27 asetilasyon düzeylerine ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçlarını gösteren grafik. 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit'in yabanıl tip ve SMA'lı *D.melanogaster*'deki H3K27 asetilasyon düzeylerini kontrole göre anlamlı şekilde artırdığı saptanmıştır. n=2 tekrar, 50 örnek/tekrar, Two-way ANOVA, $*p<0.05$, $**p<0.01$. Veri $\pm$ SEM.

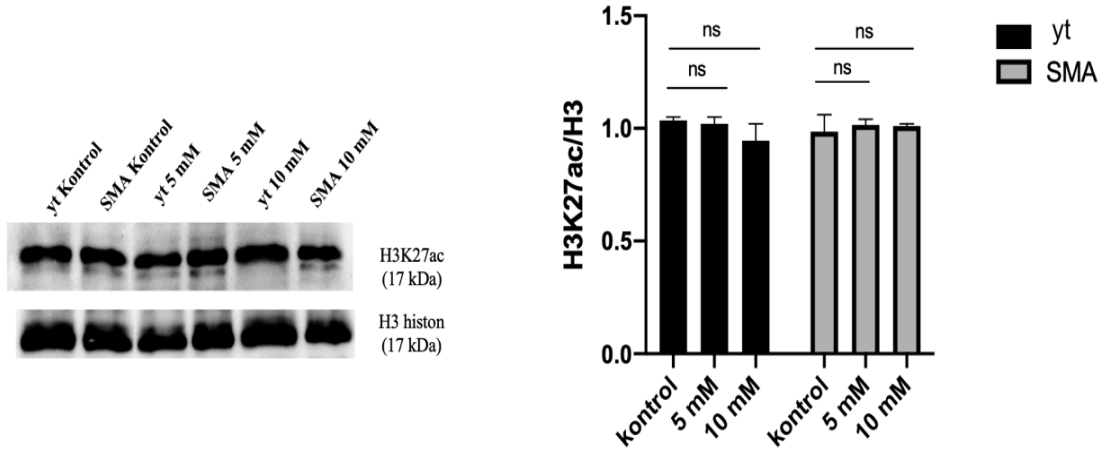
4.3. 10 Gün Süreyle Gerçekleştirilen Fenilbütirik Asit Uygulamasının Yabancıl Tip ve SMA'lı *D.melanogaster* modelindeki H3K27 ve H3K18 Asetilasyon Düzeylerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Analizi

5 gün boyunca uygulanan fenilbütirik asit'in H3K27 asetilasyon düzeyini artırdığını gösterilmesini takiben, yabancıl tip ve SMA'lı ergin sineklerin standart besiyerlerine 10 gün süreyle, 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit uygulanmıştır. Bu süre içinde besiyerleri her gün değiştirilerek taze fenilbütirik asit uygulanmış, kontrol gruplarına ise yalnızca dH₂O verilmiştir. 10 gün sonunda sineklerden histon protein izolasyonları gerçekleştirilmiş, H3K18 ve H3K27 asetilasyon düzeyleri Western blot yöntemi ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Western blot sonuçları, 10 gün süreyle gerçekleştirilen 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit uygulamasının yabancıl tip ve SMA'lı sineklerdeki H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerinde kontrol sineklere göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. (Şekil 4.5.)

A)



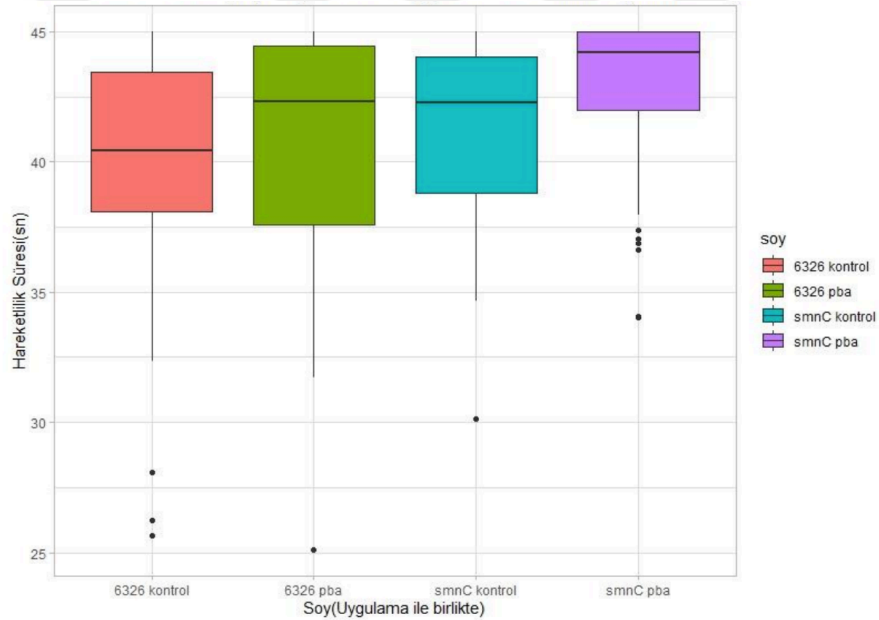
B)



Şekil 4.5. 10 gün süreyle uygulanan fenilbütirik asit'in yabancı tip (yt) ve SMA'lı *D.melanogaster*'deki H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerine etkisi. **(A)** H3K18 asetilasyon düzeylerine ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçlarını gösteren grafik. **(B)** H3K27 asetilasyon düzeylerine ait örnek Western blot görüntüleri ve analiz sonuçlarını gösteren grafik. 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit'in yabancı tip ve SMA'lı *D.melanogaster*'deki H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeylerini kontrole göre değiştirmedığı saptanmıştır. n=2 tekrar, 50 örnek/tekrar. Two-way ANOVA, $p>0.05$, ns:anlamlı değil. Veri $\pm$ SEM.

