

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

NÖRODEJENERETİF HASTALIKLARIN TEDAVİSİ  
ÇALIŞMALARINDA KULLANILMAK ÜZERE  
HUNTINGTON HÜCRE HATTI MODELLERİNİN  
ÜRETİLMESİ

HALUK CAMCI

DANIŞMAN  
PROF. DR. Ş. ÜMİT ZEYBEK

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2018

**TEZ ONAYI****DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı Programında Doktora Programı öğrencisi **Haluk CAMCI**'nın tarafından **Prof. Dr. Ş. Ümit ZEYBEK**'in danışmanlığında hazırlanan “**Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisi Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Huntington Hücre Hattı Modellerinin Üretilmesi**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 13/07/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Programı Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı  
Danışman**

**Prof. Dr. Ş. Ümit ZEYBEK**  
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

**Jüri**

**Prof. Dr. Arzu ERGEN**  
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

**Jüri**

**Prof. Dr. Ali Osman GÜROL**  
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE  
İmmünoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

**Dr. Öğr. Üyesi Elif Sinem İPLİK**  
İstanbul Yeni Yüzyıl Üni. Ecz. Fak.  
Farmasötik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

**Jüri**

**Dr. Öğr. Üyesi Müjdat AYTEKİN**  
Haliç Üni. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya  
Anabilim Dalı

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

HALUK CAMCI



# İTHAF



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca ihtiyacım olan her an yanımda bulunan ve bana desteklerini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ş. Ümit Zeybek'e tüm yardımları ve yol göstericiliği için teşekkür ederim.

Süreç içerisinde değerli eleştirileri ile tezimi ve çalışmamı daha ileri taşıyan hocalarım Sn. Prof. Dr. H. Arzu ERGEN, Sn. Prof. Dr. Ali Osman GÜROL, Sn. Dr. Öğr. Üy. Elif Sinem BİRELLER ve Dr. Öğr. Üy. Yemliha YILDIZ'a teşekkür ederim.

Başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. İlhan YAYLIM olmak üzere, bana olan her tür türlü yardımları için Tüm Aziz SANCAR DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı üyelerine teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca değerli katkıları ile bu tezin daha iyi bir hale gelmesine neden olan Sabancı Üniversitesi Doğa Bilimleri Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Devrim GÖZÜAÇIK hocama teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28003

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
İTHAF .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	xii
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar .....	3
2.2. Poli Glutamin Zinciri (PoliQ) Kaynaklı Hastalıklar .....	4
2.2.1. Çeşitleri ve Nedenleri.....	4
2.2.2. Patolojisi ve Tedaviye Yönelik Yaklaşımlar.....	5
2.2.3. Bir PoliQ Hastalığı olarak Huntington .....	7
2.3. HUNTINGTON HASTALIĞI (HD) .....	8
2.3.1. Genel Bilgiler .....	8
2.3.2. Semptomlar .....	11
2.3.2.1. Motor Bozukluklar .....	11
2.3.2.2. Bilişsel Problemler.....	11
2.3.2.3. Psikiyatrik Sorunlar .....	11
2.3.3. Hd'nin Tedavisi Ve Semptomların İyileştirilmesine Yönelik Yaklaşımlar .....	12
2.3.3.1. Farmakolojik Yaklaşımlar .....	12
2.3.3.2. Moleküler Yaklaşımlar .....	13
2.4. Çalışmanın Literatür ile uyumu .....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	26
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Reaktifler.....	26
3.1.1. Cihazlar.....	26

3.1.2. Kitler ve Reaktifler.....	26
3.2. Sentetik Genlerin Temini .....	27
3.3. Restriksiyon Kesim Reaksiyonu .....	27
3.4. DNA Ligasyon Reaksiyonu .....	27
3.5. pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 ve pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidlerinin E.coli DH5α bakteri hücrelerine transformasyonu .....	28
3.5.1. Inoue Tamponu Kullanılarak Kompetant Hücrelerin Hazırlanışı .....	28
3.5.2. Transformasyon Reaksiyonu ve Kolonilerin Seçimi .....	29
3.5.3. Klonlanmış Kolonilerden Plazmid İzolasyonu .....	29
3.5.4. Plazmidlerin Restriksiyon Enzim Kesimi ile Doğrulanması .....	29
3.6. pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 ve pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidlerinin HEK293 ve SHSY5Y hücre hattına Transfeksiyonu .....	29
3.6.1. Hücre Kültürü Hazırlanışı ve İnkubasyonu .....	29
3.6.2. Transfeksiyon Reaksiyonun Hazırlanışı .....	29
3.7. Transfekte olmuş HEK293 Hücre hattının ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile görüntülenmesi .....	30
3.8. Transfekte olmuş HEK293 Hücre hattının Nikon Eclipse Ti model floresan mikroskop ile görüntülenmesi .....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Sentetik Genlerin Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması .....	31
4.1.1. Plazmide Klonlama .....	31
4.2. PoliQ25 ve PoliQ103 plazmidlerinin transformasyonu .....	32
4.2.1. Transformasyon .....	32
4.2.2. Plazmid İzolasyonu ve Kesim ile doğrulama .....	32
4.3. PoliQ25 ve PoliQ103 Plazmidlerinin HEK293 Hücre Hattına Transfeksiyonu ve GFP-Füzyonlu mutant Htt proteini birikiminin gösterilmesi .....	33
4.3.1. HEK293 Transfeksiyonlarının ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile görüntülenmesi .....	33
4.3.2. HEK293 Transfeksiyonlarının Nikon Eclipse Ti Floresan Mikroskop ile görüntülenmesi .....	38
4.3.3. SHSY5Y Transfeksiyonlarının ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile görüntülenmesi .....	43
4.3.4. SHSY5Y Transfeksiyonlarının Nikon Eclipse Ti Floresan Mikroskop ile görüntülenmesi .....	46

5. TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR.....	52
HAM VERİLER.....	65
FORMLAR.....	66
ETİK KURUL KARARI.....	67
PATENT HAKKI İZİNİ .....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	72



## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. DNA'yı hedef alan HTT azaltımı temelli yaklaşımlar .....	19
Tablo 3.1. Restriksiyon Kesim Reaksiyonu .....	22
Tablo 3.2. DNA Ligasyon Reaksiyonu .....	22
Tablo 3.3. Inoue Transformasyon Tampon İçeriği .....	23



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Tetrabenazinin Kimyasal Yapısı .....	12
Şekil 2-2 mHtt Transkripsiyonunun düşürülmesini hedef alan yaklaşımlar ...	15
Şekil 2-3 İlk, ikincil, üçüncül jenerasyon ASO ve doğal DNA Molekülü .....	17
Şekil 2-4 Farklı türlerde karakteristik UPR Yolaklarının genel şeması .....	21
Şekil 4-1 BAMHI Plazmid Kesim Reaksiyonu .....	29
Şekil 4-2 Transformasyon Sonrası Seçici Besiyeri Görüntüleri .....	30
Şekil 4-3 Transformasyon Sonrası BAMHI enzim kesimi .....	31
Şekil 4-4 PoliQ25-HEK293 24. Saat ZOE Görüntüsü .....	33
Şekil 4-5 PoliQ25-HEK293 48. Saat ZOE Görüntüsü .....	33
Şekil 4-6 PoliQ25-HEK293 72. Saat ZOE Görüntüsü .....	34
Şekil 4-7 PoliQ103-HEK293 24. Saat ZOE Görüntüsü .....	35
Şekil 4-8 PoliQ103-HEK293 48. Saat ZOE Görüntüsü .....	35
Şekil 4-9 PoliQ103-HEK293 72. Saat ZOE Görüntüsü .....	36
Şekil 4-10 PoliQ25-HEK293 24. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	37
Şekil 4-11 PoliQ25-HEK293 48. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	38
Şekil 4-12 PoliQ25-HEK293 72. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	38
Şekil 4-13 PoliQ103-HEK293 24. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	39
Şekil 4-14 PoliQ103-HEK293 48. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	40
Şekil 4-15 PoliQ103-HEK293 72. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	40
Şekil 4-16 PoliQ25-SHSY5Y 24. Saat ZOE Görüntüsü .....	41
Şekil 4-17 PoliQ25-SHSY5Y 48. Saat ZOE Görüntüsü .....	42
Şekil 4-18 PoliQ25-SHSY5Y 72. Saat ZOE Görüntüsü .....	42
Şekil 4-19 PoliQ103-SHSY5Y 24. Saat ZOE Görüntüsü .....	43
Şekil 4-20 PoliQ103-SHSY5Y 48. Saat ZOE Görüntüsü .....	43
Şekil 4-21 PoliQ103-SHSY5Y 72. Saat ZOE Görüntüsü .....	44
Şekil 4-22 PoliQ25-SHSY5Y 24. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	45
Şekil 4-23 PoliQ25-SHSY5Y 48. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	45
Şekil 4-24 PoliQ25-SHSY5Y 72. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	45

Şekil 4-25 PoliQ103-SHSY5Y 24. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	46
Şekil 4-26 PoliQ103-SHSY5Y 48. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	46
Şekil 4-27 PoliQ103-SHSY5Y 72. Saat Nikon Eclipse Ti Görüntüsü .....	46



## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ALS</b>	Amyotrophic Lateral Sclerosis
<b>MS</b>	Multiple Sclerosis
<b>HD</b>	Huntington Disease
<b>DNA</b>	Deoksiribonucleic Asid
<b>RNA</b>	Ribonucleic Asid
<b>SCA</b>	Spino Cerebral Ataksi
<b>PoliQ</b>	Poli Glutamin Zinciri
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>OKB</b>	Obsesif Kompulsif Bozukluk
<b>TBZ</b>	Tetrabenzine
<b>SSRI</b>	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
<b>ASO</b>	Anti Sense Oligonukleotid
<b>FDA</b>	Federal Drug Agency
<b>SMA</b>	Spinal Muscular Atrophy
<b>RNAi</b>	RNA interference
<b>siRNA</b>	Small interfering RNA
<b>RISC</b>	RNA Induced Silencing Complex
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>MSS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>AAV</b>	Adeno Asociated Virus
<b>CRISPR</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<b>SBMA</b>	Spinal and Bulbar Muscular Atrophy
<b>DRPLA</b>	Dentatorubral-pallidoluyisian atrophy
<b>AR</b>	Androjen Receptor
<b>Htt</b>	Huntingtin Protein
<b>mHtt</b>	Mutant Huntingtin Protein
<b>N17</b>	First N-terminal Ekzon of Htt
<b>SUMO</b>	Small Ubiquition-like modifier
<b>PTM</b>	Post Translasyonal Modification

## ÖZET

**CAMCI H.** Nörodejeneratif Hastalıkların Tedavisi Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Huntington Hücre Hattı Modellerinin Üretilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2018.

Nörodejeneratif hastalıklar çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biri olup birçok insanı etkilemektedir. Alzheimer, Parkinson, MS ve Huntington gibi birçok çeşidi olan bu hastalıklar genel itibarı ile anormal, yanlış katlanmış proteinlerin birikimi sonucu meydana gelmektedir.

Huntington hastalığı genetik geçiş gösteren, koretik hareket, psikolojik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize bir nörodejeneratif bozukluktur. Huntingtin proteinini kodlayan HD geninin 1.Exonunda bulunan Glutamin kodlayan CAG kodonunun fazla miktarda tekrar etmesi nedeni ile oluşur. İlk on yedi aminoasidi takiben başlayan CAG kodon tekrarlarının otuz beşi aşması durumunda hastalık görünür. Oluşan mutant proteinler sitoplazmada birikerek toksik bir etkiye neden olur.

Nörodejeneratif rahatsızlıklar son yıllarda moleküler tıbbın ilgisinin yoğunlaştığı bir hastalık grubudur. Bir tek gen hastalığı olarak Huntington tüm nörodejeneratif rahatsızlıklara yönelik tedaviler geliştirebilmek için iyi bir başlangıç noktası ve model olarak görünmektedir.

Çalışmamızda moleküler gen klonlama teknikleri kullanılarak huntington hastalığının tedavisine yönelik gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalarda kullanılmak üzere model hücre hatları elde edilmiştir. Başarılı bir şekilde elde edilen bu hücreler, ileride gerçekleştirmek istediğimiz daha ileri ve detaylı çalışmalar için temel alacağımız modeller olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Nörodejeneratif Hastalıklar, Huntington, Çoklu Glutamin Zinciri, Model Hücre Hattı, Protein topaklanması,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 28003

## ABSTRACT

**CAMCI H.** Production of Huntington Cell Line Models for Use in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. Istanbul University İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. İstanbul. 2018.

Norodegeneratif diseases one of the most important health problem in our Century. Accumulation of abnormal proteins is main cause of this kind of diseases, such as Alzheimer, Parkinson, MS and Huntington.

Huntington is a norodegeneratif disease that show genetic transition, choretic movement and pysical breakdown. Cause of Huntington is existence of multiple repeat CAG sequences in HD gene first exon that coding Glutamine. Symptoms appears if the CAG codon repeats starting after the first seventeen amino acids exceed thirtyfive. When abnormal proteins accumulate in sytoplasm cause toxic effect on cell.

Neurodegenerative disorders are a group of diseases in which molecular medicine has become more intense in recent years. As a single gene disorder, Huntington appears to be a good starting point and model for developing treatments for all neurodegenerative disorders.

In our study, model cell lines were obtained for use in the studies planned for the treatment of Huntington's disease using molecular gene cloning techniques. These cells, which have been successfully obtained, will be the models we will base on further and detailed studies that we would like to carry out in the future.

**Key Words:** Neurodegenerative Diseases, Huntington, Multiple Glutamine Chain, Model Cell Line, Protein aggregation.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 28003

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Parkinson, ALS, Alzheimer, MS, Huntington ve benzeri bir çok hastalığın içinde bulunduğu nörodejeneratif hastalıklar dünya nüfusunun önemli bir bölümünü etkilemektedir. Nörodejeneratif hastalıklar proteinlerin yanlış katlanarak sinir hücreleri içerisinde birikmesi ve toksik etkiler oluşturması sonucu meydana gelmektedir. Geri döndürülemeyen bu toksik etki basit hareket bozuklukları, hafıza kaybı, psikiyatrik sorunlar, felç ve hatta ölümlü noktalan bir çok klinik bulguya neden olabilir. Bu nedenle nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi, tedavisi, ya da seyrinin hafifletilmesi tıp alanında daima üzerine yoğunlaşıl konulardan biri olmuştur. Farklı türlerinde farklı etmenlerin dahil olmakla birlikte nörodejeneratif hastalıkların neredeyse tamamı genetik temellere, bozukluklara dayanmaktadır ve tedavilerine yönelik yaklaşımlarda bu doğrultuda yürümektedir. Bu bağlamda nörodejeneratif hastalıkların moleküler mekanizmasının keşfi ve bu mekanizmanın tamir ya da tedavi edilmesi moleküler tıp biliminin en önemli uğraşlarından biri haline gelmiştir.

Huntington hastalığı, genetik geçiş gösteren, koretik (titreme, sıçrama) hareket, psikolojik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize bir nörodejeneratif bozukluktur. Her 100.000 kişide ortalama olarak beş ila on kişide rastlanmakta olup, başlama çağına göre iki sınıfa ayrılmaktadır (Bates G, Harper P, Jones Lc 2002). Juvenil HD olarak adlandırılan erken yaş sendromu genellikle 20'li yaşlardan önce başlar. Erişkin Sendrom ise ileriki yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Huntington ölümcül olarak ilerleyen acımasız bir hastalıktır ve semptomların ortaya çıkmasını takiben ortalama yaşam süresi 15 ila 20 yıl arasındadır (Mestre D. Ve ark. 2009).

Huntington'un genetik temeli, HD geninin ilk ekzonunda bulunan ve glutamin kodlayan CAG kodonunun fazla miktarda tekrar etmesi ile oluşan mutant huntingtin (mHtt) proteininin verdiği nörolojik hasardır. Normal koşullarda HD geni ilk on yedi aminoasidini takiben onbir ila otuz beş arasında tekrarlanan CAG kodonu içerir. Bu sayılar arasında ki bir tekrar proteinin normal işleyişini etkilemezken tekrar miktarının otuzbeşi aşması durumunda yüksek olasılık ile patolojik durum ortaya çıkar. (Rubinsztein DC ve ark. 1996) . Çalışmalar

göstermiştir ki yaş ile birlikte gen içerisinde yer alan CAG tekrarları artmaktadır. Ayrıca CAG tekrarlarının uzunluğu hastalığın ilerleme ve seyir şiddetini de etkilemektedir (Brinkman RR ve ark. 1997, Trottier Y ve ark. 1994, Brandt J ve ark. 1996).

Son yıllarda Huntington hastalığının tedavisine yönelik bir çok yeni moleküler yaklaşım ortaya konulmuştur. Hücre içi protein kalite kontrol mekanizmasında rol alan moleküler şaperonların rolü, DNA ve RNA temelli yaklaşımlar, Endoplasmik retikulum stresinin düzenlenmesi gibi yaklaşımlar bunlardan en önemlileridir. Bizde moleküler tıp anabilim dalı olarak genelde nörodejeneratif bozukluklar, özelde ise Huntington hastalığının moleküler mekanizmasının keşfine yönelik benzer çalışmalar yürütmek istegindeyiz.

Bu tezin amacı bölümümüzde yapılması planlanan Huntington hastalığının moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve muhtemel tedavi yöntemlerinin keşfedilebilmesine yönelik çalışmalar için bir altyapı ve dayanak oluşturulması adına Huntington patalojisine sahip hücre hatları üretilmesini sağlamaktır. Tarafımızdan uygulanarak optimizasyonu sağlanan bu metod sayesinde hali hazırda ticari olarak bulunamayan model huntington hücre hatlarının elde edilmesi sağlanacaktır. Oluşturulan bu model hücre hatları ve metod öncelikle bölümümüzde ve devamında da ülkemizde yapılacak huntington çalışmaları için bir temel oluşturacak ve ileride yapılacak çalışmaları kolaylaştıracaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nörodejeneratif Hastalıklar

Nörodejeneratif hastalıklar insan beyninde ki nöronları etkileyen hastalıklar için kullanılan şemsiye bir terimdir. Dünya çapında milyonlarca insanı etkilemektedir. Amerika'da beş milyon insan Alzheimer teşhisi ile yaşarken, parkinsonlu hasta sayısı da beşyüzbinin üzerindedir("Https://www.niehs.nih.gov"). Avrupa'da ise yedi milyonun üzerinde ki insan Alzheimer ile yaşamaktadır. Sinir hücreleri (nöronlar) vücut tarafından yenilenemezler. Bu nedenle Alzheimer, Parkinson, Huntington ve benzeri hastalıklar sonucu oluşan nöron kaybı telafi edilemez. Bunun sonucu olarak hareket bozuklukları,psikiyatrik sorunlar,demans ve hatta ölümlerle sonuçlanan hasarlar meydana gelmektedir ("Http://www.neurodegenerationresearch.eu"). Bu hastalıkların bir çoğu genetik bozukluklar olmasına rağmen tümör, inme ve alkolizm nedenli olarak da oluşabilirler.

Yaş ile ilişkili olan Alzheimer, Parkinson, ALS ve farklı olarak Huntington gibi birkaç poliglutamin hastalığı ve spinoserebral ataksinin farklı formları (SCA;SCA1-3, SCA6, SCA7) dahil olmak üzere neredeyse tüm nörodejeneratif hastalıklar ölüm sonrası beyin örneklerinde protein agregatlarının görülmesi ile karakterizedir (Harm H. Kmpinga, Steven Bergink 2016). Bu nedenle yanlış katlanmış proteinlerin insan beyninde birikimi bir çok nörodejeneratif hastalığın kritik özelliğidir (Rachel E Lake ve ark. 2017).

Proteinler fonksiyonlarını yerine getirebilmek amacı ile üç boyutlu konformasyonlarına ulaşmak zorundadırlar. Yapılan in-Vitro çalışmalarda proteinlerin kendi başlarına üç boyutlu konformasyonlarına ulaştıkları gösterilmiştir. Bunun sonucunda anlaşılmıştır ki proteinler nihai yapılarına ulaşmak için gerekli olan bilgileri aminoasit dizileri üzerinde taşımaktadır (Anfinsen,1973). Bununla birlikte hücre içinde hem süreci hızlandırmak hem de etkinliği arttırmak amacı ile katlanma aşamasına yardımcı proteinler eşlik etmektedir (Hartl 1996). Bunlar ısı şoku proteinleri olarak da adlandırılan şaperonlardır.

Proteinler yaşlanma, hücresel stres, genetik etmenler gibi birçok farklı nedenden dolayı üç boyutlu yapılarına katlanamayabilirler. Yanlış katlanmış (mis-folded) proteinler olarak adlandırılan bu moleküller hücrede birikerek sitotoksik etkiye neden olurlar. Bu birikimin ana neden olduğu, yanlış katlanmış protein hastalıkları ya da konformasyonel protein hastalıkları denilen ayrı bir hastalık grubu tanımlanmıştır ve bu hastalıkların nereden ise tamamı ALS (amyotrophic lateral sclerosis) Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's gibi nörodejeneratif hastalıklardır.

## **2.2. Poli Glutamin Zinciri (PoliQ) Kaynaklı Hastalıklar**

### **2.2.1. Çeşitleri ve Nedenleri**

Huntington'un da dahil olduğu poliglutamin (PoliQ) hastalıkları otozomal geçişli kalıtsal hastalıklarken Alzheimer, Parkinson ve Amyo-Trofik Lateral Sklerozun(X bağlantılı spinal bulbar kas atrofisi hariç) birçoğu sporadiktir (Harm H. Kmpinga, Steven Bergink 2016).

Birbirleri ile ilişkisi tespit edilememiş en az 9 farklı proteinde; uzamış(genişlemiş) poliglutamin zincirlerinin nöronal işlev bozukluğu ve dejenerasyona neden olduğu tanımlanmıştır. Tüm bu hastalıklarda poliglutamin zincirlerinin uzunluğunun hastalığın ortaya çıkış yaşı ve poliQ birikimi ile ilişkili olduğu gösterilmiş; hastalığın başlama yaşının tamamı ile poliQ zincirlerinin uzunluğu tarafından belirlendiği ortaya konmuştur. İlginç bir şekilde bahsedilen hastalıklarda poliQ zincir uzunluklarının patolojik etkilerinin başlaması için gereken tekrar sayısının hastadan hastaya değişenlik gösterebildiği ortaya çıkmıştır. Farklı poliQ hastalıklarının karşılaştırılması sonucu poliQ tekrarlarının uzunluğunun hastalığın ortaya çıkışı üzerinde ki etkisinin ve agregasyon birikimlerinin aynı zamanda poliQ zincirinin başında ve sonunda yer alan aminoasit dizisi ile de ilişkili olduğu görülmüştür. Bu bize agregasyonun oluşmasında başı ve sonu ile poliQ tekrar bölgesinin doğrudan ya da protein kalite kontrol ağının bileşenleri ile etkileşimi nedeni ile dolaylı olarak rol oynadığını gösterebilir. Gerçekten de yapılan çalışmalar moleküler şaperonların farklı poliQ proteinlerinin işlenmesinde etkileri olduğunu göstermiştir. PoliQ zincirinin uzunluğunun kendisi, poliQ zincirinin öncül ve ardıl aminoasit dizileri, ilişkili olduğu diğer hücresel bileşenler, poliQ taşıyan proteinlerin işlenmesi ve

translasyon sonrası modifikasyonlar farklı şekillerde polyQ agregasyonunda rol almaktadır (E.F.E. Kuiper ve ark. 2017).

PoliQ agregatları diğer bir çok nörodejeneratif hastalıkta olduğu gibi hücrel protein döngüsüne ket vurabilirler (Soto 2003). Bu 9 mutant protein biri resesif kalıtsal geçişli; X-linked spinal ve bulbar kas atrofisi(SBMA) ve Huntington (HD), dentatorubral pallidoluysian atrofi (DRPLA) ve tip 1,2,3,6,7,17 spinocerebral ataksi olmak üzere kalan sekizi dominant kalıtsal geçişlidir (Margolis ve Rose 2001). Tüm bu hastalıklarda poliQ zincirinin uzunluğu ile hastalığın ortaya çıkışı ve ilerleyişi ile doğrudan bir ilişki vardır. Tekrarlar ne kadar fazla ve zincir ne kadar uzunsa hastalık o kadar erken başlar ve agresif bir şekilde seyrederek. Farklı hastalıklarda poliQ zincirinin uzunluğunun hastalığın başlaması ile ilişkisinin gösterdiği farklılık ve ek olarak aynı hastalığa sahip insanlarda farklı poliQ uzunluklarının hastalığın başlamasında ki etkisi, uzunluğun hastalık başlangıcı ile doğrudan ilişkisi olsa da yardımcı faktörlerden de etkilendiğini göstermektedir (Ranum ve ark. 1994; DeStefano ve ark., 1996; Hayes ve ark., 2000; Wexler ve ark., 2004; van de Warrenburg ve ark., 2005; Kaltenbach ve ark. 2007; Branco ve ark. 2008; Lessing ve Bonini 2008; Bettencourt ve ark. 2011; Tezenas du Montcel ve ark. 2014; Becanovic ve ark. 2015).

### **2.2.2. Patolojisi ve Tedaviye Yönelik Yaklaşımlar**

Poliglutamin tekrarlarının öncül ve ardıl bölgelerinde yer alan aminoasit dizileri bir çok yoldan protein agregasyonunu etkiliyor ve yönlendiriyor gibi gözükmektedir. Muhtemeldir ki bu etkileşim her bir protein özelinde moleküler şaperonlar, ubiquitin proteozom sistem ve otofaji gibi hücrenin protein kalite kontrol sistemini oluşturan elementler üzerinden yürüyen farklı davranışların bir sonucu olabilir (Rubinsztein 2006).

PoliQ zincirlerinin agregat formları merkezlerinde tanımlanmış  $\beta$ -büküm çekirdekler içerir. Uzamış PolyQ zincirlerinin  $\beta$ -büküm katlanma potansiyeli daha önce kanıtlanmıştır (Perutz ve ark. 1994). Ayrıca PoliQ zincirleri yan zincirlerinin yaptığı  $\beta$ -saç tokası ve bunlar arasında ki güçlü hidrojen bağları sayesinde  $\beta$ -tabakalanma da yapabilir (Hoop ve ark. 2016). B-Saç tokaları agregasyon sürecinde önemli rol oynarlar. 25 tekrardan az poliQ içeren zincirler

kararlı  $\beta$ -saç tokası yapıları oluşturmazlar ve bu nedenle de agregasyonu başlatamazlar. Bu bilgi ışığında ancak yirmi beş glutamin tekrarından daha uzun zincirlerin kararlı bir  $\beta$ -saç tokası çekirdeği oluşturarak agregasyonun başlamasına neden olabileceği öne sürülmüştür (Kar ve ark 2011).

$\beta$ -saç tokası yapısının oynadığı kritik rol CAG tekrarlarında oluşan mutasyonun sonuçları ile daha net olarak ortaya konmuştur. Tekrar dizisinin içerisinde oluşabilecek CAG-CAT mutasyonu protein zincirine glutamin yerine histidin yerleşmesine neden olur. Zincir içinde glutaminden farklı herhangi bir aminoasidin varlığı  $\beta$ -saç tokası yapısının oluşmamasına neden olarak agregasyonunu etkiler. (Sobczak ve Krzyzosiak ve ark. 2004, Jayaraman ve ark. 2009, Menon ve ark. 2015). PoliQ zincirlerine giren bir veya daha fazla farklı aminoasidin varlığının hastalığın ortaya çıkış yaşını geciktirdiği gösterilmiştir (Menon ve ark. 2013). PoliQ zincirleri farklı aminoasitlerin varlığı nedeniyle değişmez fakat bu aminoasitlerin varlığı proteinin agregasyonunun başlamasına neden olacak çekirdek formun oluşumunu engeller (Jayaraman ve ark. 2009, Menon ve ark. 2013).

Belli şaperonlar protein yıkım makineleri ile birlikte hareket ederek poliQ içeren proteinlerde dahil olmak üzere hücrel yıkım süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (Dekker ve ark. 2015). Birçok farklı şaperonun içinde yalnızca DNAJ ailesine ait Hsp70 ortak şaperonları olan DNAJB6 ve onun homoloğu DNAJB8'in glutamin zincirleri tarafından şekillendirilen  $\beta$ -tabaka ya da  $\beta$ -saç tokası yapılarının oluşmasında rolü olduğu gösterilmiştir. Huntingtin (Htt-119Q) birikimi baskılayıcılarını taramak için yapılan çalışmada proteinin agregasyonunun DNAJB6 ve DNAJB8 varlığında baskılandığı gösterilmiştir. Bu iki şaperon benzer şekilde ATXN3, Androjen reseptör (AR) ve saf poliQ zincirinin kendisi de dahil olmak üzere benzer yapıya sahip proteinler üzerinde aynı etkiyi göstermişlerdir (Hageman ve ark., 2010; Månsson ve ark. 2013). DNAJ şaperonları serin ve treoninden oluşan özgün bir 18 amino asitlik polar hidroksil grup taşırlar. Bu bölge DNAJB6 monomerinin bir yüzünde açıkta bulunmaktadır ve bu yüzeyin PoliQ proteinlerin oluşturduğu  $\beta$ -saç tokası yapılarında yer alan hidrojen bağları ile etkileşerek iş gördüğü tahmin edilmektedir (Månsson ve ark. 2013, Kakkar ve ark 2016).

Glutamin zincirinin uzaması yalnızca agregasyon eğilimini arttırmakla kalmaz, proteinin diğer kısımlarının konformasyonunu da etkiler. Buda protein üzerinde bulunan ve agregasyon eğilimini daha da arttıracak bölgelerin üç boyutlu yapıda ulaşılabilir hale gelmesine neden olabilir (Ellisdon ve ark, 2006; Kelley ve ark, 2009; Tam ve ark. 2009). Bu durum birbirini besleyerek hızlandırılmış bir agregasyon sürecini başlatır ki Huntingtin ve ATXN3 proteini için bu tarz bir mekanizmanın varlığı bilinmektedir (Ellisdon ve ark, 2007, Saunders ve ark. 2011).

### 2.2.3. Bir PoliQ Hastalığı olarak Huntington

Huntingtin görece büyük bir proteindir, ilk ekzonda bulunan poliQ zincirin N-terminal ucunda 17 aminoasidik bir bölge ve C terminal ucunda ise poliprolin bir bölge içerir (Dehay ve Bertolotti, 2006; Rockabrand ve ark. 2007). N17 bölgesi kendi kendine yüksek derecede çözünürdür (hidrofilik) ve özünde agrega olmaya karşı dirençlidir. Kompakt bir yapıya ve sarmal şekilde yıkılma eğilimine sahiptir (Thakur ve ark. 2009; Crick ve ark. 2013). PoliQ zinciri uzadıkça N17 domaini kendi üzerine katlanarak daha  $\alpha$ -heliks bir hal alacak şekilde konformasyonel değişime uğrar ve hidrofobik yüzeyi ulaşılır pozisyona gelir. Bunun sonucu olarak agregasyon potansiyeli artar. (Kelley ve ark. 2009; Liebman ve Meredith, 2010). Htt'nin agregasyonu, bu  $\alpha$ -heliks hidrofobik yüzeyin modifiye edilmesi ile önlenbilir (Tam ve ark. 2009) ve bu durum N17 bölgesinin agregasyonun başlama anında önemli rolü olduğunu kanıtlar. İlginç bir şekilde N17 alanından yoksun sentetik polyQ peptidleri, çok daha yavaş agregasyon kinetiği göstermektedir. (Månsson ve ark. 2013; Monsellier ve ark. 2015; Sahoo ve ark.).

PoliQ proteinlerinin agregasyon davranışlarını etkileyen diğer bir faktör ise fragmentasyondur. Çalışmalar HD'de fragmente olmuş proteinin agregasyon kapasitesinin tam uzunlukta ki proteine göre daha fazla olduğunu göstermiştir (Mangiarini ve ark. 1996; Martindale ve ark. 1998). Şaşırtıcı olan bu durumun nedeni olarak hücre içi koruyucu mekanizmaların küçük parçalara ayrılan proteinin toksik kısımlarına; konformasyonel, yerleşimsel ve moleküler etkileşimlerinde ki değişiklikler nedeni ile müdahale etmekteki başarısızlığı olduğu düşünülmektedir (Matos ve ark. 2016).

Hayvan ve insanlarda yapılan çalışmalarda toksik N terminal parçasının proteinin kaspazlar tarafından yıkılması sonucu olduğu gösterilmiştir (Wellington ve ark., 2002; Sawa ve ark., 2005; Graham ve ark., 2006; Maglione ve ark, 2006 ). Kaspazların genetik ya da farmakolojik olarak inhibisyonu ya da mutasyonu HD'nin fenotipik etkilerinin ortaya çıkışını durdurabilir (Ona ve ark, 1999; Chen ve ark, 2000; Aharony ve ark, 2015).

Fosforilasyon, ubikütinasyon ve SUMOlaşım gibi translaşım sonrası modifikasyonlar (PMTs) da agregasyon hareketini etkilemektedir. Bu modifikasyonlar proteinin konformasyonel yapısını değiştirir, alternatif bağlanma bölgeleri yaratarak şaperonlar ve proteazlar ile ilişkilerini etkiler. Bu etkiler agregasyonu pozitif yada negatif yönde değiştirebilir (E.F.E. Kuiper ve ark. 2017). Proteazlar PoliQ proteinlerinin fragmentasyonunda anahtar rolü oynarlar. Proteazların inhibisyonu yada kesim bölgelerinde yapılan mutasyonlar hastalığın ortaya çıkma yaşını etkileyebilir (Ona ve ark, 1999; Chen ve ark, 2000; Graham ve ark, 2006; Aharony ve ark, 2015).

Htt'nin fosforilasyonu, kaspaz aracılı fragmentasyonun düşürülmesi aracılığı ile poliQ agregasyonunda azalmaya sebep olur (Luo ve ark. 2005; Warby ve ark. 2009; Humbert ve ark. 2001).

## **2.3. HUNTINGTON HASTALIĞI (HD)**

### **2.3.1. Genel Bilgiler**

Huntington hastalığı (HD), otozomal dominant genetik geçiş gösteren, koretik (titreme,sıçrama) hareket, psikolojik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize bir nörodejeneratif bozukluktur. Asya'da daha düşük olmakla birlikte Avrupa ve Amerika'da Her 100.000 kişide ortalama olarak 5.7 kişide rastlanmakta olup, başlama çağına göre iki sınıfa ayrılmaktadır (Prigsheim T. ve ark. 2012). Bununla birlikte son yapılan çalışmalarda kafkas halklarında hastalığın prevalansının 100.000 de 12 vaka olduğunu göstermiştir (Rawlins MD ve ark. 2016). Hastalığın başlama yaşı 20-65 arasında değişiklik gösterebilir. Juvenil HD olarak adlandırılan erken yaş sendromu genellikle 20'li yaşlardan önce başlar. Erişkin Sendrom ise ileriki yaşlarda ortaya çıkmaktadır. HD genel olarak motor, bilişsel ve psikiyatrik bozuklukların bir kombinasyonu

olarak anlaşılabilir. Koretik hareket olarak adlandırılan kompleks hareket bozuklukları, Yönetmel yetenekleri etkileyen bilişsel sorunlar ve sıklıkla apati, depresyon, sinirlilik belirtileri ile seyreden psikiyatrik sorunlar bu bozukluklara verilebilecek örneklerdir (Tiago E. Mestre ve Cristina Sampaio 2017). Hastalığın yönetim seçenekleri şu an için hala sınırlıdır ve nörodejenerasyonu veya genel olarak işlev kaybını yavaşlatmak için henüz herhangi bir tedavi yoktur. Bununla birlikte, son on yılda, semptomatik ve potansiyel nörokoruyucu tedaviler için çok daha fazla klinik çalışma yapılmaktadır. Ek olarak, gen susturma teknikleri ile erken insan çalışmaları da devam etmektedir (Kara J. Wyant, Andrew J. Ridder, Praveen Dayalu 2017). Tetrabenazine HD hastalarında sadece koretik hareketin için uygulanan tek tedavi yöntemidir (Warby SC, Graham RK, Hayden MR 1993). Hali hazırda Huntington ölümcül olarak ilerleyen acımasız bir hastalıktır ve semptomların ortaya çıkmasını takiben ortalama yaşam süresi 15 ila 20 yıl arasındadır (Mestre D. Ve ark. 2009).

Huntington'un genetik temeli, 4. Kromozomda bulunan HD geninin ilk ekzonunda bulunan ve glutamin kodlayan CAG kodonunun fazla miktarda tekrar etmesi ile oluşan mutant huntingtin (mHTT) proteininin verdiği nörolojik hasardır. Bu nedenle HD tek gene bağlı tanımlanmış tek bir mutasyonun neden olduğu mendelyen genetik hastalıklar için iyi bir örnektir. Normal koşullarda HD geni ilk onyedili aminoasidini takiben onbir ila otuz beş arasında tekrarlanan CAG kodonu içerir. Bu sayılar arasında ki bir tekrar proteinin normal işleyişini etkilemezken tekrar miktarının otuzbeşi aşması durumunda yüksek olasılık ile patolojik durum ortaya çıkar. (Rubinsztein DC ve ark. 1996) . Çalışmalar göstermiştir ki yaş ile birlikte gen içerisinde yer alan CAG tekrarları artmaktadır. Ayrıca CAG tekrarlarının uzunluğu hastalığın ilerleme ve seyir şiddetini etkilemektedir (Brinkman RR ve ark. 1997, Trottier Y ve ark. 1994, Brandt J ve ark. 1996).

Htt yüksek oranda korunmuş, gelişim için mutlak gerekli bir proteindir. Fare deneylerinde yokluğunun ölümcül olduğu gösterilmiştir (Nasir J. Ve ark. 1995). Huntingtin (HTT) insan nöronlarında yüksek miktarda eksprese olan ve birçok fonksiyona sahip bir proteindir (Huntington disease collaborative

Research Group 1993). Doğal HTT proteininin fonksiyonu hala tam olarak anlaşılacak şekilde birlikte devamlı olarak sentezlenen ve hücrede birçok farklı ortak ile ilişki halinde olan bir proteindir. Doğal HTT'nin vesiküler trafik, endositosisin düzenlenmesi, vesiküler geridönüşüm ve hücre bölünmesinin koordinasyonu, transkripsiyonun ve metabolizmanın düzenlenmesinden sorumlu endozomal trafiğin kontrolü gibi bilinen birçok görevi vardır (Saudou F. Humbert 2016). Mutant HTT'nin toksik etkileri aynı derecede çeşitlidir, varlığında birçok yolakda bozulma oluşmaktadır (Bates GP ve ark. 2015). Birçok denemeye rağmen, bu yolları hedefleyerek tasarlanmış hiçbir yaklaşım, insanlarda Huntington hastalığının ilerlemesini yavaşlatmamış veya durdurmamıştır (Mestre T., Ferreira J., Coelho M.M., Rosa M. Sampaio 2009). Mutant Huntington proteini taşıyıcılarında, diğer bazı proteinlerin fonksiyonları bozulabilir, çünkü mutant HTT, vahşi tip HTT'den daha az verimli şekilde işlev görmektedir. Örneğin, vahşi tip HTT'nin aşırı ekspresyonu, BDNF proteininin aksonal vesiküler taşınmasını in vitro olarak uyarır, ancak mutant HTT'nin aşırı ekspresyonu bunu sağlamaz (Gauthier LR ve ark. 2004). Ayrıca hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki; Huntingtin proteinini hiç taşımayan modellerde mutant protein taşıyan modellere göre daha az patolojik etki ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni olarak mutant proteinin hücreye verdiği hasar gösterilebilir (Mangiarini L ve ark. 1996).