4.4. Fenilbütirik Asit Uygulamasının Yabanıl Tip ve SMA'lı *D.melanogaster* modelinde İrkilme-Sıçrama Davranışı Üzerine Etkisinin Analizi

Fenilbütirik asitin yabanıl tip ve SMA'lı *D. melanogaster*'in lokomotor fonksiyonlarına etkisinin araştırılması amacıyla irkilme-sıçrama davranışları analiz edilmiştir. Sineklere, H3K27 asetilasyonunda artış saptanan koşullarda fenilbütirik asit (5 gün, 5 mM) uygulanmış ve belirli sayıda sineğin bulunduğu tüpler zemine vurulduktan sonra yatay konuma alınarak sineklerin hareketlilik süreleri 45 sn boyunca ölçülmüştür. Çalışmalar sonucunda fenilbütirik asit uygulanan yabanıl tip ve SMA'lı sineklerin irkilme-sıçrama yanıtlarında çözücü (dH₂O) uygulanan kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Fenilbütirik asit'in yabanıl tip (yt) ve SMA'lı *D.melanogaster*'in irkilme-sıçrama davranışı üzerine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Fonksiyonel ve Evrimsel Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen fenilbütirik asit (PBA) uygulamaları (5 mM, 5 gün) sonucunda yabanıl tip (06326) ve SMA'lı (Snm^C) sineklerin irkilme-sıçrama yanıtlarında, çözücü (dH₂O) uygulanan kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yabanıl tip kontrol (n=34), yabanıl tip fenilbütirik asit (n=35), SMA kontrol (n=37), SMA fenilbütirik asit (n=40). Two-way ANOVA, p>0.05.

5. TARTIŞMA

HAT enzimleri tarafından kofaktör olarak kullanılan asetil-KoA'dan histon proteinlerinin yapısında bulunan lizin amino asitlerine asetil grubunun transfer edilmesi ile meydana gelen histon asetilasyonu, üzerinde en çok çalışılan histon modifikasyonlarından birisidir. Histon asetilasyonu sonucunda lizin amino asitleri pozitif yüklerini kısmen kaybetmekte, bu sayede DNA-histon etkileşimi zayıflayarak transkripsiyon faktörleri ve polimeraz enzimleri için bağlanma bölgesi oluşmaktadır. Bu durum, kromatinin yeniden düzenlenmesi ve transkripsiyonun artışı ile sonuçlanmaktadır. HDAC enzimleri ise HAT enzimlerine tersinir olarak çalışarak, lizin amino asitlerindeki asetilasyonun ortadan kaldırılmasında görev yapmaktadır. Deasetilasyon olarak adlandırılan histon asetilasyonunun kaybı, lizin amino asitlerinin pozitif yüklerini yeniden kazanmasına ve transkripsiyonun baskılanmasına neden olur. HDAC enzimleri, kromatinin yeniden düzenlenmesinde HAT enzimlerinin asetilasyon aktivitelerini dengeler ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, replikasyon, hücre göçü gibi hücresel olaylarda kilit rol oynar. HDAC enzim aktivitesini inhibe edebilen bileşikler olan HDAC inhibitörleri, bu hücresel mekanizmaları etkilemeleri nedeniyle epigenetik temelli tedaviler için önemli bir hedef haline gelmiştir. HDAC inhibitörleri ile başta kanser olmak üzere, SMA, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavilerine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (56,59).

SMA, motor nöronların dejenerasyonu ve ölümü ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalıktır ve çocukluk çağı genetik hastalıkları arasında ikinci sıklıkta görülür. Son yıllarda SMA tedavisine yönelik önemli gelişmeler yaşanmış, FDA; gen tedavisi, antisense oligonükleotit ve bir küçük moleküllü tedavide kullanım için onaylamıştır. Ancak bu tedavilerin maliyeti çok yüksektir, ayrıca ilaca cevapta kişisel farklılıklar ve yan etkiler oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle, sistemik bir hastalık olan SMA'da merkezi sinir sistemi ve periferik dokulara etki edebilecek kombine tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır (106).