Diğer PoliQ proteinlerinde de olduğu gibi tam uzunluktaki mutant proteinin toksik etkisinin yanı sıra poliQ zincirini taşıyan ilk ekzonun kendi başına varlığı bile yüksek toksik etkiye sahiptir. Proteinin ilk 17 amino asidini takiben uzun bir Glutamin zinciri içeren toksik kısım farklı mekanizmalar ile oluşabilir. Erken sonlanmış transkripsiyon, mRNA işlenmesi, proteinin toksik olmayan kısmının yıkılarak geriye toksik bölgenin kalması bu mekanizmalardan bazılarıdır. Doğal proteinin uzunluğuna oranla daha kısa olan ancak Glutamin tekrarlarını taşıyan bu kısım tam uzunlukta ki mutant proteine göre daha toksiktir (Satashivam K. Ve ark. 2013). Bu toksisitenin artış nedeni olarak hücre içi koruyucu mekanizmaların küçük parçalara ayrılan proteinin toksik kısımlarına; konformasyonel, yerleşimsel ve moleküler etkileşimlerinde ki değişiklikler nedeni ile müdahale etmekteki başarısızlığı düşünülmektedir (Matos ve ark. 2016).

### **2.3.2. Semptomlar**

Huntington semptomları genel olarak üç grup altında toplanabilir. Bunlar sırası ile motor bozukluklar, Bilişsel problemler ve psikiyatrik sorunlardır.

#### **2.3.2.1. Motor Bozukluklar**

En tanınan ve tek tedavi edilebilen kısmı olsa da koretik hareket motor bozuklukların sadece küçük bir parçasıdır. Koretik hareket genellikle distal ekstremitelerde görülen kısa, bastırılabilir ve rastgele hareketler olarak başlar. Bununla birlikte koretik hareket zamanla iyice artarak tedavisi giderek zorlaşan ileri motor bozulmalara neden olabilir. Bunların arasında Bradikinezi, distoni, esnekliğin kaybolması ve ataksi sayılabilir. Disfaji kilo kaybına ve solunumun bozulmasına katkıda bulunur. Postural instabilite düşmelere ve bunun sonucu olarak yaralanmalara neden olabilir. Nihai olarak iyice ilerleyen motor bozukluklar hayatı sona erdiren komplikasyonların ana nedeni haline gelir (Kara J. Wyant, Andrew J. Ridder, Praveen Dayalu 2017).

#### **2.3.2.2. Bilişsel Problemler**

HD'de ilerleyici bilişsel bozukluk kaçınılmazdır. Hastalığın henüz başlamadığı HD taşıyıcıları ile yapılan bir çok çalışma bilişsel bozuklukların motor fonksiyonlarda ki bozulmalardan daha önce başlayabileceğini göstermiştir ve bu durum hastaların durumlarını reddetme oranlarını etkilemektedir. Bu bilişsel bozukluklar nihai olarak demansa ilerler. Demansın ilerleme hızı, dikkat, problem çözme ve hafıza gibi bilişsel kabiliyetlerin kaybının ortaya çıkışını etkiler (Paulsen J.S. ve ark. 1995). HD'de bilişsel işlev bozukluğu, bu hastaların sosyal ve mesleki kabiliyetlerini bozar ve şu an için iyi bir tedavi seçenekleri de bulunmamaktadır (Kara J. Wyant, Andrew J. Ridder, Praveen Dayalu 2017).

#### **2.3.2.3. Psikiyatrik Sorunlar**

Psikiyatrik sorunlar HD'de görülen üçüncü ana problem grubudur ki hastalığın hastaları ve ailelerini en çok etkileyen ve yoran kısmı haline gelebilir. İşlev bozukluğu, depresyondan psikoza kadar geniş bir hastalık yelpazesi olarak kendini gösterebilir. Duygusal ve davranışsal olarak depresyon, OKB ve diğer problemler muhtemelen talamusun frontal lobu ve ventral anterior ve

medial dorsal çekirdeğini içeren striatal devrelerde ki dejenerasyon ile ilişkilidir (Paulsen JS ve ark. 2001). Disinhibisyon ve özellikle de ilgisizlik, medyal prefrontal, anterior singulat ve anterior temporal paralimbik kortekslerin dis-regülasyonuna bağlı olabilir (Levy ML ve ark. 1998).

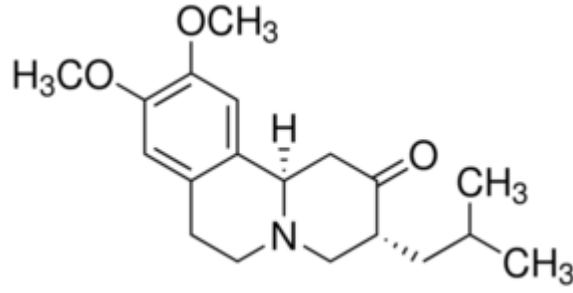
Bilişsel belirtilerde görüldüğü gibi, davranışsal belirtilerde HD tanısından daha önce başlayabilir ve motor ve bilişsel belirtilerden bağımsız olarak hastalığın seyri boyunca neredeyse tüm hastalarda daima bulunurlar (Paulsen JS ve ark. 2001). Psikiyatrik semptomların kesin yaygınlığını tespit etmek az sayıda ki çalışmadan ve değişken tanımlardan dolayı zordur. HD'nin davranışsal belirtileri daha çok bilişsel belirtilerde olduğu gibi klinik tanı sırasında göze çarpmaktadır (Duff K. Ve ark. 2007).

Depresyon en yaygın psikiyatrik belirti olup, HD hastalarının% 33-70'inde görülür ( Van de Juin ve ark. 2007, 2014). Depresyon tedaviye iyi şekilde yanıt versede, hastalığın bir parçası olarak daima devam etmektedir.

### **2.3.3. Hd'nin Tedavisi Ve Semptomların İyileştirilmesine Yönelik Yaklaşımlar**

#### **2.3.3.1. Farmakolojik Yaklaşımlar**

Motor Motor Semptomların Tedavisi; Tetrabenazine (TBZ) maddesi koretik hareket bozukluklarının HD'de uygulanan FDA onaylı yegane tedavi yöntemidir (Şekil2.1). TBZ merkezi sinir sisteminde vesicular monoamine transporter 2 (VMAT-2) üzerinde ters çevrilebilir şekilde inhibisyon etkisi gösterir. VMAT-2, sitoplazmadan presinaptik veziküllere kadar seratonin, dopamin ve norepinefrin taşınmasından sorumlu olduğu için, inhibisyonu bu monoaminlerin erken bozunmasına neden olur (Hayden M.R. 2009). Dopamin tükenmesi koretik hareketi azaltırken, bununla birlikte serotonin ve norepinefrin tükenmesi depresyonu ve kaygı bozukluğunu kötüleştirir. TBZ, fluoksetin ve paroxetine tarafından indüklenen CYP2D6 sistemi yoluyla hepatik olarak metabolize olur (Kenney C, Hunter C, Jankovic J 2007) .



**Şekil 2-1: Tetrabenzine kimyasal Yapısı**

Bilişsel Problemlerin Tedavisi; Diğer demanslar türlerinde kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri ve Memantine'in HD hasta grubunda etkin olduğuna dair çok az kanıt vardır. Bu kolinesteraz inhibitörlerinden rivastigmine muhtemelen en iyi opsiyondur. Rivastigmine ile kısa ve uzun vadeli tedavi sonrası bilişsel testlerde iyileşme olduğunu düşündüren bilinen yalnızca üç küçük çalışma bulunmaktadır (de Tommaso M ve ark. 2007)( Rot U. Ve ark. 2002) (Sesok S. 2014). Bununla birlikte bu çalışmalarda birçok eleştiriye maruz kalmışlardır.

Psikiyatrik Sorunların Tedavisi; Yapılan üç farklı çalışma, HD popülasyonda SSRI'lerin ve SNRI venlafaksin'in yararlı olduğunu ileri sürmüştür. SSRI'lardan, fluoksetin ve sitalopram, kullanımının Hamilton Depresyon Derecelendirme Ölçeğinde (HDRS) iyileşme yönünde bir eğilim gösterdiği ortaya komuştur (Como P.G: ve ark. 1997)(Beglinger ve ark. 2014). VenlafaksinXR ile tedavinin 4. haftasından sonra depresif belirtilerde iyileşme olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışma tipik depresyon çalışmalarıyla karşılaştırıldığında kontrol grubu olmayan ve kısa süreli bir çalışmadır (Holl A.K. ve ark.).

### **2.3.3.2. Moleküler Yaklaşımlar**

Huntington hastalığının tüm vakaları aynı mutasyon sonucu oluşur, bu nedenle de hastalığın tedavisine yönelik yaklaşımlar bu genetik nedenin yol açtığı patojenik süreçleri hedefler. Huntington hastalığını kalıtsal olarak taşıması muhtemel bireyler genetik testler ile tespit edilebilir. Bu erken tanı sayesinde öncül ve uzun vadeli tedaviler hastalığın ortaya çıkmasını geciktirebilir yada

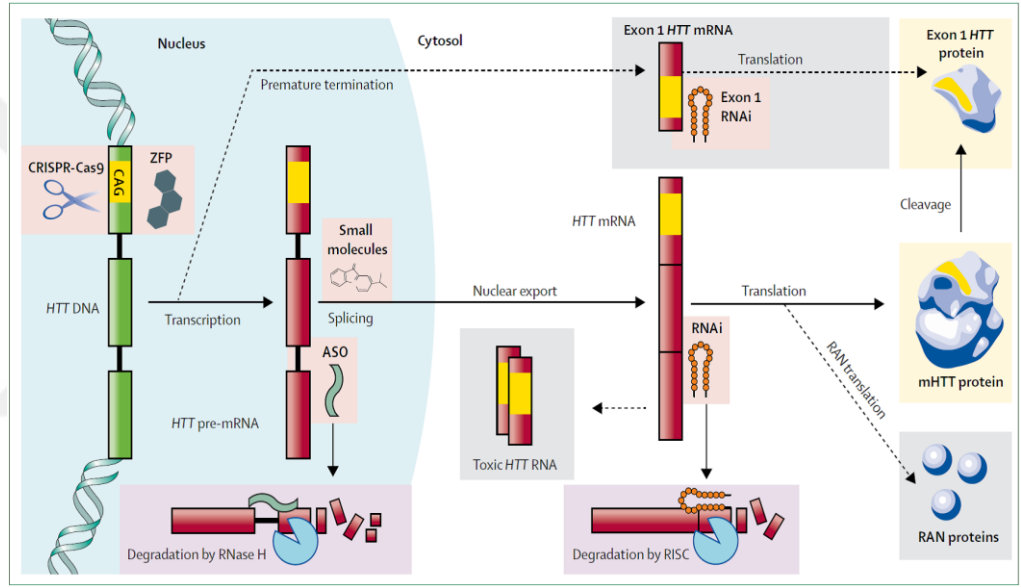
tamamen önleyebilir (Wild E.J., Tabrizi S.J. 2014). Bilinmektedir ki mutant HTT üretiminin azaltılması hastalığın atolojik etkilerinin hafiflemesine neden olur.

Son yıllarda nöredejeneratif hastalıklarla ilişkili olarak genleri ve proteinleri hedef alan terapiler adına çok önemli gelişmeler olmuştur. Bu bağlamda 2016 yılında SMA hastalığında bir Antisense Oligonukletid olan Nusinersen'in FDA onaylı olarak uygulanması ilk klinik başarıdır. Nusinersin SMN2 (Survival Motor Nöron 2) proteininin üretimini arttırarak toksik proteinin üretimini azaltmış ve hastalarda yaşam süresinin uzamasını sağlamıştır (Finkel R.S. ve ark, 2016; FDA 2017). SMA gibi ağır ve agresif ilerleyen bir hastalığa göre daha hafif ilerleyen Huntington hastalığında daha kısa bir klinik deneme süreciyle iyileştirici etki göstermek daha kolay olabilir. Tek bir tedavi yöntemini genellemek çok doğru olmasa da SMA'da elde edilen bu başarı nöredejeneratif hastalıkların gen ekspresyonlarının düzenlenmesi ile tedavi edilebileceğini göstermesi ve benzer bir yaklaşımın Huntington içinde uygulanabileceğini düşündürmesi için cesaret vericidir (Edward J. Wild, Sarah J. Tabrizi 2017).

### **RNA'yı Hedef Alan Terapiler**

mRNA'lara hem nukleus ve hem de sitosol'de ulaşılabilir ve DNA'nın aksine mRNA'lar tamir mekanizmaları tarafından korunmazlar. Dolayısı ile mHTT mRNA'sının translasyonunun düşürülmesi genin transkripsiyonunun düzenlenmesinden daha kolay olmalıdır. Translasyonun azaltılmasını sağlayan üç ana metod Antisense oligonukleotidler (ASOs) RNAi bileşenleri ve küçük-molekül işleme (splicing) düzenleyicileridir (Şekil 2-2). ASO ve RNAi'ler Watson-Crick tamamlayıcılığı ile seçici olarak mRNA'lara bağlanırlar ve onları RNA yıkım mekanizmasına yönlendirerek transkriptin ortadan kaldırılmasını sağlarlar. ASO'lar öncül mRNA'lara nukleusda bağlanarak onların RNase H tarafından yıkılmasını sağlayan tek zincirli sentetik DNA parçalarıdır (Larrouy B. ve ark. 1992). RNAi'ler kısa interfering RNA (siRNA), kısa saç tokası RNA ve micro RNA lardan oluşan RNA temelli bir yaklaşım sunar. Bu bileşenler sitosolik olgun mRNA'ya bağlanarak onu RNA induced silencing Complex (RISC) ile iş gören argonaute2 RNase enzimine yönlendirerek yıkımını sağlar (Hutvagner G., Simard M.J. 2008). Tüm bunlara rağmen ASO ve RNAi aracılı mRNA yıkımları geride toksik poliQ zincirini kodlayan RNA parçaları bırakabilir. ASO'lar öncül

mRNA'lar üzerinden iş gördüğü için hem eksonları hem intronları hedefleyebilir. Öncül mRNA'nın ASO aracılı yıkımı ile her ne kadar toksisitenin azaltılması hedeflense de, yıkım sonucu uzun mutant proteinden daha toksik olan poliQ zincirli Exon 1 parçasını üretebilecek mRNA parçalarının oluşmayacağı önceden kestirilemez. RNAi bileşikleri olgun mRNA üzerinde iş gördükleri için yalnızca ekson içerisindeki spesifik hedef bölgelere yönelebilirler. Bu nedenle geride toksik poliQ zincir parçaları da bırakmaları muhtemeldir (Edward J. Wild, Sarah J. Tabrizi 2017).



**Şekil 2-2: mHtt Transkripsiyonunun düşürülmesini hedef alan yaklaşımlar**

Tek zincirli DNA'lar beyin omurilik sıvısına (BOS) enjekte edildiğinde (farelerde intraventriküler uygulama veya daha büyük memelilerdeki lumbar intratekal uygulama) merkezi sinir sisteminde iyi bir şekilde yayılırlar ve nöronlar ve diğer hücreler tarafından alınırlar. Bu sayede ilaç beyinin tamamında başarılı bir şekilde yayılır ve sonuç olarak mRNA ve protein seviyesinde azalmayı sağlar (Kordasiewicz ve ark. 2012). Buna karşılık çift zincirli DNA'nın merkezi sinir sisteminde (MSS) yayılımı ve alınımı daha düşüktür. Bu nedenle bu moleküllerin hedef hücrelere daha etkili şekilde ulaşması için viral vektörler (örneğin AAV) kullanılarak, bunların doğrudan beyin parankimasına enjeksiyonu gereklidir.

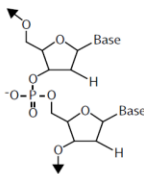
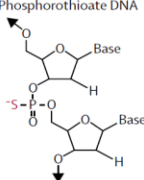
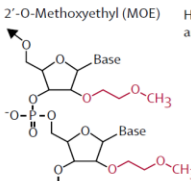
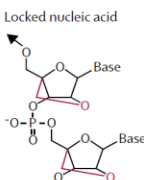
ASO ve RNA bileşenleri ile HTT düzeyinin azaltılması in vitroda ve hayvan çalışmalarında başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Huntington hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki HTT mRNA'sındaki bir azalma her zaman HTT proteininde eşzamanlı bir azalma ile sonuçlanır ve bu duruma genellikle patoloji ve nörolojik hasarda iyileşmeler eşlik eder. Mutasyonu taşıyan hayvanlara eğer semptomların ortaya çıkışından önce uygulama yapılırsa hastalık belirtilerinin başlangıcı büyük ölçüde ertelenir (Keiser M.S. ve ark.). Bu cesaret verici sonuçlara rağmen, hayvan modellerinde sınırlamalar vardır. Huntington hastalığı için bir hayvan modelinde uygulanan hiçbir terapötik başarı, bir insan denemesinde klinik faydayı öngörmemiştir (Mestre T. ve Ark.). Bu konu doğrudan MSS'ye uygulanan terapötik ajanlar için özel önem taşımaktadır: Bir insan beyni bir fareden 3000 kat daha büyüktür ve tedavi edici ajanların BOS yolu ile beyine ve hücrelere yayılması ve emilmesinde farklılıklar oluşması muhtemeldir.

Birçok ASO hali hazırda HD model organizmalar üzerinde incelenmektedir. Bununla birlikte ilk insan klinik denemesi faz 1b/2a(NCT02519036), eylül 2015'de insan HTT hedefli IONIS-HTT<sub>rx</sub> ASO kullanılarak University College London İngiltere ve University of British Columbia Canada'da gerçekleştirilmiştir (Bennet C.F. Swayze E.E. 2010). Daha sonra Almanya ve İngiltereden farklı kurumlar deneye katılmıştır (Leawitt B. 2016).

IONIS-HTT<sub>rx</sub>, fosfodiester bağlantılarını fosforotioata dönüştürmek için, fosfat omurgasındaki oksijen atomlarının çoğunun sülfür ile ikame edildiği, 20 nükleotidlik sentetik bir dizidir. Buna ek olarak, ASO, her ucunda 2'-O-metoksietil modifikasyonlu DNA benzeri bir merkezi bölgeye sahiptir; tüm bu kombinasyon MSS dağılımını, yarılanma ömrünü, hücresel alınımı ve RNase aktivasyonunu optimize etmeyi amaçlamaktadır (Şekil 2-3) (Bennet C.F. Swayze E.E. 2010).

Tam uzunlukta bir insan mutant HTT geni taşıyan BACHD farelerine 2 haftalık devamlı intraventriküler infüzyon sonrasında, HTT mRNA ekspresyonunda % 80'e kadar azalma görülmüştür. Yaklaşık 4 ay boyunca devam eden ısrarlı bir tedavi ise proteinin ifadesinin 2 ila 3 kat azalmasına neden olmuştur (Bennet C.F. Swayze E.E. 2010). ASO'lar beyinde nöronlar ve

glialar olmak üzere bir çok hücreye dağılmışlardır. Hastalık fenotipi HD taşıyan üç farklı fare modelinde iyileşme göstermiştir (Kordasiewicz ve ark. 2012).

Characteristic	Representative structure	Aim of modification
DNA Native nucleic acid		
First generation Non-bridging oxygen in phosphodiester bond replaced by sulphur	Phosphorothioate DNA 	Higher resistance to nuclease degradation
Second generation 2'-Alkyl ribose modifications	2'-O-Methoxyethyl (MOE) 	Higher nuclease resistance and mRNA-binding affinity
Third generation Furanose ring modifications	Locked nucleic acid 	Further increases in nuclease resistance and mRNA-binding affinity

### Şekil 2-3: İlk, ikincil, üçüncül jenerasyon ASO ve doğal DNA Molekülü

Her nesil, kırmızı renkle gösterilen karakteristik bölgeler etrafında çeşitli varyasyonlar içerebilir. IONIS-HTTRx, bir fosforotiyoat omurgasını (birinci nesil) 2'-O-metoksietil modifikasyonu (ikinci nesil) birleştirir ve oluşan molekül genel olarak ikinci nesil antisens oligonükleotid (ASO) olarak kabul edilir.

Diğer nörodejeneratif hastalıklarda gösterilen ilerleme Huntington hastalığının tedavisinde omurilik içine uygulanan ASO'ların geleceği için cesaret vericidir. Süper Oksid Dismutase 1 (SOD1) mutasyonuna bağlı oluşan ALS hastalarında iki farklı ASO güvenli olarak denenmiş ve her hangi bir olumsuz geri bildirim alınmamıştır (Miller T.M. ve ark. 2013). SMA'da kullanılan Nusinersen ise daha önce üzerinde herhangi bir şekilde etki göstirelememiş bir

hastalıkta ASO'ların iyileştirici gücünü göstermeye önemli bir örnektir (Finkel R.S. ve ark, 2016; FDA 2017).

Henüz RNA temelli nükleotid ajanlar için bazı hayvan deneyleri gerçekleştirilmiş ancak yakında yapılması planlansa da insan çalışmalarında henüz uygulanmamıştır. Bunun temel nedeni RNA'nın damar içi uygulamalardan sonra bile başarılı bir şekilde dağılım ve hücreye alım göstermemesidir. Bu durumda RNAi uygulamaları sterotktik cerrahi müdahaleler ile viral vektörler kullanılarak doğrudan beyin parankimasına yapılır. Ancak bu şekilde yeterli dağılım ve uzun ömürlü bir yerleşim gösterebilirler. Viral yoldan iletilen RNA temelli tötropatik ajanlar MSS hücrelerini kalıcı olarak dönüştürürler, buda onları mutant HTT'yi baskılamak için kuvvetli birer ilaç adayı yapmaktadır. Viral iletimli gen terapisi diğer nörodejeneratif hastalıklarda da kullanılmaktadır. Alzheimerda Faz 2 çalışmaları yapılan AAV2-kapsüllü sinir büyüme faktör RNA'sı (AAV2-encapsulated nerve growth factor RNA) buna örnek verilebilir. Herhangi bir klinik fayda görülme de kullanılan teknikğin güvenli ve iyi tolere edildiği ortaya konmuştur (Rafii M.S. 2015).

siRNA yaklaşımı birçok hayvan sisteminde başarılı olmuştur. En kapsamlı yayınlanmış çalışmalar Beverly Davidson tarafından yürütülmüştür (Harper S.Q. ve ark. 2005.; Franich N.R. ve ark. 2008.). Birçok Huntington hastası kemirgen modelinde AAV ile iletilen siRNA'nın güvenli olduğunu, HTT'nin toksis etkisini azaltma gücü, potensiyeli ve fenotipik faydanın olduğunu göstermiştir. Benzer bir çalışma microRNA taşıyan AAV-kapsülü ile gerçekleştirilmiştir. Uygulamayı takiben uygulama bölgesinin etrafında yer alan hücrelere başarılı bir transfeksiyon gerçekleştiği floresan bir ajan aracılığı ile gözlenmiştir. Bu hücreler de HTT ekspresyonunun yarı yarıya azaldığı görülmüştür. Uygulamayı takiben 6 haftalık bir gözlem süresi sonunda yapılan histolojik, biyokimyasal ve klinik kontrollerde önemli herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır (McBride JL ve ark. 2011).

### **DNA'yı Hedef Alan Terapiler**

Doğrudan DNA ile ilişkiye girerek mutant HTT'nin ekspresyonunun düşürülmesi RNA yaklaşımlarına göre hem büyük zorluklar fakat aynı zamanda

da çok daha büyük ödülleri vaat eder. DNA'yı hedefleyen t ropatik ajanların her açıdan HD de iyileştirme göstermesi beklenir. Ayrıca böyle bir tedavinin taşıyıcı insanların üreme hücrelerine uygulanabilmesi etik sorular doğursada gelecek ile ilgili çok daha farklı sonuçlar doğurabilir. şu anda Zinc-Finger protein ve CRISPR-Cas9 olmak üzere iki DNA hedefli gen terapisi ile ilgili çalışmalar sürmektedir (Tablo 2-1). Her iki tedavide de doğal olmayan bir protein kapsüllü viral vekt rer kullanılarak omurilik içi olarak uygulanmakta ve hücreleri dönüştürerek onların doğal olmayan iyileştirici(t ropatik) proteini üretmesini sağlamaktadır (Edward J. Wild, Sarah J. Tabrizi 2017).

Zinc finger proteinler spesifik DNA bölgelerine bağlanabilen yapısal motifler taşırlar, sentetik olarak üretilenler ve bu özelliklerinde dolayıda DNA hedefli iyileştirici ajanlar olarak kullanılabilirler. Terapötik kullanım için dizayn edilen Zinc-Finger proteinleri tipik olarak, DNA üzerinde etki yapmayı amaçlayan işlevsel bir alan ve ona bitişik bir DNA kodon tanıyıcı bir finger (parmak) bölge içerir. Bunlara  rnek olarak DNA kesimi yapan Zinc-Finger nukleazlar ve transkripsyonu düzenleyen zinc-finger transkripsyon faktörleri örnek verilebilir (Klug A. 2010).

**Tablo 2-1: DNA'yı hedef alan HTT azaltımı temelli yaklaşımlar**

Allel Seçilimi	Gönderim	Vektör	Sponsor	Ana avantajları	Ana Dezavantajları	Referanslar	
<b>Zinc finger transkripsyon faktör</b>							
Transkripsiyonel baskılama	CAG repeat	Intracranial	AAV	Shire (Dublin, Republic of Ireland)	Huntington hastalığı mutasyonunun tüm taşıyıcıları için tek ilaç; uzun süreli tedavi sağlamak için teklı uygulama; transkripsiyonu hedeflemek tüm patojenik yolları iyileştirebilir	invazif; devre dış bırakılmaz; küçük işlem hacimleri; konak olmayan baskılayıcı proteinlerden kaynaklanan iltihaplanma riski	Zeitler, 2014 <sup>66</sup>
Transkripsiyonel baskılama	CAG repeat	Intracranial	AAV	Imperial College London (London, UK)	Yukarıdaki gibi, artı konakçı tür proteinlerinin kullanımı inflamatuvar etkileri azaltır	Klinik aday bileşiğin olarak insan proteinlerinin kullanılması hayvan çalışmalarının kullanımını sınırlayabilir	Garriga-Canut, 2012; <sup>67</sup> Agust�n-Pav�n, 2016 <sup>68</sup>
<b>CRISPR-Cas9</b>							
Genom Düzenleme	SNP-Hedefli	Doğrudan fibroblastlar	None	Harvard University (Cambridge, MA, USA)	Genetik nedenin kalıcı olarak ortadan kaldırılması; son derece spesifik ve hedefli	Henüz yalnızca model sistemlerinde yapılan çok yeni çalışmalar olması; geri d�niş� olmaması; Eşey Hücreleri manipülasyonu için etik kaygılar; bakteriyel proteinler immünojenik olabilir	Shin, 2016 <sup>69</sup>
Genom Düzenleme	Poli Glutamin Hedefleyerek Seçici olmayan HTT yıkımı	Intracranial	AAV	Emory University (Atlanta, GA, USA)	Yukarıya Benzer	Yukarıya Benzer	Yang, 2017 <sup>70</sup>

Zinc-Finger nukleazlarının teorik olarak hedeflenmiş genom düzenleme yeteneğine sahip olmalarına rağmen, etkilerinin devamlılığı postmitotik hasta

beyin hücrelerinde terapötik uygulama için yeterince kesin veya öngörülebilir değildir. Hatta CAG tekrar zinciri, zinc-finger nükleaz aracılı kesim için bir hedef olarak özellikle istenmemektedir (Garriga Canut M. ve ark. 2012). Bununla birlikte zinc-finger transkripsiyon faktörlerinin klinik tıropatik ajanlar olarak düşünülmesi oldukça mümkündür. Transkripsiyon baskılayıcı Zinc-Finger dizisi özellikle HTT promotör bölgesinde anlamlı zincirin 3' ucuna yakın olacak şekilde spesifik olarak hedeflenmelidir. Bu sayede istenmeyen başka genlere bağlanarak onların transkripsiyonunu engellememelidir (Edward J. Wild, Sarah J. Tabrizi 2017).

Bir çok başka gen poliQ zinciri içersede tesadüfen CAG tekrar kodonları HTT'de 3' ucuna bu genlerdekinden daha yakındır. Bu nedenle Bu şekilde oluşturulan CAG tekrar hedefli zinc-finger proteinleri diğer genlere ve genin doğal alleleline göre mHTT'yi daha seçici olarak hedefler. Bu şekilde bir yapı iki farklı grup tarafından geliştirilmiş ve her ikisinde de hayvan modellerinde mHTT'nin ekspresyonu nöronlarda herhangi bir yan etki göstermeksizin düşmüştür (Zeitler B. ve ark. 2014; Garriga Canut M. ve ark. 2012). Bu şu ana kadar mHTT taşıyıcıları için uzun vadeli HTT azaltılması için allel spesifik olarak geliştirilen tek yaklaşımdır.

CRISPR ve Cas birlikte yabancı DNA'yı tanıyan ve yok eden bir prokaryotik bağışıklık sisteminin bileşenleridir. Cas9 nükleazı, sentetik bir rehber RNA ile kombine edilerek seçilen herhangi bir yerde yüksek hassasiyetle DNA'yı kesebilecek bir yapı oluşturabilir. Hedeflenen genom düzenlemesi için böyle CRISPR-Cas9 komplekslerinin kullanılması, Huntington hastalığı da dahil olmak üzere hastalıkların incelenmesi ve tedavisi için büyük bir potansiyele sahip hızla gelişen bir alan oluşturmaktadır (Savic N., Schwank G. 2016).

Mutant allel içerisine durdurucu kodon ya da anlamsız mutasyonların yerleştirilmesi aracılığıyla zararlı proteinin birikimini engellemek gibi opsiyonlar CRISPR-Cas9 kompleksinin Htt'ye yönelik tedavi edici özellikte kullanılması için büyük olanaklar sağlamaktadır. Bununla birlikte CRISPR-Cas9 kompleksinin Huntington hastalığının tedavisine yönelik kullanılması erken aşamadır. Metod ilk olarak hastalardan türetilmiş fibroblastlar üzerinde denenmiş, mutant Htt geninden büyük bir nölgeyi kesip çıkaran iki farklı yapı oluşturularak yapılan

çalışma sonucunda hem mutant RNA hem de proteinin neredeyse tamamı ile azaltımı sağlanmıştır. 2017 yılında yöntem Huntington hastalığının kemirgen modelinde başarılı bir şekilde test edilmiş, striatuma bir CRISPR-Cas9 yapısı uygulanarak mutant Htt geninden büyük bir CAG tekrar bölgesinin silinmesi sonrası seçici mutant HTT indirgenmesi sağlanmış ve sonuç olarak patolojinin zayıfladığı ve motor fonksiyonunun iyileştiği görülmüştür. Buna karşın sağkalımın uzatılması sağlanamamıştır. Tüm bu bulgular yaklaşımın fizibilitesini doğrulamaktadır, bununla birlikte teknolojinin hızla klinik aşamalara getirilmesi için çok daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Huntington hastalığı, protein ifadesini düzenlemek için DNA ve RNA'yı hedef alan deneysel terapiler için özellikle uygundur. HTT mRNA'yı hedefleyerek mutant HTT proteininin üretimini azaltmayı amaçlayan bir ASO'nun ilk insan deneyi devam etmektedir ve mutant HTT'yi seçici olarak düşürmek isteyen ajanlar dahil olmak üzere gelecekteki ASO denemeleri planlanmaktadır. Zinc-Finger transkripsiyonel baskılayıcılar mutant Htt'nin üretimini yapısal bir değişikliğe gerek kalmadan baskılam için umut vadeci görünmektedir. CRISPR-Cas9 terapileri Huntington hastalığına neden olan CAG tekrar mutasyonunu kalıcı olarak düzeltme vaadi vermektedir. Bununla birlikte bu metod da ASO uygulamaları ile birlikte viral iletim zorunluluğunun getirdiği dezavantajları ve uygulama zorluklarını taşımaktadır.

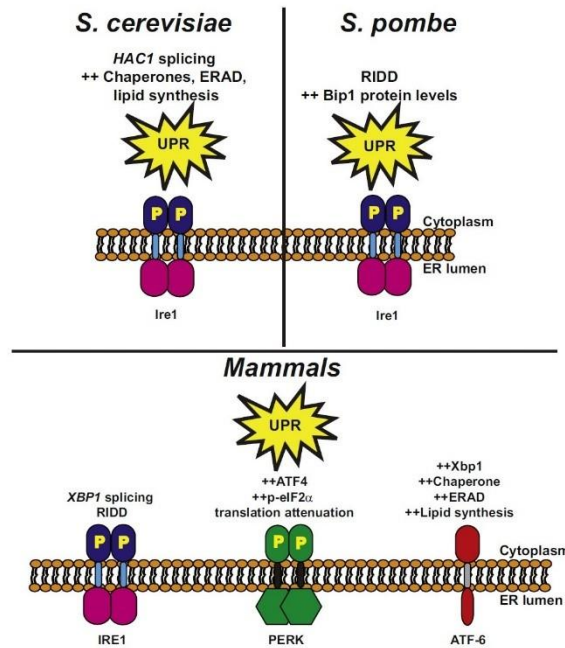
### **Endoplazmik Retikulum (ER) Stresini Hedef Alan Terapiler**

Mayadan İnsana kadar çeşitli organizmalarda yapılan bir çok çalışma HD'de Endoplazmik Retikulum içerisinde yanlış katlanmış salgı proteinlerinin birikiminin hücrel toksisitenin önemli bir parçası olduğunu göstermiştir. (Yuwei Jiang ve ark. 2016).

Endoplazmik retikulum protein sentezi ve katlanmasında büyük bir rol oynar. Salgı proteinleri, şaperonların da yer aldığı doğru protein katlanmalarına yardımcı olan kalite kontrol mekanizmasının bulunduğu ER'ye girer (Ron ve Walter, 2007; Walter ve Ron 2011). ER protein katlama mekanizmasında meydana gelebilecek bir sıkıntı ve bozulma sonucu yanlış katlanmış ya da katlanamamış proteinlerin ortamda birikmesi ER stresi denilen bir durumun doğmasına neden olabilir. Eğer ER stres altına girerse bazı özel transkripsiyon

faktörlerini kontrol ederek bu stres ile mücadele etmeyi sağlayan katlanmamış protein yanıtı (Unfolded Protein Response, UPR) adı verilen bir hücresel yolak aktif hale gelir (Şekil 2-4) (Hetz ve Glimcher, 2011; Hetz ve Soto, 2006; Scheper ve Hoozemans, 2009; Torres ve ark., 2015; Vidal ve ark. 2011, 2012; Vidal ve Hetz, 2012; Yang ve Luo, 2015).

Memelilerde PERK, ATF6 ve IRE1 olmak üzere üç farklı membran geçişli protein stres sensörü olarak görev almaktadır. Stres sonrası PERK'in aktivasyonu hücrede birkaç transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu uyararak içerisinde moleküler şaperonların, UPR ilişkili genlerin, apoptoz yönlendirici mekanizmaların olduğu bir seri hücresel yanıtı uyarır. Benzer şekilde IRE1'in uyarımı, UPR ilişkili birçok geni uyararak protein katlanmasını, ER membran sentezini, ER ilişkili protein yıkım (Endoplazmik Retikulum Associated Degredation, ERAD) yolaklarını aktive eder.



**Şekil 2-4: Farklı türlerde karakteristik UPR Yolaklarının genel şeması**

Bazı durumlarda yukarıda yer alan UPR kurtarma ve yıkım mekanizmaları yanlış katlanmış proteinlerini birikimi ve geri dönüşümü için yeterli etkiyi gösteremez ve stres devam eder. Bu durum hücre ölümü ve

apoptoziz ile sonlanabilir. Stresin çok uzun sürmesi ve azaltılmaması sonucunda UPR uyarımının uzun süre devam etmesi apoptatik uyarımın gerçekleşmesine neden olabilir (Scöntal, 2012). Bununla birlikte ER stres ve apoptoz arasındaki etkileşim oldukça karmaşık bir süreçtir. Aynı UPR sensörleri, hücre sağkalımını desteklemeyi ve hücre stresini çözmeyi hedeflerken bir noktadan sonra adaptif yanıtları engelleyip apoptozu başlatabilir. Hangi cevabın meydana geleceğini belirleyen faktör yalnızca uyarımın süresi gibi gözükmemektedir. Hücrede UPR'nin ne kadar süre ile aktif olduğuna ve hücrenin ER stresini zamanında çözüp çözemeyeceğine bağlı olarak her iki yoldan birine yönelinebilir (Hetz, 2012).

Htt sitoplazmada yer alan bir protein olmasına rağmen dolaylıda olsa ER fonksiyonları üzerinde kuvvetli bir etkisi vardır (Sharp ve ark., 1995; Trottier ve ark., 1995). Mayalar ve memelilerde yapılan bir dizi çalışma mHtt toksisitesinin ER kalite kontrol sisteminde bozulmalara neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca genleşmiş polyQ ifadesinin hem maya hem de PC12 hücrelerinde erken ERAD bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir. mHtt varlığında ERAD ilişkili Np14, Ufd1 ve p97 proteinlerinin ekspresyonu azalmakta ve bunun sonucu olarak da katlanmamış proteinlerin sitosole taşınmasında yetersizlik oluşmaktadır. Bu gibi durumlarda Np14 ve Ufd1'in ekspresyonunun artırılmasıyla poliQ toksisitesinin azaldığı gösterilmiştir (Duenwald ve Linqvist, 2008). HEK293 hücre hattında yapılan çalışmalar, mHtt'nin ER membranına bağlı bir ubiquitin ligaz olan gp78 ile etkileştiğinde, onun p97'ye bağlanmasını bloke ederek ERAD'ı engellediği ve ER stresine yol açtığını kanıtlamıştır (H.Yang ve ark., 2016).

İlginç olarak, mHtt'nin neden olduğu ER stresi, agregatlardan ziyade, mHtt çözünür oligomerlerine bağlı gibi görünmektedir (Leitman ve ark., 2013). Bu bilgi mHtt'nin en zehirli türünün çözünür oligomerler olduğu bilgisi ile örtüşmektedir ( Arrasate ve ark., 2004; Herrera ve ark., 2011; Lajoie ve Snapp, 2010; Takahashi ve ark., 2008).

Otofajik yıkım Huntington'un da içinde yer aldığı poliQ uzaması temelli protein agregatlarının temizlenmesi için ideal bir yolak olarak görünmektedir. Buna bağlı olarak otofajinin uyarılması ile mHtt birikiminin azaldığı ve yaşam süresinin arttırıldığı gösterilmiştir. Autofagozomlar, mHtt'yi eksprese eden

hücrelerde normal bir hızda oluşmasına rağmen, otofajinin mHtt varlığında bozulduğuna dair kanıtlar vardır. Bunun nedeni olarak otofagozomların mHtt'yi kargo olarak tanımakta başarısız olması ve bu nedenle agregatların lizozomla kaynaşacak kadar uzun süre içeride kalarak yıkılmaktan korunduğu öne sürülmüştür. (Martinez-Vicente ve ark., 2010).