Anabilim Dalı'mızda daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, kısa zincirli yağ asiti grubu HDAC inhibitörlerine yapısal olarak benzeyen yeni bileşikler tanımlanmış ve SMA hastalarının fibroblast hücrelerinde SMN2 gen ifadesini artırdığı gösterilmiştir. Bilinen HDAC inhibitörlerinin türevlendirilmesi yoluyla sentezlenen bu bileşiklerin HDAC sınıflarına özgü inhibisyon aktiviteleri belirlenmiş, farklı etkinliklerde olmak üzere HDAC1, HDAC8 enzimlerine diğerlerinden daha yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği ve inhibisyon aktivitesine sahip olduğu *in silico* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (107). *In silico* ve *in vitro* ortamdaki etkileri gösterilmiş olan bileşiklerin *in vivo* koşullardaki etkilerinin araştırılabilmesi için hasta bireylere benzer şekilde motor fonksiyon hataları gösteren SMA'lı *D.melanogaster* modeli seçilmiştir. Bu sineklerde, 3. evre larva döneminde hareket kaybı, ergin dönemde ise sıçrama uçuş bozuklukları, motor nöronlarda ve kas dokusunda işlev bozuklukları görülmektedir (108). Tırmanma ve uçuş gibi karmaşık motor davranışlara sahip olmasının yanı sıra sensorimotor evresi, gliya ve çok çekirdekli kas liflerini kapsayan gelişmiş bir nöromüsküler sisteme sahip olması nedeniyle *D.melanogaster*, SMA ile ilgili araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir modeldir. Kısa yaşam döngüsü, çok sayıda yavru döl vermesi ve önemli etik problemlerinin bulunmaması çalışmalarda kullanımlarını daha elverişli hale getirmekte, gen fonksiyonlarının keşfedilmesinde ve hastalıklarda sahip oldukları görevlerinin ortaya çıkarılmasında avantaj sağlamaktadır. SMA'lı *D.melagonaster* modelinin farklı yöntemler kullanılarak oluşturulması, hastalık patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması açısından da bilgi verici olmaktadır. Smn gen yapısının tamamen bozulması (amorfik) veya gen fonksiyonunun zayıflatılması/azaltılması (hipomorfik) yolu ile oluşturulan SMA'lı modeller, Smn protein işlevlerinin aydınlatılmasına ve Smn eksikliğinde meydana gelen hücresel hataların aydınlatılmasına yardımcı olmuştur. Örneğin, SMA'lı sineklerin yumurtalarındaki çekirdek organizasyonunun bozulması ilk kez bu modelde gözlenmiş, Smn proteininin nükleolus, ve kajal cisimcikler dahil olmak üzere kromozom ve nükleer yapıların korunmasındaki rolünü ortaya çıkarmıştır (99).

Bu tez çalışmasının hedefi, SMA'lı *D.melanogaster* modelinde HDAC inhibitör araştırmalarında kullanılabilecek uygun evrenin ve koşulların belirlenmesidir. Bu sayede, bileşiklerin SMA'lı *D.melanogaster* modelindeki moleküler ve fonksiyonel etkilerinin hızlı bir şekilde araştırılabilmesi mümkün olacaktır. Bu nedenle çalışmalarımızın ilk aşamasında, yabanıl tip ve SMA'lı sineklerin 3. evre larva ve 5 günlük ergin dönemlerindeki Rpd3 (dHDAC1) ifade düzeyleri karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Pupa dönemine geçmeden hemen önce oluşan 3. evre larvalar beslenme alışkanlıklarını keserek olgunlaşmakta, "gezinme davranışı" olarak bilinen lokomotor dönemi başlatmaktadır. Locomotor aktivitenin ortaya çıktığı bu dönem, larvalarda Rpd3 ifade düzeyini araştırmak için uygun bulunmuştur. Larva ve ergin dönemlerdeki Rpd3 ifade düzeyleri Western blot yöntemi ile araştırılmış olup çalışmalara normalizasyonda kullanılacak uygun *housekeeping* proteinin belirlenmesi ile başlanmıştır. Bu amaçla histon 3 ve alfa tübülün proteinlerinin ifade düzeyleri analiz edilmiş ancak larva ve ergin dönem arasında histon 3 proteininin moleküler ağırlığında, alfa tübülün proteinin ise ifadesinde farklılıklar saptanmıştır. Bu proteinlerin normalizasyon için uygun olmadığının saptanması üzerine çalışmalarda total protein normalizasyonu yöntemi kullanılmıştır. Western blot sonuçları, Rpd3 ifade düzeylerinin SMA'lı ve yabanıl tip sineklerin ergin dönemlerinde larva dönemine göre daha yüksek olduğunu göstermiş olmakla birlikte bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca hayvan laboratuvarında ergin sineklerin larvaya göre daha kolay toplanıp transfer edilebilmesi de dikkate alınarak, fenilbütirik asit uygulama çalışmalarının yapılacağı uygun evrenin "ergin dönem" olduğuna karar verilmiş ve bundan sonraki araştırmalarımız ergin sineklerde yapılmıştır.

Çalışmalarımızın devamında histon asetilasyon analizleri yapılacağı için, asetilasyon çalışmalarında total protein ve histon proteini karşılaştırılması yapılmıştır. Histon ekstraksiyonu ile elde edilen örneklerde modifikasyonların total proteine göre daha iyi korunduğu görülmüş, çalışmaların devamında histon proteini kullanılmasına karar verilmiştir.

Epigenetik disregülasyon, moleküler ve klinik anlamda farklılıklar gösteren nörodejeneratif hastalıklarda görülen yaygın bir mekanizmadır. HAT ve HDAC enzimlerinin tersinir aktivitesi ile korunan histon asetilasyon dengesi, hücre içerisindeki gen ifadesinin doğru bir şekilde kontrol edilmesi için gereklidir. Örneğin, *D.melanogaster*'in Huntington modelinde, Rpd3 ve Sir2 gibi HDAC enzim düzeyleri azaltılarak nöron hücrelerindeki toksisite engellenebilmiştir. Ayrıca, Alzheimer hastalarının beyinlerinde HDAC2 ve HDAC6 düzeylerinin artışı epigenetik regülasyonun bozulmasıyla ilişkili bulunmuştur. Bir başka çalışmada ise HDAC6 düzeyi azaltılmasıyla APP/PS1 fare modelinde ortaya çıkan hafıza bozuklukları düzeltilebilmiştir. (109,110). Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışmasının ikinci aşamasında, SMA'lı ve yabanıl tip sineklerin ergin dönemlerindeki H3K18 ve H3K27 asetilasyon düzeylerinde fark olup olmadığı histon izolasyonu yapılarak araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda yabanıl tip ve SMA'lı sineklerin H3K18 ve H3K27 asetilasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Spesifik asetilasyon düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamasının total histon asetilasyon düzey değişikliğini yansıtmayabileceği düşünülmüş, ileriki çalışmalarda total asetilasyon düzeylerinin araştırılmasının önemli olabileceği yorumu yapılmıştır.

D.melanogaster ve insanda aynı hedefe/etki mekanizmasına sahip olan birçok ilacın keşfedilmesinin yanısıra sinek genomunda yer alan genlerin insan genlerine gösterdiği yüksek homoloji, ilaç tarama çalışmalarının hızlı ve etkili bir biçimde yapılabilmesine yardımcı olmaktadır. Bazı HDAC inhibitörlerinin SMN2 gen ifadesini değiştirerek tam uzunluktaki Smn protein düzeyini artırdığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (61). HDAC inhibitörlerinin SMN2 promotor bölgelerindeki asetilasyon düzeylerini ve/veya serin ve arjinin bakımından zengin olan *splicing* faktörlerinin ifade düzeylerini artırması, tam uzunluktaki Smn protein düzeylerinin artışı ile sonuçlanmaktadır (111). Literatür araştırmalarında, HDAC inhibitörlerinin SMA'lı sinek modeline uygulandığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Önceki çalışmalarımızda sentezlediğimiz inhibitörlerin SMA'lı *Drosophila* modeline uygulanabilmesi için gereken alt yapı bu tez çalışması ile oluşturulmuştur.

Sentezlenen bileşiklerin kısa zincirli yağ asit türevleri olması nedeni ile bu tez çalışmasında, kısa zincirli yağ asiti grubunda bir HDAC inhibitörü olan ve FDA onayı bulunan fenilbütirik asit kullanılmıştır. Fenilbütirik asit, metabolitlerinin biriken nitrojen atılımına yardımcı olması nedeni ile üre döngüsü hastalıklarında ya da şaperon özelliği nedeniyle kistik fibrozis gibi proteinin yanlış katlandığı hastalıkların araştırmalarında kullanılmaktadır (112). Ergin sineklere bileşik uygulaması sırasında takip edilen farklı yöntem ve stratejiler bulunmaktadır. Uygulanacak bileşik besiyeri ile karıştırılarak, aerosol-gaz halinde veya enjeksiyon yoluyla verilebilmektedir. Bu tez çalışmasında fenilbütirik asit besiyeri ile karıştırılarak uygulanmıştır. Bileşiğin ergin sineklere besin yolu ile verilmesinde izlenen ilk yaklaşım, sinekleri 16-18 saate kadar aç bırakmak ve ardından bileşik uygulanmış besiyeri üzerinde birkaç dakikalığına beslenmelerini sağlamaktır, fakat bu yöntemin verimliliği oldukça düşüktür. İkinci yaklaşım ise, bu tez çalışmasında da uyguladığımız gibi fenilbütirik asit içeren besiyeri ortamına bırakılan ergin sineklerin 24 saatten fazla süreyle (5 gün ve 10 gün) beslenmelerini sağlamaktır. Yüksek verimliliğe sahip olan bu yöntem büyük popülasyonlara bileşik uygulanmasına imkan sağlamakla birlikte, bileşik uygulanan besiyeri ortamına uzun süre maruz kalmaya bağlı olarak adaptasyon geliştirilmesi ve dokuların bileşiğe karşı duyarsızlaşması gibi dezavantaj taşımaktadır (72).

Drosophila embriyo hücrelerinin kültüründe yapılan çalışmada fenilbütirik asit'in Rpd3 enzimini inhibe ederek H3K27 asetilasyonunu doğrudan, H3K18 asetilasyonunu ise dolaylı olarak artırdığı gösterilmiştir (45). Bu tez kapsamında; fenilbütirik asit uygulamasının Rpd3 protein düzeyini dolaylı veya doğrudan değiştirdiğini gösterebilmek amacı ile uygulama sonrasında takip edilecek modifikasyon tipleri H3K27 ve H3K18 asetilasyonu olarak belirlenmiştir. Çalışmalarımız sırasında, 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit sineklere 5 gün ve 10 gün süreyle verilerek, H3K18 ve H3K27 asetilasyon ifade düzeyleri takip edilmiştir. Fenilbütirik asit uygulaması sonrasında sinekler 5 dakika sıvı azot içerisinde bekletilmiş, ardından -80 °C'ye kaldırılmış ve kurubuz içerisinde Anabilim Dalı Laboratuvar'ımıza getirilmiştir. 5 mM ve 10 mM konsantrasyondaki fenilbütirik asit 5 gün süreyle uygulandığında, H3K27 asetilasyon düzeyini istatistiksel olarak