Huntington dahil tüm poliQ temelli hastalıkların ER stresi ile ilişkili olduğu hali hazırda gösterilmiştir. Bu nedenle, HD ve diğer ER stresle ilişkili hastalıklarda UPR ve diğer yanlış katlanmış protein stres yollarının hedeflenmesi, bu bozukluklara karşı etkili tedavilerin geliştirilmesi için çekici bir yaklaşım olmaya devam etmektedir (Yuwei Jiang ve ark., 2015).

#### **2.4. Çalışmanın Literatür ile uyumu**

HD'nin tedavisine yönelik çalışmalar son yıllara kadar yalnızca semptomları baskılamak, yaşam süresini ve kalitesini arttırmak üzerine olmuştur. Hastalığın moleküler nedeni uzun süredir bilinmesine rağmen, oluşturan patalojinin hücrede neden olduğu hasar, tepki ve kurtarım mekanizmalarının anlaşılması son yıllarda üzerine iyice yoğunlaşılan konular olmuştur. Yalnızca mekanizmanın keşfi değil, son yıllarda geliştirilen ASO, CRISPR, ER Stresi vb. bir çok yeni metod ile hastalığın tedavisine yönelik çalışmalarda oldukça hızlanmıştır. Özellikle çok benzer bir hastalık olan SMA'nın Nusinersen adı verilen ve FDA'den onay alan bir Anti-Sens Oligonukleotid aracılığı ile tedavisi benzer hastalıklar için büyük bir umut olmuştur.

Huntington hastalığının moleküler mekanizması ve tedavisine yönelik çalışmalarda hücre modelleri oluşturmak hasta sayısının azlığı, gerekli ve yeterli miktarda doku temin etmek, etik nedenler gibi bir çok farklı etkenden dolayı daima bir zorunluluk olarak ortaya çıkmıştır. Bu nedenle hastalık üzerine çalışan ve çalışmak isteyen araştırmacılar moleküler klonlama teknikleri kullanarak Huntington hücre modelleri üretmek durumunda kalmıştır. Üretilen hücre modelleri sitoplazmada birikim gösteren mutant huntington proteini ile karakterizedir (Arrasate M., Siddartha M. ve ark. 2004). Bu modeller ile yapılan çalışmalar protein agregasyonunu azaltma ve geri döndürmek üzerine olabileceği gibi, DNA ve RNA düzeyinde uygulanacak tedavilerle protein

agregasyonunu henüz başlamadan engellemek üzerinde kurulabilir. Hücre modelleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmaları mutlaka hayvan modelleri ve nihai olarak klinik çalışmalar takip etmelidir.

Bizde çalışmamızda literatüre benzzer ve uyumlu şekilde moleküler klonlama teknikleri kullanarak Huntington hücre modelleri elde etmeyi hedefledik. Bu sayede takiben gerçekleştirmek istediğimiz genetik tedaviye yönelik çalışmalarımızı bu modeller üzerinde uygulayabileceğiz. Bu modeller üzerinde gerçekleştirilecek başarılı çalışmaları takiben hayvan deneyleri ve klinik uygulamalar yapabilmek en önemli hedeflerimiz olacaktır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Reaktifler

##### 3.1.1. Cihazlar

- Yatay Elektroforez Sistemi
- Elektroforez için güç kaynağı
- Analitik terazi
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı
- Mikrodalga fırın
- PZR cihazı
- Otomatik pipet takımı
- Soğutmalı santrifüj
- Spektrofotometre
- Su banyosu
- UV transilluminator
- Vorteks
- Klas II biyolojik emniyet kabini
- Co2 etüv
- Etüv
- ZOE™ Fluorescent Cell Imager
- Nikon Eclipse Ti Floresan Mikroskop

##### 3.1.2. Kitler ve Reaktifler

• PoliQ25-103 Sentetik genler, EcoRI ve Bam HI Restriksyon Enzim ve Bufferları, pcDNA3.1-GFP floresan protein füzyonlu memeli ekspresyon plasmidi, Hızlı DNA Ligasyon Kiti, Taq DNA polimerase, Plazmid İzolasyon Kiti,

Lipofektamin 3000 transfeksiyon kiti, Agarose, DNA Ladder, HEK293 hücre hattı, SHSY5Y hücre hattı

### 3.2. Sentetik Genlerin Temini

Huntington hücre modellerinin oluşturulması için Huntington geninin ilk ekzonunda yer alan 17 aminoaside ait DNA dizisini takiben sırası ile; kontrol olarak 25 CAG kodon tekrarı (PoliQ25) ve 103 CAG kodon tekrarı (PoliQ103) içerecek şekilde sentetik olarak ürettirilmiştir. Daha sonra gerçekleştirilecek klonlama aşamalarına uygun olarak sentetik genlerin 5' ve 3' uçlarına restriksiyon enzim kesim bölgeleri yerleştirilmiştir.

### 3.3. Restriksiyon Kesim Reaksiyonu

Restriksiyon Restriksiyon kesimi yapılacak PoliQ25, PoliQ103 sentetik genleri ve klonlamanın yapılacağı floresan pcDNA3.1-GFP plasmidi için Tablo 3-1 de yer alan protokol uyarınca reaksiyonlar hazırlandı. Kesim 37 °C de 2 Saat yapıldı. Takiben 65 °C de 20 dk bekletilerek enzim inaktivasyonu gerçekleştirildi.

**Tablo 3-1: Restriksiyon Kesim Reaksiyonu**

Adı	Hacim
Steril Deiyonize Su	16.3 ul
10X Restriksiyon Enzim Buffer	2 ul
Acetile BSA	0.2 ul
DNA 1 ug/ml	1.0 ul
Restriksiyon Enzim 10 u/ul	0.5 ul
Total	20 ul

### 3.4. DNA Ligasyon Reaksiyonu

Enzim Kesimini takiben ligasyona hazır poliQ25 ve PoliQ103 sentetik DNA'ları ile pcDNA3.1-GFP plazmidinin ligasyonu için Tablo 3-2 de yer alan şekilde her bir gen için reaksiyon karışımları hazırlanır. Karışım 22 °C de 5 Dakika inkübe edilir. Inkübasyonu takiben transfeksiyon yapılabileceği gibi reaksiyon karışımı +4 °C de ileri bir kullanım için de saklanabilir.

**Tablo 3-2: DNA Ligasyon Reaksiyonu**

Adı	Hacim
Lineer Plazmid DNA'sı (100ng/ul)	1 ul
İnsert DNA (100 ng/ul)	3 ul
5X hızlı ligasyon tamponu	4 ul
T4 DNA Ligaz 5 u/ul	1 ul
Deiyonize Su	11 ul
Toplam	20 ul

### 3.5. pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 ve pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidlerinin E.coli DH5α bakteri hücrelerine transformasyonu

#### 3.5.1. Inoue Tamponu Kullanılarak Kompetant Hücrelerin Hazırlanışı

Gece boyu sıvı LB besiyerinde inkübe edilen DH5α hücrelerinden 2ml alınarak taze 250 ml sıvı LB besiyerine ekimi yapılır. Ekimi yapılan taze kültür belli aralıklar ile ölçülerek OD<sub>600</sub> de 0,55 olana kadar inkübe edilir. İstenilen değere ulaşıncaya kadar kültür 50 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 10 dakika buzda bekletilir. Daha sonra kültür +4 °C 2500 g'de 10 dakika santrifüj edilir. Supernatant atılarak pellet Tablo 3'de detayları belirtilen inoue transformasyon tamponu ile buz üzerinde çözülür. Hücreler yukarıda bahsedilen şartlarda yeniden santrifüj edilir. Supernatant atılır. Pellet 20 ml inoue transformasyon tamponu ve 1.5 ml DMSO eklenerek çözülür. Hücreler hemen transformasyon için kullanılır ya da uzun süreli muhafaza için hızla dondurulur.

**Tablo 3-3: Inoue Transformasyon Tampon İçeriği**

Inoue Transformasyon Tampon	1 Litre İçin
55 mM MnCl <sub>2</sub>	10.88 gr
15 mM CaCl <sub>2</sub>	2.20 gr
250 mM KCL	18.65 gr
10 mM PIPES (0.5M, pH 6.7)	20 ml
H <sub>2</sub> O	1 litreye tamamlanır

### 3.5.2. Transformasyon Reaksiyonu ve Kolonilerin Seçimi

200 ul kompetan hücreye 500 ng Plasmid DNA'sı eklenir. DNA hücre karışımı 30 dk buzda bekletilir. Daha sonra 42 Co de 90 saniye ısı şoku uygulanır ve tüp yeniden buza alınarak 5 dakika bekletilir. Transformasyon karışımının üzerine 800 mikrolitre sıvı LB besiyeri eklenerek 37 Co de 60 dakika inkübe edilir. Daha sonra hücreler klonlamanın doğrulanması için ampisilin içeren katı LB besiyerine ekilerek bir gece 37 Co de inkübe edilir.

### 3.5.3. Klonlanmış Kolonilerden Plazmid İzolasyonu

Ampisilin içeren seçic besiyerinde büyüyen koloniler seçilerek 100 ml sıvı LB besiyerine ekilerek gece boyu 37 C° de inkübe edilir. Ertesi gün kültürden InnuPrep Plasmid Midi (Analytik Jena AG) kiti kullanılarak üreticinin önerdiği protokol gereğince plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.4. Plazmidlerin Restriksiyon Enzim Kesimi ile Doğrulanması

İzolasyonu gerçekleştirilen plazmidler BAMHI restriksiyon enzimi ile tablo 3-1'de yer alan reaksiyon karışımı hazırlanarak 37 C° de 90 dakika kesime uğratılmış. Kesim sonuçları %1'lik agaroz jel üzerinde ortalama 120 Volt güç altında yaklaşık 1 saat yürütülmüştür.

## 3.6. pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 ve pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidlerinin HEK293 ve SHSY5Y hücre hattına Transfeksiyonu

### 3.6.1. Hücre Kültürü Hazırlanışı ve İnkübasyonu

Ticari olarak temin edilen HEK293 ve SHSY5Y hücre hatları üreticinin önerdiği protokol uyarınca açıldı ve alt kültür için daima yüksek-glikoz içerikli DMEM besiyerinde büyütüldü. Çalışma boyunca besiyerlerine %10 FBS ve %1 Penisilin – Streptomisin antibiyotik karışımı eklendi. Hücreler %5 oranında CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. Yapışkan özellikli HEK293 ve SHSY5Y hücre hatlarının petri kaplarından kaldırılarak pasajlanması için sırası ile 3x ve 1x tripsin kullanıldı.

### 3.6.2. Transfeksiyon Reaksiyonun Hazırlanışı

Transfeksiyon için Lipofectamine™ 3000 Reagent kiti kullanılmıştır. Hücreler Transfeksiyon öncesi 6 kuyucuklu plakalar içerisine ekilmiştir ve üreticinin önerdiği protokol uyarınca HEK293 ve SHSY5Y Hücreleri % 70-90

yoğunluğa ulaşıncaya kadar büyütülmüştür. Kit içerisinde yer alan lipofektamin 3000 ve P3000 reaktifleri 125'er mikrolitre olacak şekilde opti-mem besiyeri içerisinde seyreltilmiş, ayrıca kuyucuk başına 2.5 mikrogram plazmid DNA'sı P3000 reaktifine ilave edilmiştir. Takiben iki tüp birbirine karıştırılarak 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Elde edilen karışım nazikçe damlatılarak hücrelerin üzerine eklenmiş ve hücreler 24., 48. Ve 72. saatlerde görüntülenmiştir.

### **3.7. Transfekte olmuş HEK293 Hücre hattının ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile görüntülenmesi**

Transfekte olan hücreler BioRad marka ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile optik ve digital yakınlaştırma tekniği kullanarak görüntülenmiştir. Görüntüler cihaz yazılımı tarafından kayıt altına alınmıştır.

### **3.8. Transfekte olmuş HEK293 Hücre hattının Nikon Eclipse Ti model floresan mikroskop ile görüntülenmesi**

Transfekte olan hücreler Nikon marka Eclipse Ti model floresan mikroskop ile 40x ve 100x büyütme altında görüntülenmiş. Görüntüler Nikon NIS-Elements yazılımı kullanılarak kayıt altına alınmış ve analiz edilmiştir. Her bir görüntü beyaz ışık, floresan ışık ve merge olmak üzere üç şekilde kayıt altına alınmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sentetik Genlerin Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

#### 4.1.1. Plazmid Klonlama

Sentetik olarak temin edilen Htt geninin ilk ekzonunda yer alan 17 aminoasidi kodlayan DNA dizisini takiben 25 ve 103 adet CAG tekrarı taşıyan oligonukleotid parçaları ve Memeli ekspresyon vektörü pcDNA3.1-GFP EcoRI kesim bölgeleri oluşturmak için restriksiyon enzim kesim reaksiyonuna uğratılmış ve akabinde DNA ligasyon reaksiyonu kurularak ilgili sentetik gen bölgesinin plazmidde yerleştirilmesi sağlanmıştır. Ligasyonun doğruluğunu kontrol etmek için reaksiyon karışımından alınan plazmidler BAM HI restriksiyon enzimi kullanılarak kesime uğratılmıştır (Şekil 4-1).



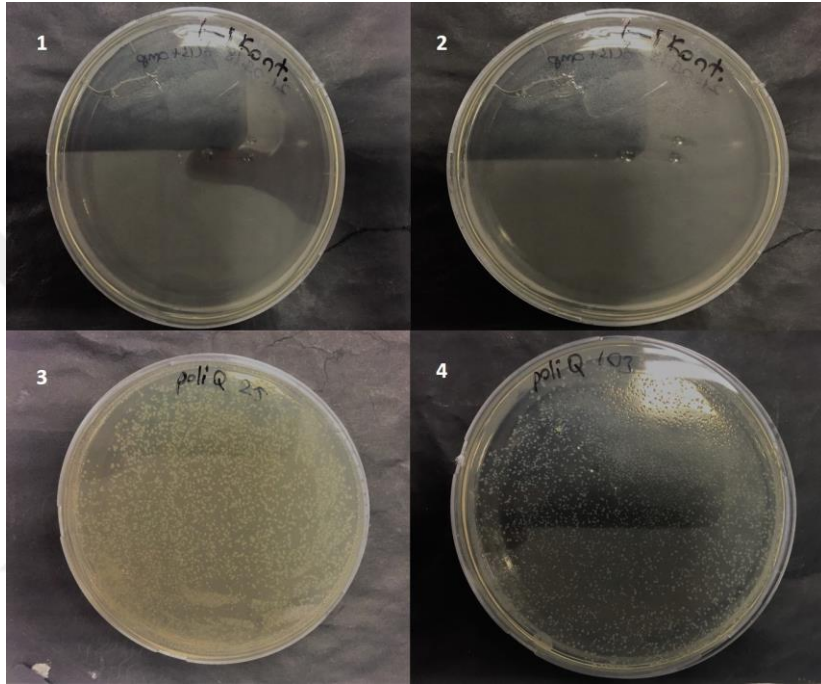
**Şekil 4.1. BAM HI Plazmid kesim reaksiyonu**

1) Marker 1 Kb DNA Ladder 2) pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 3) pcDNA3.1-GFP-PoliQ25

## 4.2. PoliQ25 ve PoliQ103 plazmidlerinin transformasyonu

### 4.2.1. Transformasyon

Ligasyon reaksiyonu başarılı klonların seçimi ve çoğaltımı için E.coli DH5 alpha bakteri hücrelerine transforme edilmiştir. Kültürler 37 °C derecede ampisilin içeren besiyerinde bir gece inkübe edilmiştir (Şekil 4-2).

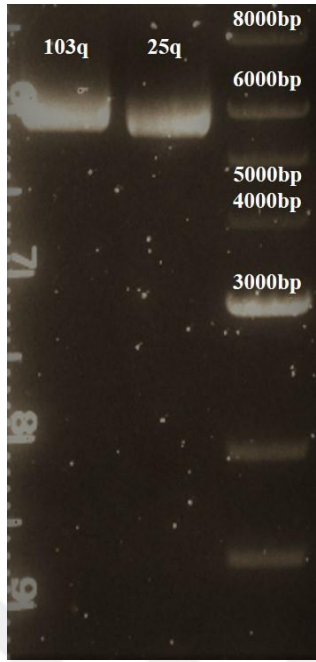


**Şekil 4-2: Transformasyonu takiben ampisilin içeren seçici besiyeri görüntüleri**

1) PoliQ25 için negative Kontrol, 2) PoliQ103 için Negatif Kontrol, 3) PoliQ25 plazmidi taşıyan koloniler, 4) PoliQ 103 taşıyan koloniler.

### 4.2.2. Plazmid İzolasyonu ve Kesim ile doğrulama

Ampisilinli besiyerinde seçici olarak büyüyen koloniler toplanarak bir gece 37 oC de sıvı LB besiyerinde büyütülmüş ve daha sonra plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu takiben plazmidler klonlamanın doğruluğunu ispatlamak için BAM HI restriksiyon enzim kesim reaksiyonuna uğratılmış ve lineer hale getirilerek %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4-3).



**Şekil 4-3: BAM HI enzimi ile Transformasyon Sonrası Plazmid Kesimi**

#### **4.3. PoliQ25 ve PoliQ103 Plazmidlerinin HEK293 Hücre Hattına Transfeksiyonu ve GFP-Füzyonlu mutant Htt proteinini birikiminin gösterilmesi**

pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 ve pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidlerinin HEK293 hücre hattına transfeksiyonları gerçekleştirilmiştir. 24., 48. ve 72. Saatlerde önce ZOE™ Fluorescent Cell Imager ve takiben Nikon ECLİPSE Ti Floresan Mikroskop ile görüntülenmiştir.