anlamli şekilde artirmistir. Bununla birlikte, H3K18 asetilasyon duzeyinde bir degisiklik yaratmamistir. Bu bulgular, fenilbütirik asit'in H3K18 asetilasyon duzeyini duzenleyen farkli HDAC enzimleri tarafından kontrol edilebilecegini ve fenilbütirik asit'in bu enzimler uzerinde etki gostermediğini düşündürmüştür. Fenilbütirik asitin histon asetilasyon artişını indüklediğı dönemde sineklerin lokomotor fonksiyonlarının değişebileceğı düşünülmüş ve yaygın kullanılan lokomotor testlerden biri olan irkilme-sıçrama deneyleri gerçekleştirilmiştir. 5 gün süreyle 5 mM fenilbütirik asit uygulanan yabanıl tip ve SMA'lı sineklerin irkilme-sıçrama yanıtında çözücü uygulanan sineklere göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bileşik uygulama çalışmalarının devamında fenilbütirik asit daha uzun süreyle, 10 gün boyunca 5 mM ve 10 mM dozlarda uygulanmış, her iki asetilasyonun duzeyinde de anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. 5 gün uygulamada görülen H3K27 asetilasyon artişının, 10 gün uygulama sonrasında görülmemesi, uzun süre maruz kalmaya bağlı olarak ortaya çıkan adaptasyonun fenilbütirik asit duyarsızlığına neden olabileceğini düşündürmüştür.

HDAC inhibitör aktivitesi olduğu bilinen fenilbütirik asit kullanılarak yapılan bu tez çalışması sonucunda; SMA'lı *D.melanogaster* modelinde HDAC inhibitör araştırmalarında kullanılabilecek uygun evre ve koşullar belirlenmiş ve daha önce sentezlenmiş olan HDAC inhibitörlerinin etkilerinin *in vivo* ortamda araştırılabilmesine uygun altyapı optimize edilmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Bileşik uygulamasına uygun gelişimsel dönemi belirleyebilmek için, yabanıl tip ve SMA'lı *D.melanogaster*'in larva ve ergin dönemlerindeki Rpd3 ifade düzeyleri araştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, ergin dönemdeki Rpd3 ifade düzeyinin daha yüksek olduğu gözlenerek uygulamaların ergin dönemde yapılması uygun bulunmuştur.
- Histon asetilasyon çalışmalarında total protein veya histon proteini kullanılmasına karar vermek üzere karşılaştırma yapılarak çalışmaların histon proteini devam edilmesinin uygun olduğuna karar verilmiştir.
- Fenilbütirik asit uygulaması öncesinde yabanıl tip ve SMA'lı ergin sineklerden elde edilen histon proteinlerinde H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeyleri Western blot yöntemiyle araştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.
- 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit 5 gün süreyle yabanıl tip ve SMA'lı ergin sineklere uygulandıktan sonra H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeyleri Western blot yöntemiyle incelenmiştir. Her iki dozda uygulanan fenilbütirik asit H3K18 asetilasyonunu değiştirmezken, H3K27 asetilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Bu dönemde 5 mM fenilbütirik asit uygulanan sineklerin irkilme-sıçrama yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.
- 5 mM ve 10 mM fenilbütirik asit 10 gün süreyle yabanıl tip ve SMA'lı ergin sineklere uygulandıktan sonra H3K27 ve H3K18 asetilasyon düzeyleri Western blot yöntemiyle incelenmiş ve anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

- Sonuç olarak, kısa zincirli yağ asiti yapısındaki bileşiklerle gerçekleştirilecek olan histon asetilasyon çalışmalarda bileşik uygulanacak uygun gelişimsel dönemin ergin dönem, uygulama süresinin 5 gün ve takip edilecek olan asetilasyon tipinin H3K27 asetilasyonu olduğu gösterilmiştir.

6.2. Öneriler

İleride SMA'lı sineklere uygulanacak kısa zincirli yağ asitleri çalışmalarında:

- Uygulanacak inhibitör bileşiklerinin standart besiyerleri ile karıştırılarak ergin dönemde uygulanması,
- Gerçekleştirilecek inhibitör uygulaması çalışmalarında, histon proteinleri ile çalışılması,
- Gerçekleştirilecek inhibitör uygulaması çalışmalarında, H3K27 asetilasyon düzeyinin takip edilmesi önerimizdir.

KAYNAKLAR

1. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*.1974;184(4139):868-871.
2. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(2):172-83.
3. Xu F, Zhang K, Grunstein M. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell*. 2005;121(3):375-85.
4. Annunziato A. DNA packaging: nucleosomes and chromatin. *Nature Education*. 2008;1(1):26.
5. Venkatesh S, Workman J. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;(16):178–189.
6. Marzluff WF. Metazoan replication-dependent histone mRNAs: a distinct set of RNA polymerase II transcripts. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(3):274-280.
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K ve ark. *Molecular Biology of the cell*. 6. baskı. USA:Garland Science;2014.
8. Kamakaka RT, Biggins S. Histone variants: Deviants? *Genes Dev*. 2005;19:295-310.
9. Venkatesh S., Workman J. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;(16):178–189.
10. Dutnall RN, Ramakrishnan V. Twists and turns of the nucleosome: tails without ends. *Structure*. 1997;5(10):1255-1259.
11. Akademik sunum, Hücre bölünmesi. [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 23 Aralık 2020]. Erişim adresi:<https://akademiksunum.com/index.jsp?modul=document&folder=faa3794b9b6c3feae8682ddc34d59709b78d4c3c>.
12. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-5.
13. Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression. *Trends in Genetics*. 2016;32(1):42-56.
14. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.