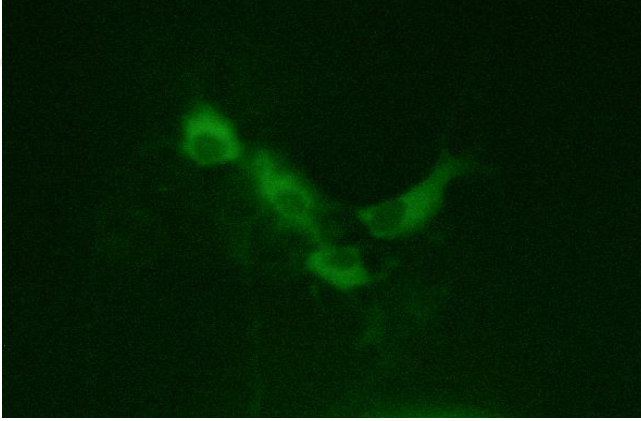
##### **4.3.1. HEK293 Transfeksiyonlarının ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile görüntülenmesi**

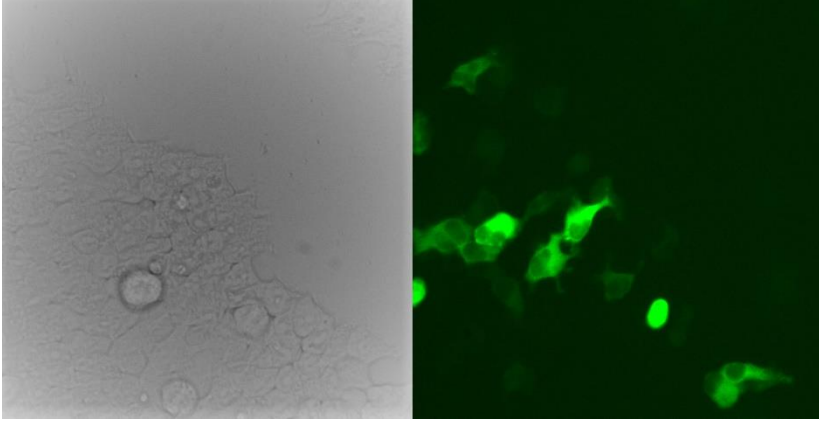
PoliQ25 ve PoliQ 103 transferlerinin HEK293 hücre hatlarına transfeksiyonunu takiben ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile yapılan görüntülemelerde her iki plazmidin de başarılı olarak hücre hattına transfekte olduğu görülmüştür.

pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidlerinin transfekte olduğu hücrelerde Htt-GFP füzyon proteininin eksprese olduğu ve literatüre uygun olarak hücre sitoplazmasında homojen olarak dağıldığı görülmüştür. Bu kanıtlar ışığında Huntington geninin 17 aminoasidlik ilk ekzonunu ve takiben 25 CAG kodonunu kodlayan DNA bölgesinin kodladığı proteinin sorunsuz olarak üç boyutlu

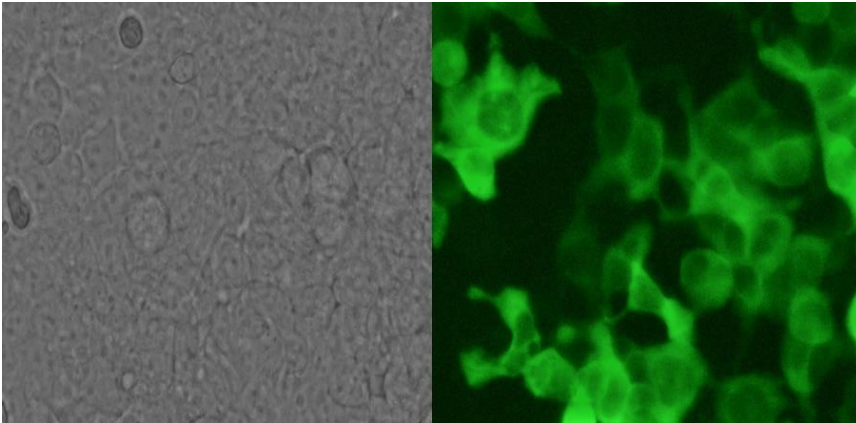
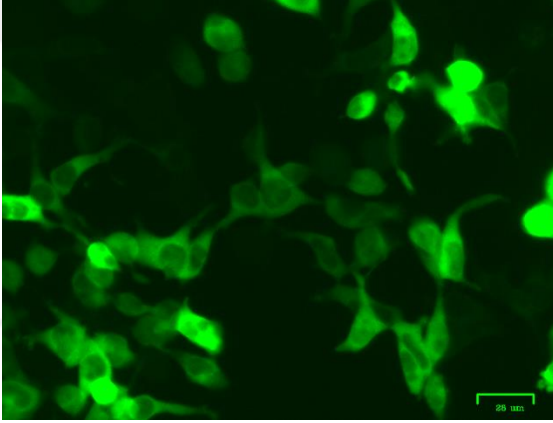
yapısına kavuştuğu ve sentezlendiği bölgeden ayrılarak sitoplazma içerisine ulaştığı ortaya konmuştur. Hücre çekirdeklerinin ışığa yapmaması bu olguyu destekleyen diğer bir kanıt olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 4-4, Şekil 4-5, Şekil 4-6).

pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidlerinin başarılı şekilde klonlanarak transfekte olduğu hücrelerde mHtt-GFP füzyon proteininin eksprese olduğu ve floresan ışık altında kuvvetli parlamalar veren ve zamanla büyüyen agregatlar oluşturduğu gözlenmiştir. Bu kanıtlar literatüre uygun olarak 103Q-GFP füzyon proteinlerinin 35 CAG tekrarının aşılması durumunda  $\beta$ -katlanmalar yapmak sureti ile patalojinin başladığını ifade eden literatür bilgisi ile uyumlu olarak hücre içinde biriktiği gözlenmiştir. Bu birikimin hücrelere verdiği zarar özellikle 48. Saatten sonra pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi taşıyan hücrelerin pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 taşıyan hücrelere göre daha yoğun olarak öldüğünün gözlenmesi ile desteklenmiştir (Şekil 4-7, Şekil 4-8, Şekil 4-9).

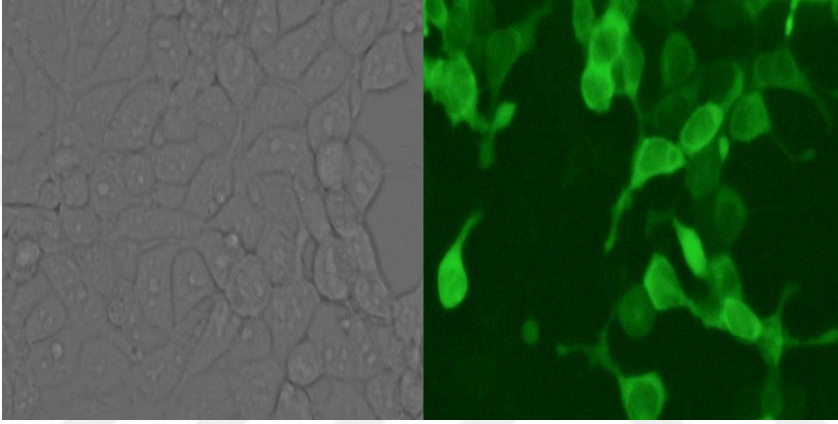
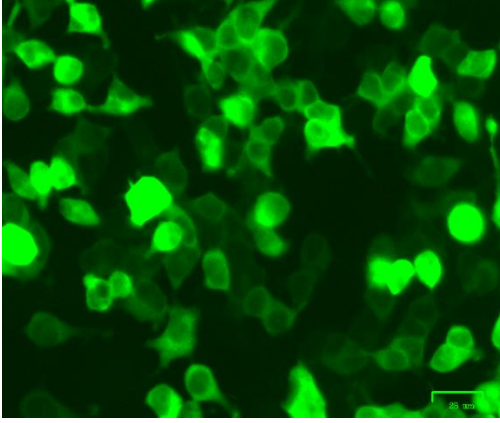




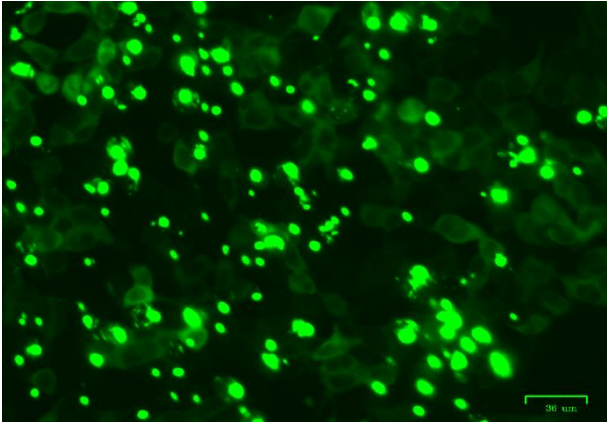
**Şekil 4-4: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin Beyaz ve Floresan Işık altında ki 24. Saat Görüntüsü**

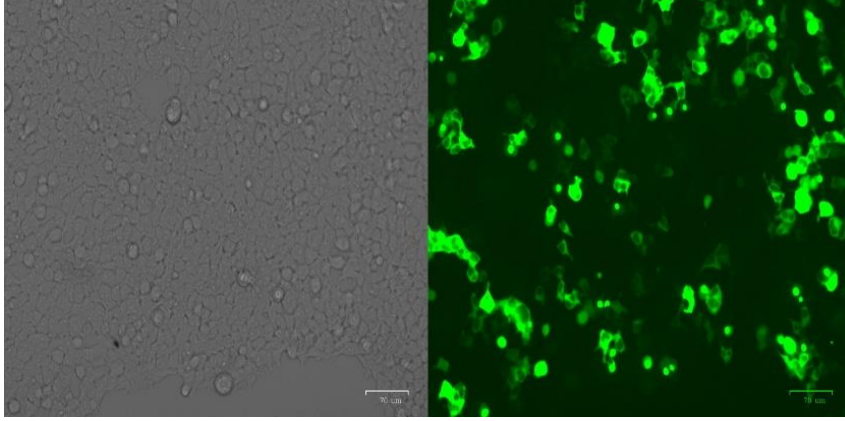


**Şekil 4-5: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin 48. Saat Görüntüsü**

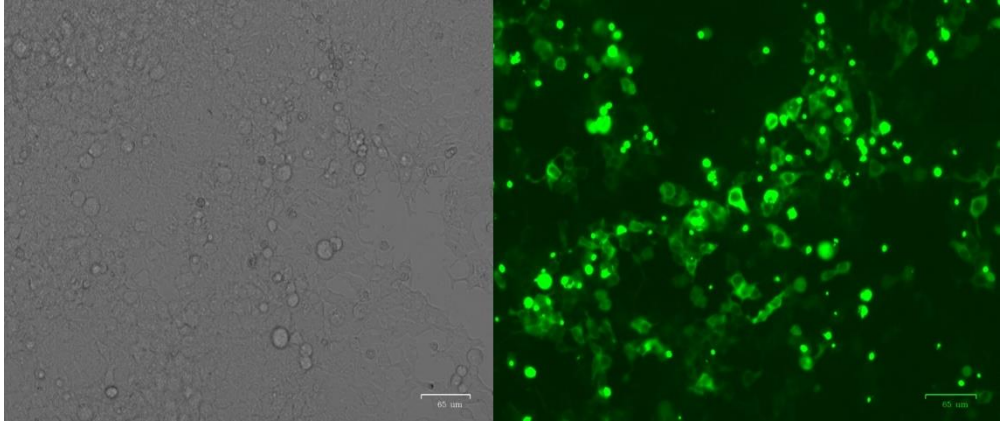
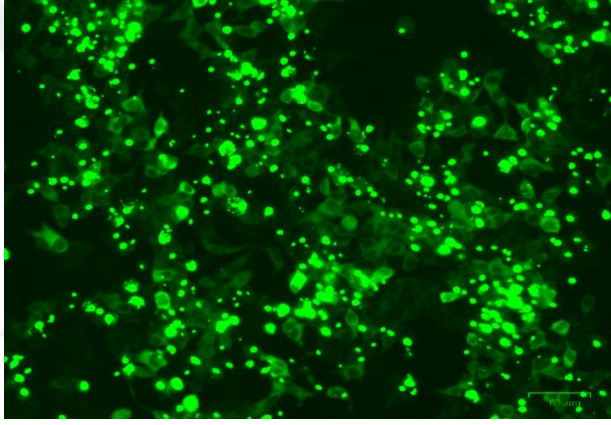


**Şekil 4-6: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin 72. Saat Görüntüsü**

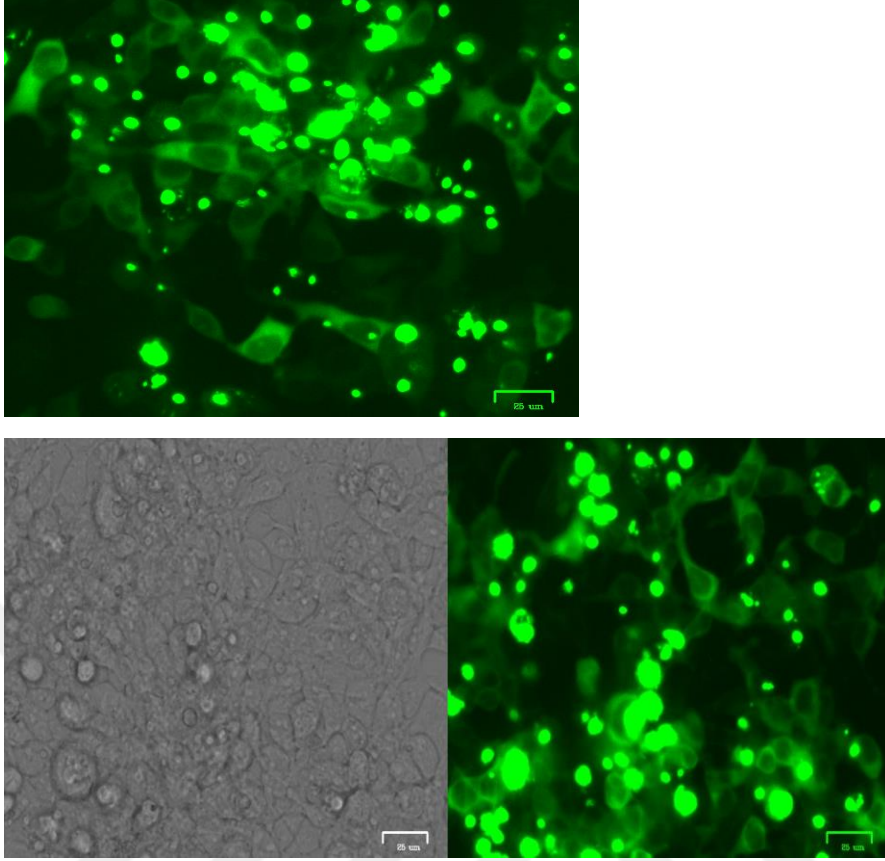




**Şekil 4-7: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin 24. Saat Görüntüsü**



**Şekil 4-8: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin 48. Saat Görüntüsü**

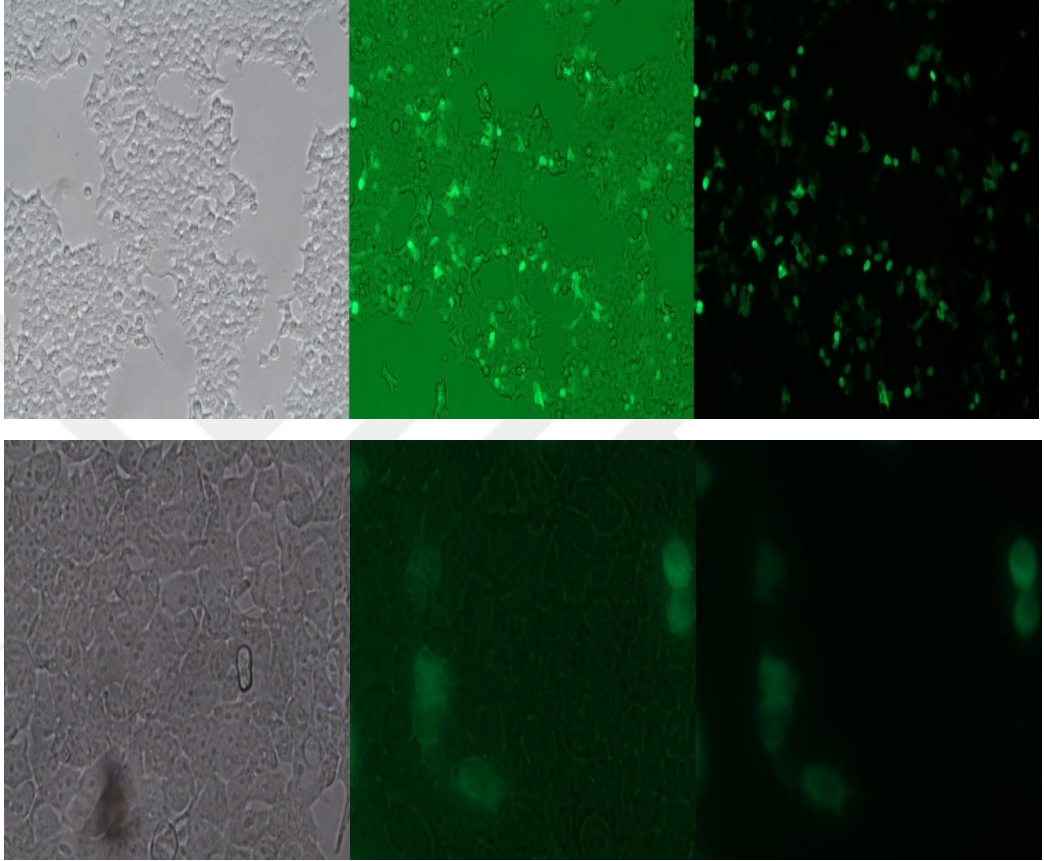


**Şekil 4-9: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin 72. Saat Görüntüsü**

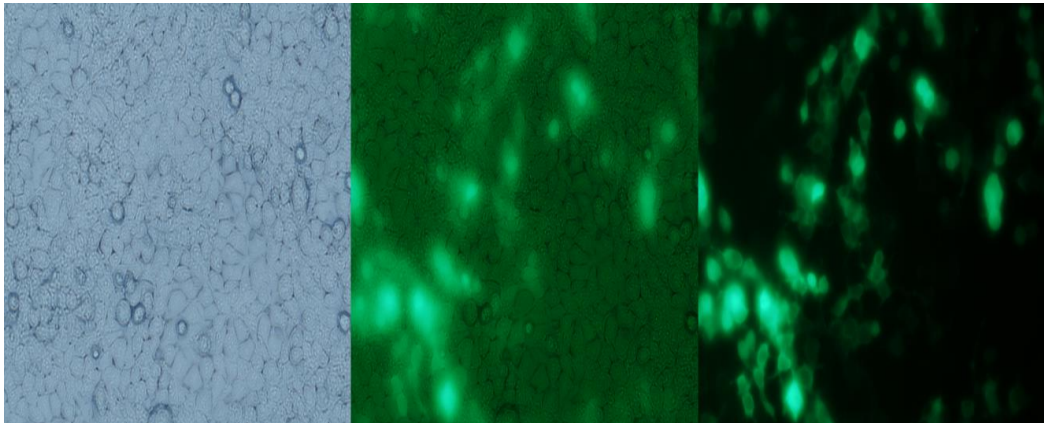
#### **4.3.2. HEK293 Transfeksiyonlarının Nikon Eclipse Ti Floresan Mikroskop ile görüntülenmesi**

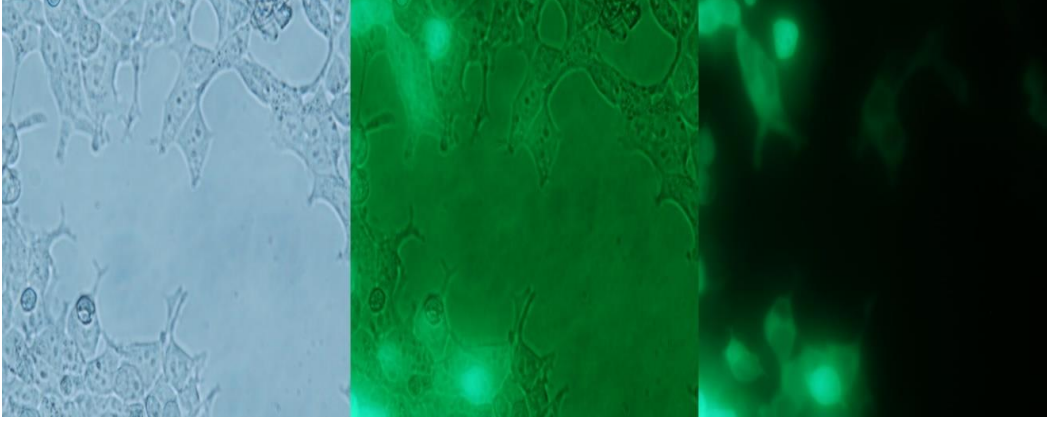
Floresan mikroskop ile ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile yapılanlara nazaran çok daha detaylı ve tek bir hücreyi hedef alabilen görüntülemeler yapılmıştır. Floresan görüntülemeleri üç farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak beyaz ve yeşil floresan ışığın ortak olarak aydınlatması (Merge) sağlanarak doğru hücrenin seçilimi ve floresan ışımının yeri saptanmıştır. İkinci olarak yalnızca yeşil floresan ışımada GFP füzyon proteinlerinin ışması saptanmıştır. Son olarak ise beyaz ışıkta hücrenin detaylı görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu görüntülemelerde yukarıda yer alan görüntüler ile uyumlu olarak pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidinin transfekte olduğu hücrelerde floresan ışımının homojen olarak dağıldığı gösterilmiştir (Şekil 4-10, Şekil 4-11, Şekil 4-12). pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi taşıyan hücrelerde ise floresan ışımaların hücre sitoplazmasının bir noktasında toplanarak yoğun

bir ışığa verdiği gözlenmiştir. Bu veri GFP proteini ile füzyon halinde sentezlenen 103 CAG tekrarı taşıyan mHtt proteininin  $\beta$ -katlanmalar nedeni ile doğru bir şekilde katlanamayarak hücre içinde agregatlar şeklinde biriktiğini kanıtlamaktadır (Şekil 4-13, Şekil 4-14, Şekil 4-15).

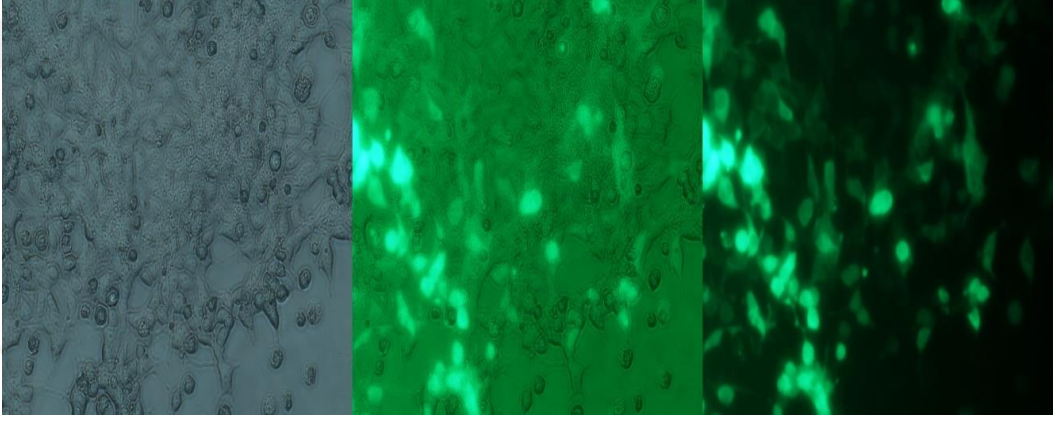


**Şekil 4-10: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin Sırası ile 40x ve 100x 24. Saat Görüntüsü**

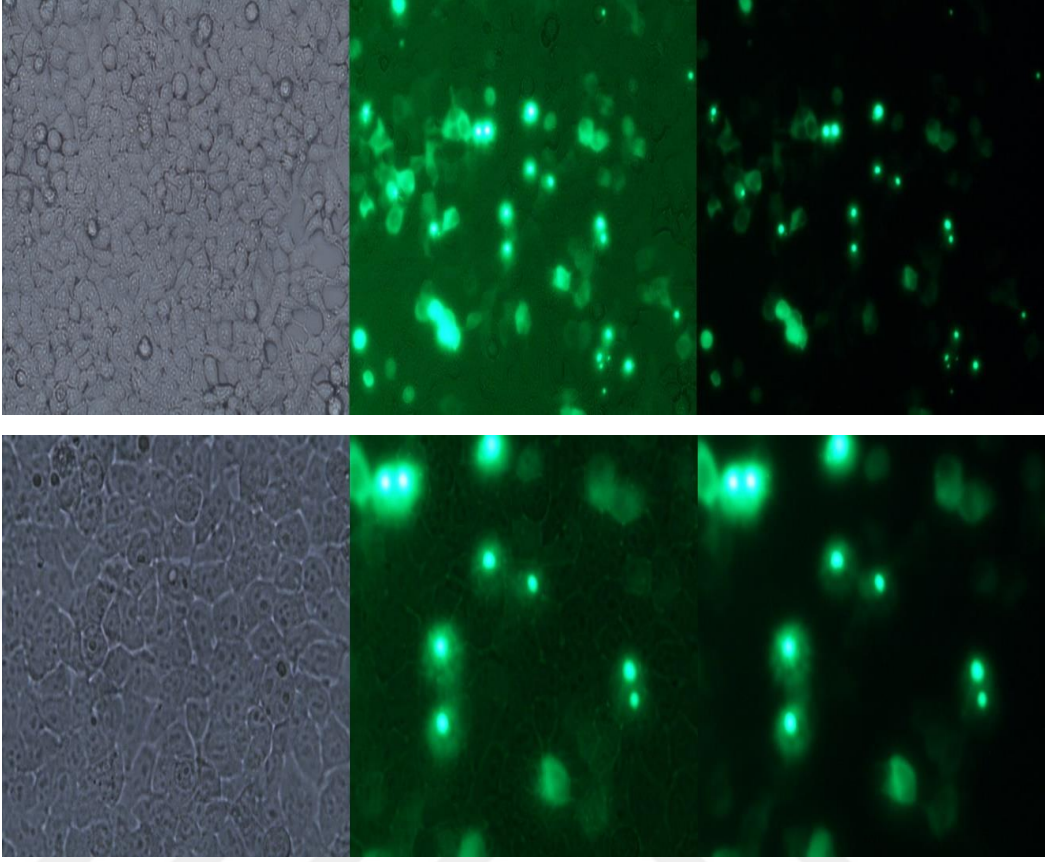




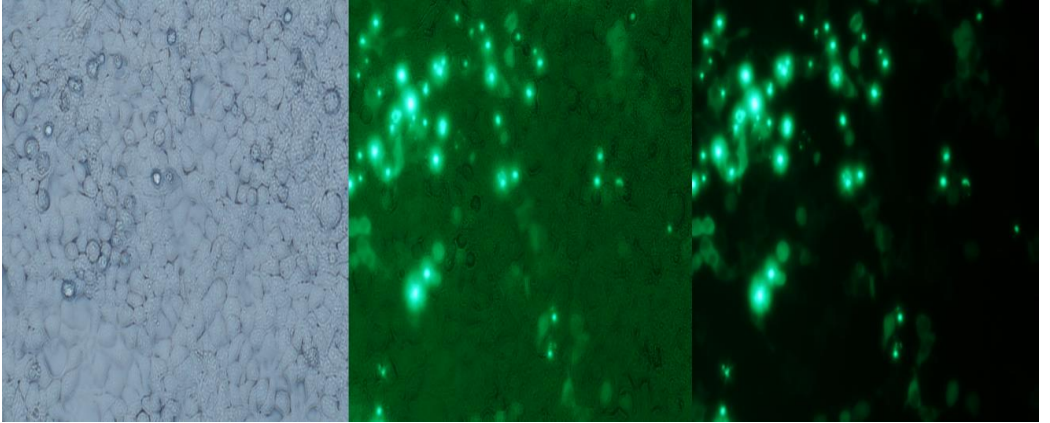
**Şekil 4-11: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin Sırası ile 40x ve 100x 48. Saat Görüntüsü**

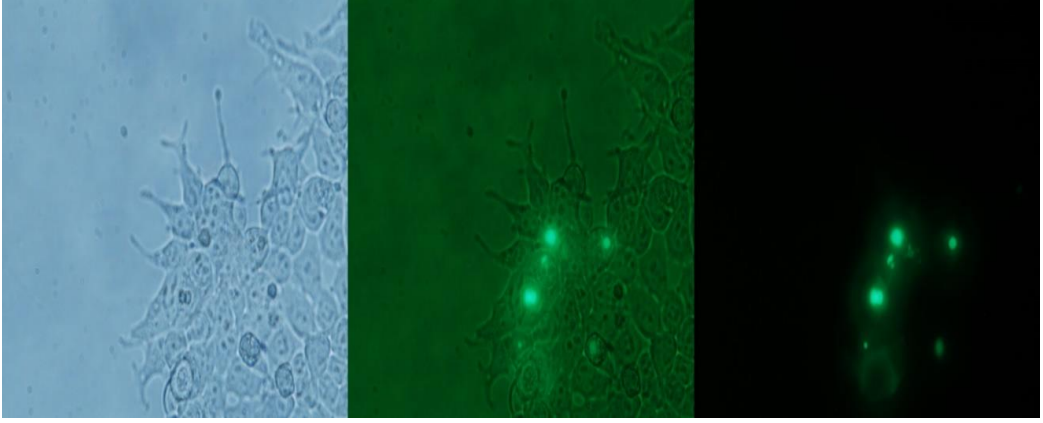


**Şekil 4-12: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin Sırası ile 40x ve 100x 72. Saat Görüntüsü**

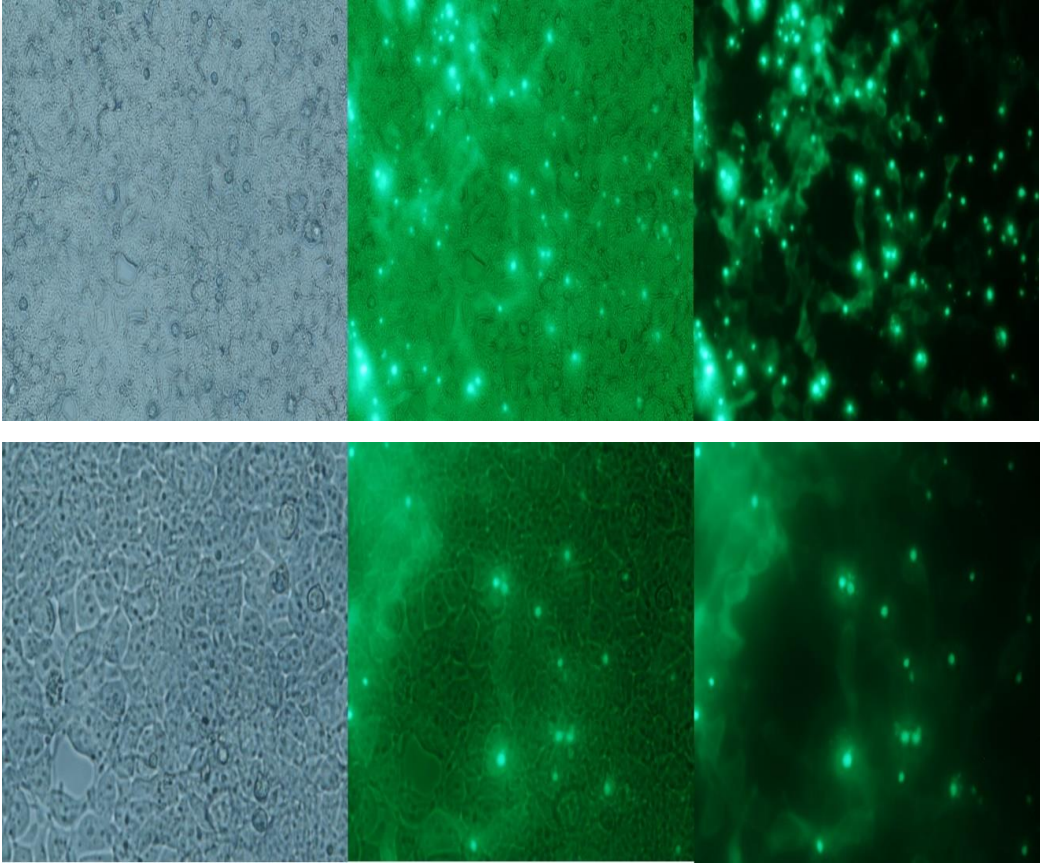


**Şekil 4-13: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin Sırası ile 40x ve 100x 24. Saat Görüntüsü**





**Şekil 4-14: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin Sırası ile 40x ve 100x 48. Saat Görüntüsü**

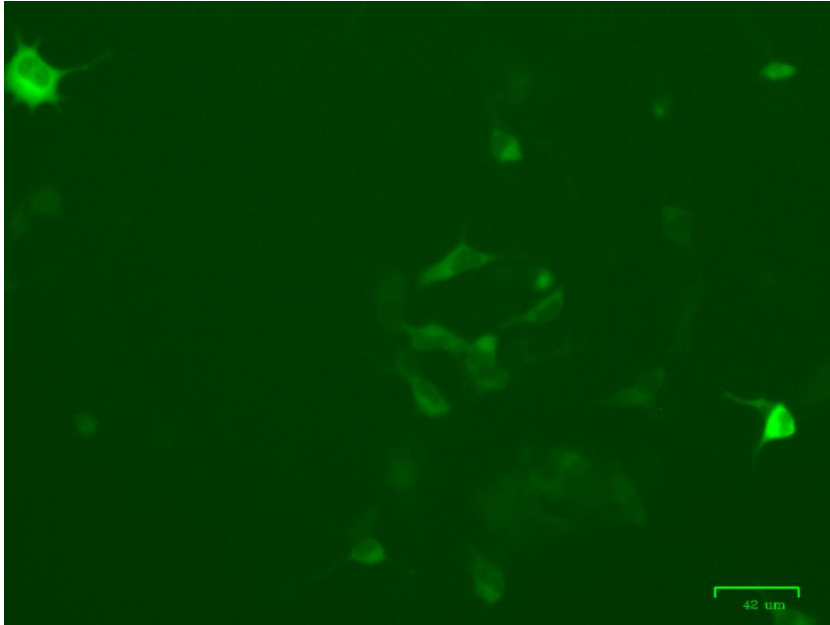


**Şekil 4-15: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin Sırası ile 40x ve 100x 72. Saat Görüntüsü**

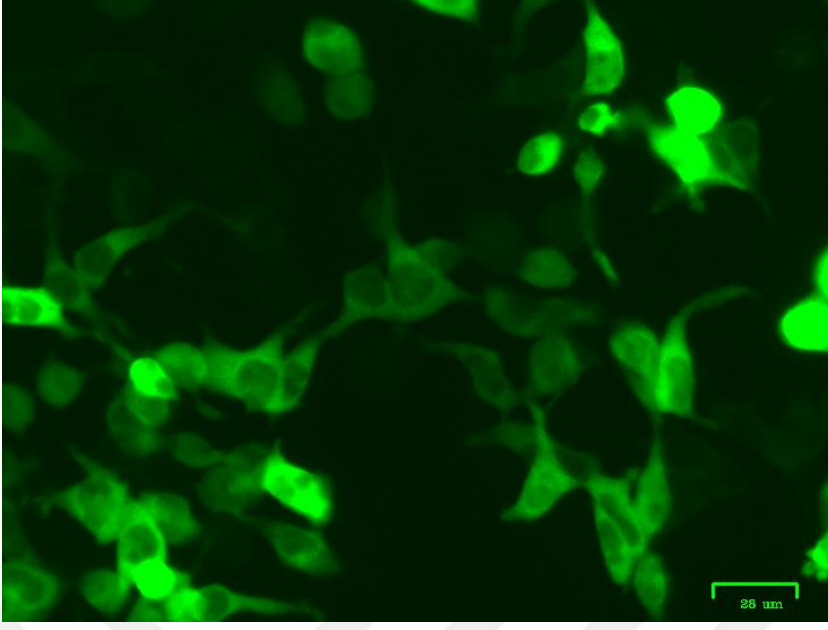
### 4.3.3. SHSY5Y Transfeksiyonlarının ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile görüntülenmesi

SHSY5Y nöral dokulardan elde edilen bir nöroblast hücre hattıdır. Uzun süredir nörodejeneratif hastalıklar için model görevi görmektedir. Yaptığımız çalışmalar da SHSY5Y hatlarının canlılığının ve devamlılığının HEK293'e göre çok daha zor olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle SHSY5Y hücreleri ile geliştirilecek kararlı bir Huntington modelinin ve bunu gerçekleştirmeye yarayan optimize bir yöntemin oluşturulması oldukça önemli gözükmemektedir.

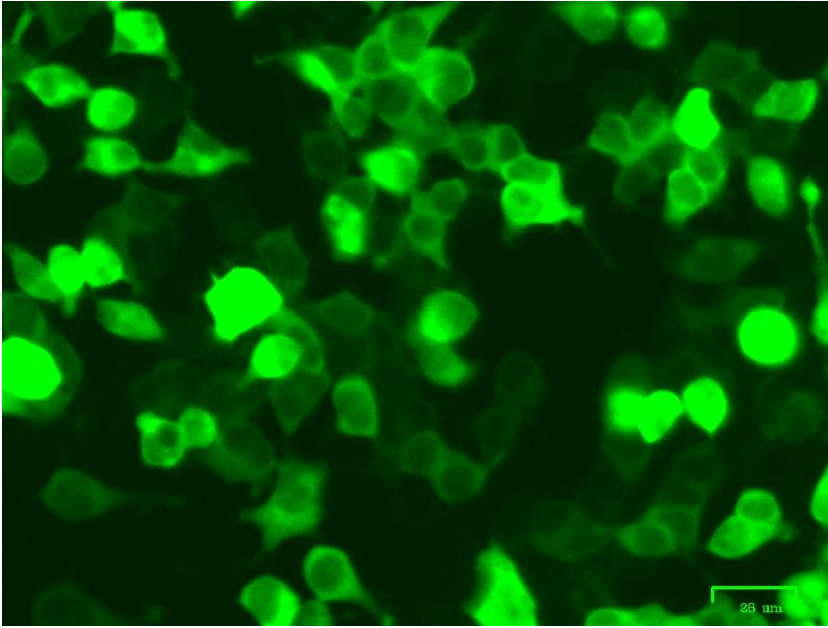
Her iki plazmidin de SHSY5Y hücrelerine başarılı bir şekilde transfekte olduğu ZOE™ Fluorescent Cell Imager ile gösterilmiştir. Literatüre ve çalışmamızda HEK293 hücrelerinde gözlenen verilere uygun olarak pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidinin başarılı bir şekilde transfekte ettiği hücrelerde floresan ışığa hücre sitoplazmasında homojen bir şekilde dağılmıştır (Şekil 4-17, Şekil 4-18, Şekil 4-19). Buna karşın pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidinin transfekte ettiği hücrelerde floresan ışığa yanlış katlanan mHtt proteininin oluşturduğu agregatlar üzerinde yoğun noktalar olarak gözlenmiştir (Şekil 4-20, Şekil 4-21, Şekil 4-22).