15. Chauhan T. DNA Packaging in Eukaryotes [Internet]. 2020 [Erişim Tarihi 23 Haziran 2020]. Erişim adresi: <https://geneticeducation.co.in/dna-packaging-in-eukaryotes/>.
16. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*. 2011;21(3):381-95.
17. Zhang L, Eugeni EE, Parthun MR, Freitas MA. Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma*.2003;112(2):77-86.
18. Gillette TG, Hill JA. Readers, writers, and erasers: chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circulation research*. 2015;116(7):1245-53.
19. Biswas S, Rao CM. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. 2018;837:8-24.
20. Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling–50 years and counting. *Trends in biochemical sciences*. 2005;30(6):286-90.
21. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:448-462.
22. Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, Verdin E, Mann M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(8):536-50.
23. Biggar KK, Li SS-C. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(1):5-17.
24. Castillo J, López-Rodas G, Franco L. Histone Post-Translational Modifications and Nucleosome Organisation in Transcriptional Regulation: Some Open Questions. *Adv Exp Med Biol*. 2017;966:65-92.
25. Araki Y, Mimura T. The histone modification code in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:1-12.
26. Chen R, Kang R, Fan XG, Tang D. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis*. 2014;5(8):e1370.

27. Greer, E., Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* **13**, 343–357 (2012).
28. Wei S, Li C, Yin Z, Wen J, Meng H, Xue L, ve ark. Histone methylation in DNA repair and clinical practice: new findings during the past 5-years. *Journal of Cancer*. 2018;9(12):2072-81.
29. Jambhekar A, Dhall A, Shi Y. Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20:625-641.
30. Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*. 2012;7(10):1098-108.
31. Alaskhar Alhamwe, B., Khalaila, R., Wolf, J. et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol* 14, 39 (2018).
32. Meas R, Mao P. Histone ubiquitylation and its roles in transcription and DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 2015;36:36-42.
33. Cao J, Yan Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol*. 2012;2:26.
34. Seeler JS, Dejean A. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:690-699.
35. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:357-385.
36. Wilson VG. Introduction to Sumoylation. *Adv Exp Med Biol*. 2017;963:1-12.
37. Zhang D, Tang Z, Huang H. ve ark. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*, 2019;574:575–580
38. Izzo LT, Wellen KE. Histone lactylation links metabolism and gene regulation. *Nature*. 2019 Oct;574(7779):492-493.
39. Barnes P, Adcock I, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *European Respiratory Journal*. 2005;25(3):552-63.

40. Gräff J, Tsai L-H. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(2):97-111.
41. Ladurner AG, Inouye C, Jain R, Tjian R. Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell*. 2003;11(2):365-376.
42. Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *Biomed. Research International*. 2010;2011:1-10.
43. Kasper LH, Qu C, Obenauer JC, McGoldrick DJ, Brindle PK. Genome-wide and single-cell analyses reveal a context dependent relationship between CBP recruitment and gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(18):11363-11382.
44. Henry AR, Singh T, Kuo MY, Biester A, O'Keefe A, Lee S, Andrews JA, O'Reilly MA. (2016) Quantitative measurement of histone tail acetylation reveals stage specific regulation and response to environmental changes during *Drosophila* Development. 55(11): 1663-167.
45. Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Sinha JP, Stepanik V, Zlobin A, et al. CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* polycomb silencing. *Development*. 2009;136:3131-3141.
46. Barnes CE, English DM, Cowley SM. Acetylation & Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. *Essays in biochemistry*. 2019;63(1):97-107.
47. Trisciuglio D, Di Martile M, Del Bufalo D. Emerging role of histone acetyltransferase in stem cells and cancer. *Stem cells international*. 2018;2018:1-10.
48. Lee CY, Grant PA. Role of histone acetylation and acetyltransferases in gene regulation. McCullough SD, Dollinoy D, editors. *Toxicogenetics: Core Principles and Applications*. London: Academic Press; 2018.
49. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(4):a018713.
50. Gramates LS, Marygold SJ, Santos GD, Urbano JM, Antonazzo G, Matthews BB et al. FlyBase at 25: looking to the future. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D663-D671.

51. Kasten MM, Dorland S, Stillman DJ. A large protein complex containing the yeast Sin3p and Rpd3p transcriptional regulators. *Mol Cell Biol.* 1997;17:4852–4858.
52. Woods JK, Rogina B. The effects of Rpd3 on fly metabolism, health, and longevity. *Exp Gerontol.* 2016; 86:124-128.
53. Wang Z, Lyu J, Wang F, Miao C, Nan Z, Zhang J, et al. The histone deacetylase HDAC1 positively regulates Notch signaling during *Drosophila* wing development. *Biol Open.* 2018;20;7(2):bio029637.
54. Lawlor L, Yang XB. Harnessing the HDAC–histone deacetylase enzymes, inhibitors and how these can be utilised in tissue engineering. *International journal of oral science.* 2019;11(2):1-11.
55. Xu W, Parmigiani R, Marks P. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene.* 2007;26(37):5541-52.
56. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1414.
57. Robey RW, Chakraborty AR, Basseville A, Luchenko V, Bahr J, Zhan Z, et al. Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance. *Molecular pharmaceutics.* 2011;8(6):2021-31.
58. Mwakwari S, Patil V, Guarrant W, Oyelere AK. Macrocyclic histone deacetylase inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry.* 2010;10(14):1423-40.
59. Mai A, Rotili D, Valente S, Kazantsev AG. Histone deacetylase inhibitors and neurodegenerative disorders: holding the promise. *Current pharmaceutical design.* 2009;15(34):3940-57.
60. Saha R, Pahan K. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death & Differentiation.* 2006;13(4):539-50.
61. Didonna A, Opal P. The promise and perils of HDAC inhibitors in neurodegeneration. *Annals of clinical and translational neurology.* 2015;2(1):79-101.
62. Allocca M, Zola S, Bellosta P. The fruit fly, *Drosophila melanogaster*: the making of a model (Part I). Perveen FK, (eds). *Drosophila melanogaster: Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics.* Rijeka, Croatia: InTech;2018.

63. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. 2000;287(5461):2185-95.
64. Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. Genome Res. 2001;11(6):1114-1125.
65. Ryder E, Russell S. Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila*. Brief Funct Genomic Proteomic. 2003;2(1):57-71.
66. Zhong J, Yedvobnick B. Targeted gain-of-function screening in *Drosophila* using GAL4-UAS and random transposon insertions. Genet Res (Camb). 2009;91(4):243-258.
67. Vatolina TY, Boldyreva LV, Demakova OV, et al. Identical functional organization of nonpolytene and polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. PLoS One. 2011;6(10):e25960.
68. Jennings BH. *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine. Materials today. 2011;14(5):190-5.
69. Ashburner M, Golic KG, Hawley RS. *Drosophila: A laboratory handbook*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005.
70. Linford NJ, Bilgir C, Ro J, Pletcher SD. Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. J Vis Exp. 2013;(71):50068.
71. Hazır C, Bora G, Yurter EH. Nörodejeneratif hastalık araştırmalarında *Drosophila melanogaster*'in yeri. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2020;46(2):237-245.
72. Pandey UB, Nichols CD. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. Pharmacol Rev. 2011;63:412-431.
73. McGurk L, Berson A, Bonini NM. *Drosophila* as an in vivo model for human neurodegenerative disease. Genetics. 2015;201(2):377-402.
74. Tortarolo M, Coco DL, Veglianese P, et al. Amyotrophic lateral sclerosis a multisystem pathology: Insights into the role of TNF α . Mediators of Inflammation. 2017;2017:1-16.
75. Casci I, Pandey UB. A fruit fly endeavor: Modeling ALS in the fruitfly. Brain Res. 2015;1607:1-28.

76. DeMaagd G, Philip A. Parkinson's disease and its management: part 1: disease entity, risk actors, pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. *Pharmacy and Therapeutics*. 2015;40(8):504-32
77. Xiong Y, Yu J. (2018) Modeling Parkinson's disease in *Drosophila*: What have we learned from dominant traits?. *Front Neurol*. 2018;9:1-15.
78. Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1638-1643.
79. Morris JK, Honea RA, Vidoni ED, Swerdlow RH, Burns JM. Is Alzheimer's disease a systemic disease?. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(9):1340-1349.
80. Prüßing K, Voigt A, Schulz JB. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2013;8:35.
81. Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y. Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: A potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:6623-6628.
82. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-65.
83. Melki J, Lefebvre S, Bürglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, et al. De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science*. 1994;264(5164):1474-7.
84. Groen EJ, Talbot K, Gillingwater TH. Advances in therapy for spinal muscular atrophy: promises and challenges. *Nature Reviews Neurology*. 2018;14(4):214-24.
85. Chaytow H, Huang Y-T, Gillingwater TH, Faller KM. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cellular and molecular life sciences*. 2018;75(21):3877-94.
86. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin*. 2015;33(4):831-846.
87. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Human molecular genetics*. 1999;8(7):1177-83.

88. Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT ve ark. The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn*^(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2000;9(3):333–339.
89. Chang HC, Dimlich DN, Yokokura T, Mukherjee A, Kankel MW, Sen A ve ark. Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. *PLoSOne.* 2008;3(9):e3209.
90. Butchbach ME. Copy number variations in the survival motor neuron genes: implications for spinal muscular atrophy and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in molecular biosciences.* 2016;3:1-10.
91. Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, Akutsu T, Takeshima Y, Wada H, ve ark. Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *Journal of neurology.* 2002;249(9):1211-9.
92. Lamar K-M, McNally EM. Genetic modifiers for neuromuscular diseases. *Journal of neuromuscular diseases.* 2014;1(1):3-13.
93. Kreipke RE, Kwon YV, Shcherbata HR, Ruohola-Baker H. *Drosophila melanogaster* as a Model of Muscle Degeneration Disorders. *Curr Top Dev Biol.* 2017;121:83-109.
94. Praveen K, Wen Y, Matera AG. A *Drosophila* model of spinal muscular atrophy uncouples snRNP biogenesis functions of survival motor neuron from locomotion and viability defects. *Cell Rep.* 2012;1(6):624-631.
95. Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, Shpargel KB, Saiz HK, Matera AG. A *Drosophila* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J Cell Biol.* 2007;176(6): 831-841.
96. Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C, et al. Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum Mol Genet.* 2003;12(12):1367-1376.
97. Grice SJ, Liu JL. Survival motor neuron protein regulates stem cell division, proliferation, and differentiation in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2011;7(4):e1002030.
98. Fernandez-Hernandez I, Scheenaard E, Pollarolo G, Gonzalez C. The translational relevance of *Drosophila* in drug discovery. *EMBO Rep.* 2016;17:471-2.

99. Aquilina B, Cauchci RJ. Modelling motor neuron disease in fruit flies: Lessons from spinal muscular atrophy. *J Neurosci Methods*. 2018;310:3-11.
100. Edens BM, Ajroud-Driss S, Ma L, Ma YC. Molecular mechanisms and animal models of spinal muscular atrophy. *Biochim Biophys Acta*, 2015;1852:685-92.
101. Markow TA, O'Grady PM. *Drosophila*: a guide to species identification and use. Netherlands:Academic Press. 2005.
102. Bora-Tatar G, Dayangaç-Erden D, Demir AS, Dalkara S, Yelekçi K, Erdem-Yurter H. Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies. *Bioorg Med Chem*. 2009;17(14): 5219-5228.
103. Dayangaç-Erden D, Bora-Tatar G, Dalkara S, Erdem-Yurter H. Carboxylic acid derivatives of histone deacetylase inhibitors induce full length SMN2 transcripts: a promising target for spinal muscular atrophy therapeutics. *Arch.of Medical science*. 2011;(7):230-234.
104. Ayhan Eşiyok P, Seven Ö, Eymur G, Bora-Tatar G, Dayangac Erden D, Yelekçi K, ve ark. Aryl butenoic acid derivatives as a new class of histone deacetylase inhibitors: Synthesis, in vitro evaluation and molecular docking studies. *Turk. J. Chem*. 2014;(38):338-344.
105. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc*. 2007;2(6):1445-1457.
106. Harada Y, Rao VK, Arya K, Kuntz NL, Didonato CJ, Pomerantz GN, ve ark. Combination molecular therapies for type 1 spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 2020;62(4):550-554.
107. Bora G, Sarı S, Taşkor G, Dalkara S, Erdem-Yurter H. Class I histone deacetylase inhibition by aryl butenoic acid derivatives: In silico and in vitro studies. *JResPharm*.2019;23(5):952-959.
108. Spring AM, Raimer AC, Hamilton CD, Schillinger MJ, Matera AG. Comprehensive Modeling of Spinal Muscular Atrophy in *Drosophila melanogaster*. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:113:1-16.
109. Berson A, Nativio R, Berger SL, Bonini NM. Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci*. 2018;41(9):587-598.
110. Kwon MJ, Kim S, Han MH, Lee SB. Epigenetic Changes in Neurodegenerative Diseases. *Mol Cells*. 2016;39(11):783-789. doi:10.14348/molcells.2016.0233.

- 111.** Lunke S, El-Osta A. Applicability of histone deacetylase inhibition for the treatment of spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics*. 2013;10(4):677-687.
- 112.** Iannitti T, Palmieri B. Clinical and Experimental Application of Sodium Phenyl Butyrate. *Drugs R D*. 2011; 11(3): 227-249.



EKLER

EK-1 Tez Orijinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI; SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'Lİ DROSOPHILA MELANOGASTER MODELİNDE RPD3 PROTEİNİ VE HİSTON ASETİLASYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖĞRENCİNİN ADI-SOYADI; CEM HAZIR

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI; 57

SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'Lİ DROSOPHILA MELANOGASTER MODELİNDE RPD3 PROTEİNİ VE HİSTON ASETİLASYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**7**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**0**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**4**

2

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

%**2**

3

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

%**1**

4

FIRINCIOĞULLARI, Merve, YAVUZ, Burak and KOÇ, Filiz. "Ön Boynuz Tutulumuyla Giden Hastalıklar", Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2016.

Yayın

<%**1**

5

Submitted to Bülent Ecevit Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

Submitted to TechKnowledge Turkey

Öğrenci Ödevi

<%**1**

7

Submitted to Ataturk Universitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

EK-2 Dijital Makbuz

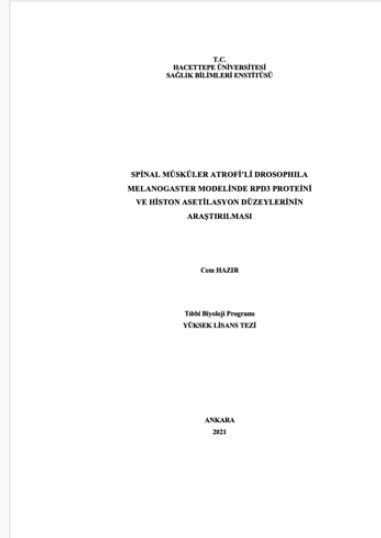


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Cem Hazir
 Ödev başlığı: SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'Lİ DROSOPHILA MELANOGASTER ...
 Gönderi Başlığı: SPİNAL MÜSKÜLER ATROFİ'Lİ DROSOPHILA MELANOGASTER ...
 Dosya adı: D3_PROTE_N_VE_H_STON_ASET_LASYON_D_ZEYLER_N_N_ARA...
 Dosya boyutu: 5.13M
 Sayfa sayısı: 57
 Kelime sayısı: 8,372
 Karakter sayısı: 60,238
 Gönderim Tarihi: 29-Nis-2021 04:45PM (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 1573362837



9. ÖZGEÇMİŞ