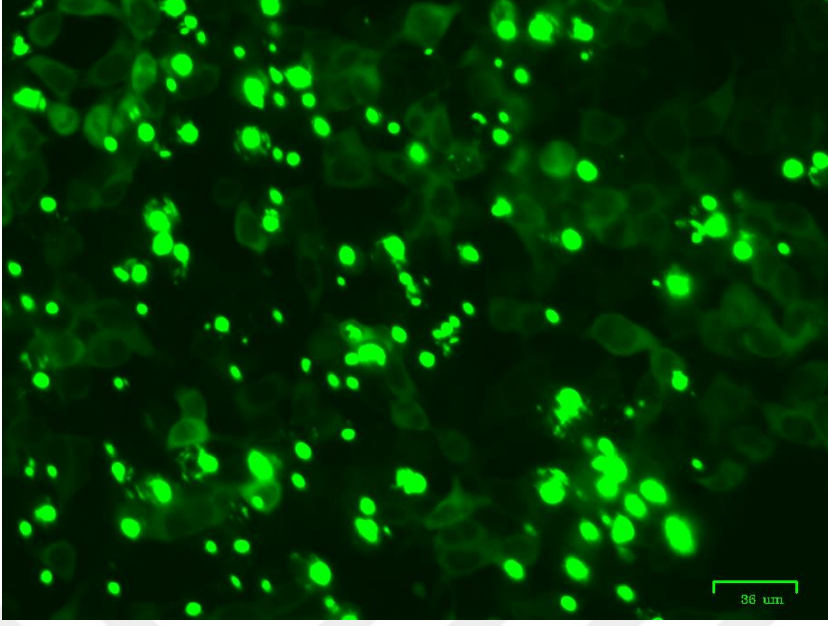
**Şekil 4-16: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 24. Saat Görüntüsü**



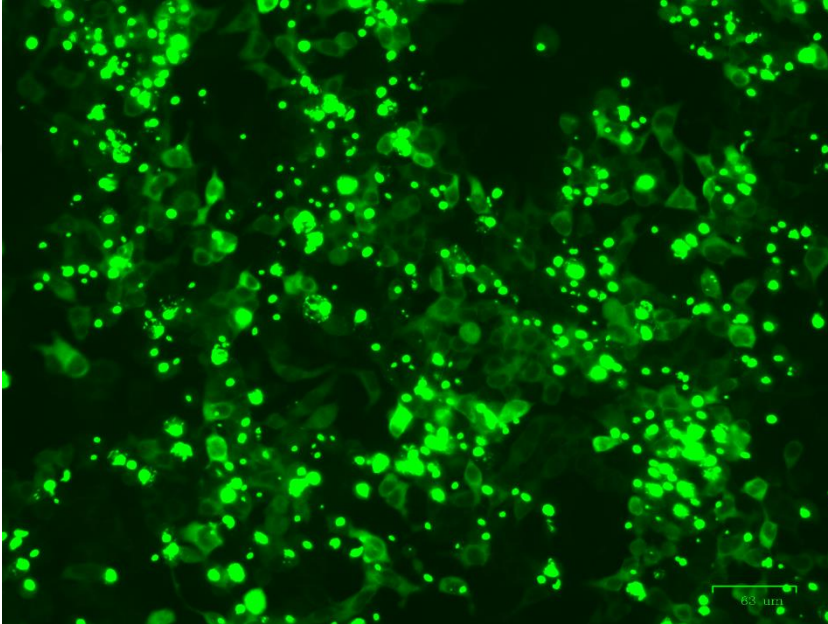
**Şekil 4-17: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 48. Saat Görüntüsü**



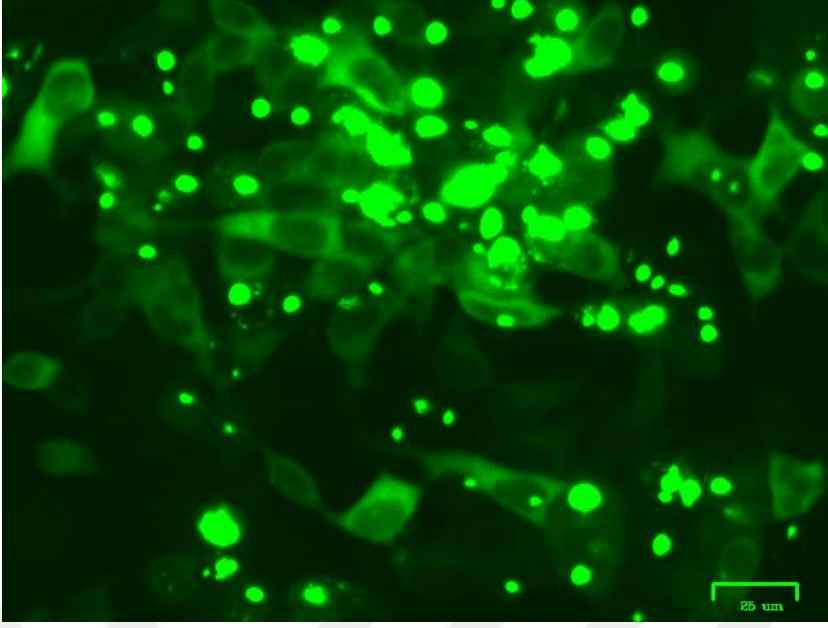
**Şekil 4-18: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 72. Saat Görüntüsü**



**Şekil 4-19: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 24. Saat Görüntüsü**



**Şekil 4-20: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 48. Saat Görüntüsü**



**Şekil 4-21: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidini ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 72. Saat Görüntüsü**

#### **4.3.4. SHSY5Y Transfeksiyonlarının Nikon Eclipse Ti Floresan Mikroskop ile görüntülenmesi**

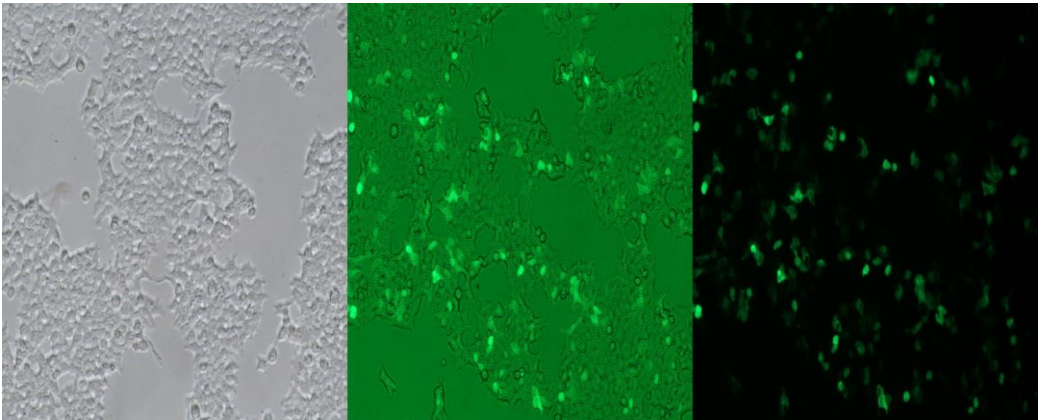
Transfekte olmuş SHSY5Y hücrelerinin floresan mikroskop ile görüntülenmesinin de HEK293 hücrelerinin görüntülenmesi ile aynı metod kullanılmıştır. Hücreler Beyaz, Floresan ve Merge olma üzere üç farklı ışık kaynağı altında görüntülenmiştir. Literatüre ve çalışmamızda kullanılan HEK293 hücre hattı görüntülerine uyumlu olarak pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidini taşıyan hücrelerde agregat oluşumu gösterilmiştir. Çalışmalar da HEK293 hücrelerinden farklı olarak SHSY5Y hücreleri sinir hücreleri ile karakterize sitoplazmik uzantılar yaptığı gözlenmiştir. Bazı hücreler de yanlış katlanmış protein birikiminin bu uzantılar içerisinde lokalize olduğu gözlenmiştir.



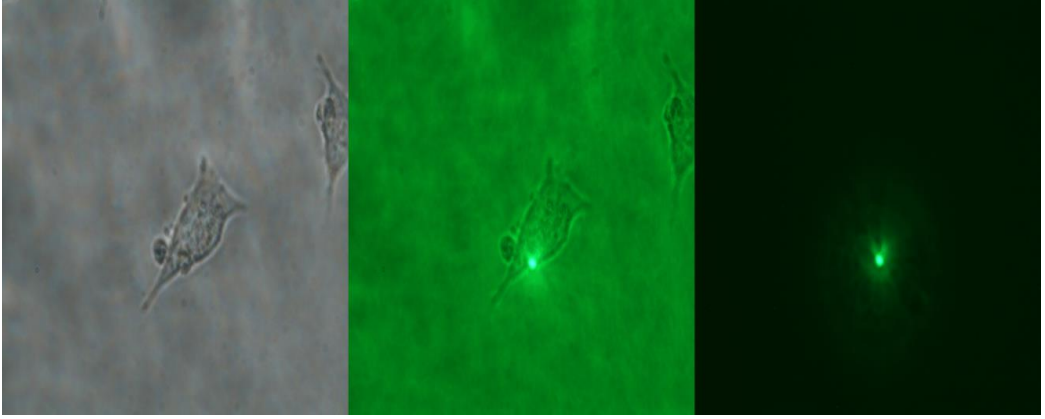
**Şekil 4-22: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 24. Saat Görüntüsü**



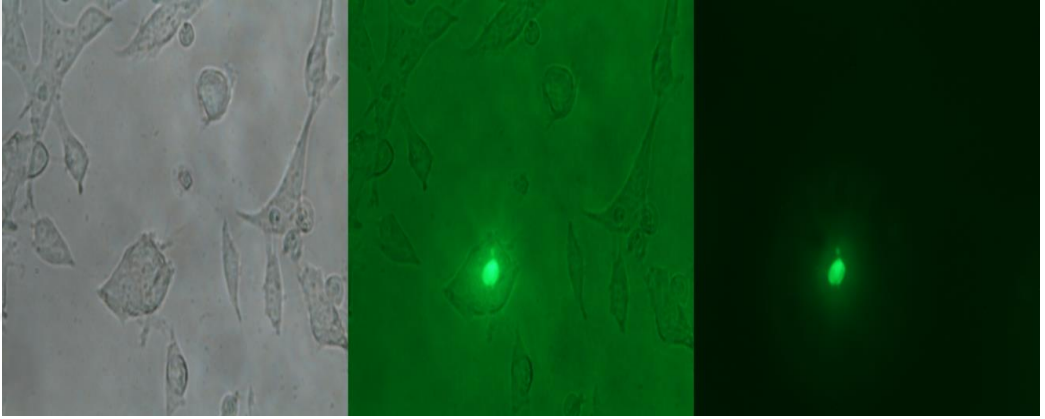
**Şekil 4-23: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 48. Saat Görüntüsü**



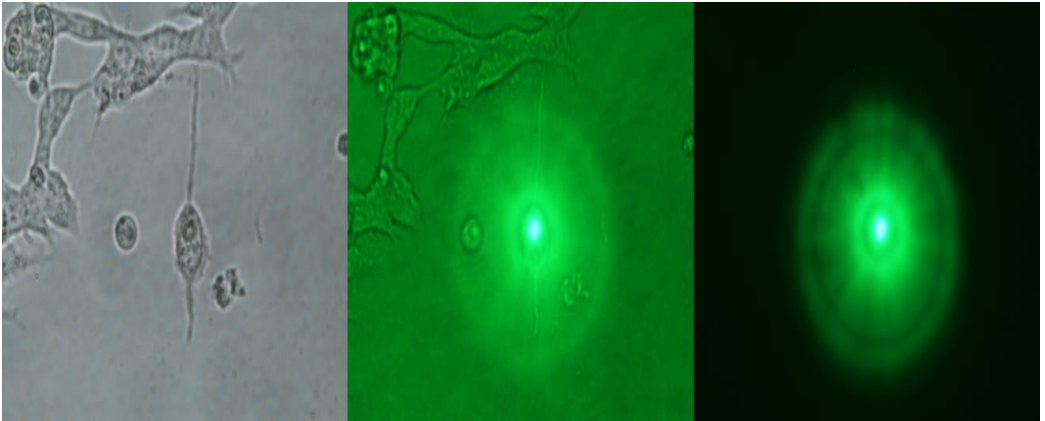
**Şekil 4-24: pcDNA3.1-GFP-PoliQ25 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 72. Saat Görüntüsü**



**Şekil 4-25: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 24. Saat Görüntüsü**



**Şekil 4-26: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 48. Saat Görüntüsü**



**Şekil 4-27: pcDNA3.1-GFP-PoliQ103 plazmidi ile transfekte edilmiş SHSY5Y hücrelerinin 72. Saat Görüntüsü**

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda bir nörodejeneratif bozukluk olan Huntington hastalığının moleküler mekanizmasının keşfedilmesi ve olası tedavi yöntemlerinin keşfine yönelik olarak üniversitemizde ve bölümümüzde yapılması planlanan çalışmalara öncülük etmesi için Huntington hücre modelleri geliştirilmiştir.

Nörodejeneratif hastalıklar dünya üzerinde milyonlarca insanı etkileyen geniş bir hastalık grubunu ifade eder. Nedenleri bakımından çeşitlilik ve hastalığa özgün patalojiler gösterebilirler neredeyse tamamı genetik mutasyonlar sonucu doğal yapıları bozulan ve hücre içerisinde birikerek toksik bir etki gösteren mutant proteinler nedeni ile oluşur. Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda genetik probleme ek olarak yaş ve benzeri bir çok başka neden hastalığın patalojisine katkıda bulunarak multifaktöriyel bir sebepler ağı oluşturabilirken, Huntington gibi örneklerde yalnızca tek bir gen üzerinde meydana gelen mutasyon kendi başına hastalığın nedeni olabilir. Nörodejeneratif bozukluklar toksik etkinin meydana geldiği hücre, doku grubuna bağlı olarak, hastalığa özgün farklı fenotipler gösterirler. Bu toksik etki basit hareket bozuklukları, hafıza kaybı, psikiyatrik sorunlar, felç ve hatta ölüme noktalanan bir çok klinik bulguya neden olabilir. Bu nedenle de nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi, tedavisi, ya da seyrinin hafifletilmesi tıp alanında özellikle de son yıllarda üzerine odaklanılan konulardan biri olmuştur. Nörodejeneratif bozuklukların moleküler altyapısının öğrenilmesi ve bu mekanizmanın tamir ya da tedavi edilmesi moleküler tıp biliminin en önemli uğraşlarından biri haline gelmiştir.

Huntington hastalığı (HD), otozomal dominant genetik geçiş gösteren, koretik (titreme,sıçrama) hareket, psikolojik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize bir nörodejeneratif bozukluktur. Huntington'un genetik temeli, 4. Kromozomda bulunan HD geninin ilk ekzonunda bulunan ve glutamin kodlayan CAG kodonunun fazla miktarda tekrar etmesi ile oluşan mutant huntingtin (mHTT) proteininin verdiği nörolojik hasardır.

Literatürde Huntington hücre modelleri oluşturmak adına moleküler klonlama tekniklerinin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Üretilen hücre

modelleri sitoplazmada birikim gösteren mutant huntington proteini ile karakterizedir. Bizde çalışmamızda literatüre benzer ve uyumlu şekilde moleküler klonlama teknikleri uygulayarak Huntington hücre modelleri elde ettik.

Transfeksiyon ve klonlama için pcDNA3.1-GFP isimli memeli ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Bu vektör hücrede mutant protein birikiminin gösterilemesini sağlamak adına gerekli olan floresan ışımaya için yeşil floresan protein (GFP) ile füzyon oluşturulmasına izin vermektedir. 25 CAG tekrarı taşıyan vahşi tip ve 103 CAG tekrar kodonu taşıyan toksik mHTT Exon 1 gen bölgesi vektör üzerinde yer alan çoklu klonlama alanında ki kesim bölgeleri kullanılarak ve GFP ile füzyon bir protein oluşturacak şekilde taşıyıcı vektör üzerine klonlanmıştır. Klonlamanın varlığı agaroz jel üzerinde gösterilmiştir.

Kontrol ve Mutant Htt taşıyan vektörümüz Lipofectamine 3000 transfeksiyon reaktifleri kullanılarak hem HEK 293 hem de SHSY5Y hücre hatlarına transfekte edilmiştir. Hücreler transfeksiyon sonrası üç gün yüksek glikozlu DMEM besiyerinde büyütülmüş ve 24., 48. Ve 72. saatlerde Floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler klonlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve Mutant Htt proteinlerinin oluşturduğu agregatların hücre sitosollerinde biriktiğini göstermiştir. Kontrol grubunda ise herhangi bir birikim olmamış, floresan ışımaya hücre sitosölünde homojen bir şekilde gözlenmiştir.

Huntington ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik çalışmalar yoğun olarak sürmekle birlikte henüz bu hastalıklar için etkili bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Özellikle ülkemizde bu yönde yapılan çalışmaların azlığı bizi bu çalışmayı yapmaya iten ana etken olmuştur. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik olarak son yıllarda geliştirilen özellikle DNA ve RNA temelli yaklaşımlar nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için oldukça umut vericidir. Diğer bir poliQ temelli hastalık olan SMA'nın tedavisinde kullanılan Nusinersen isimli ASO'nun FDA'dan onay alması ve hastalar üzerinde başarılı bir şekilde kullanılması benzeri yaklaşımların Huntington'un da dahil olduğu diğer poliQ hastalıkları için de uygulanabilir olduğunu düşündürmektedir. Son zamanlarda üzerine yoğunlaşılacak diğer bir konu ise ER stresinin Huntington üzerinde ki neden-sonuç ilişkisidir. Bu ilişkiyi

doğru bir şekilde ortaya koyabilmek hastalığın moleküler patalojisini anlamak ve yeni tedaviler önermek için mutlak surette önemlidir. Tüm bunlar göz önüne alındığında Huntington gib nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için moleküler yaklaşımlar geliştirerek özgün çalışmalar üretmek ve hem bilime hem de geliştirilebilecek olası tedaviler ile ülkemize katkıda bulunmak bir zorunluluktur.

Çalışmamız ile birlikte Huntington hücre modellerinin elde edilmesi ve belki de daha önemli olarak doğru şekilde çalışan ve uygulanabilir optimize bir metodun geliştirilmiş olması bu açıdan oldukça önemlidir. Çalışmamızda hem HEK293 gibi genel bir hücre hattı üzerinde hem de bir nöronal hücre hattı olan SHSY5Y üzerinde huntington patalojisine sahip hücre modelleri elde edilmiştir. Özellikle nöroblastoma hücre modelleri kullanılarak yapılacak daha ileri çalışmalar öncelikle hastalığın moleküler mekanizmasını çözmek ve akabinde de yeni tedavi ve terapi yöntemleri önermek için kuvvetli bir ilk adım olmuştur.

Bu yöntem sayesinde bölümümüzde ve ülkemizde yakın gelecekte gerçekleştirilecek gerek Huntington gerekse diğer Nörodejeneratif hastalıklar için benzer modellerin oluşturulması mümkün olacaktır. Hücre modellerinde elde edilecek başarılı çalışmaları hayvan modelleri ve nihai olarak klinik denemeler takip edecektir.

## KAYNAKLAR

- 1) Yousuf O. Ali, Brandon M. Kitay and R. Grace Zhai, (2010). Dealing with Misfolded Proteins:Examining the Neuroprotective Role of Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Molecules*. 8; 15(10): 6859–6887.
- 2) Sarah A. Broadley, F. Ulrich Hartl (2009). The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett*. 20;583(16):2647-53.
- 3) Maria Kon and Ana Maria Cuervo. (2009). Chaperone-mediated Autophagy in Health and Disease. *FEBS Lett*. 2;584(7):1399-404.
- 4) Johanna M. Rose, Sergey S. Novoselov, Philip A. Robinson and Michael E. Cheetham (2009). Molecular chaperone-mediated rescue of mitophagy by a Parkin RING1 domain mutant. *Hum Mol Genet*. 1;20(1):16-27.
- 5) R. Martin Vabulas, Swasti Raychaudhuri, Manajit Hayer-Hartl, (2011). Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Respons. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(12):a004390.
- 6) Wenjie Luo, Anna Rodina and Gabriela Chiosis. (2007). Heat shock protein 90: translation from cancer to Alzheimer's disease treatment? *BMC Neuroscience* 9(Suppl2): S7.
- 7) Bates G, Harper P, Jones L. (2002) Huntington's disease. Oxford, Oxford University press;, 3
- 8) Brinkman RR, Mezei MM, Theilmann J, Almqvist E, Hayden MR. (1997). The likelihood of being affected with Huntington's disease by a particular age, for a specific CAG size. *Am J Hum Genet* ; 60:1202-10.

- 9) Trottier Y, Biancalana V, Mandel JL. (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet* ; 31:377-82.
- 10) Brandt J, Bylsma FW, Gross R, Stine OC, Ranen N, Ross CA. (1996). Trinucleotide repeat length and clinical progression in Huntington's disease. *Neurology* ; 46:527-31.
- 11) Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* ; 87:493-506.
- 12) Bennett CF, Swayze EE. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 50: 259–93.
- 13) Paulsen JS, Butters N., Sadek JR., Johnson SA., Salmon DP., Swerdlow NR., Swenson MR. (1995). Distinct cognitive profiles of cortical and sub-cortical dementia in advanced illness. *Neurology*; 45(5): 951–6.
- 14) de Tommaso M1, Difruscolo O, Sciruicchio V, Specchio N, Livrea P. (1997). Two years follow-up of rivastigmine treatment in Huntington disease. *Clin Neuropharmacol.*; 30(1): 43–6.
- 15) Rot U, Kobal J, Sever A., Pirtosek Z, Mesec A. (2002). Rivastigmine in the treatment of Huntington's disease. *Eur J Neurol.*; 9(6):689–9
- 16) Sešok S., Bolle N., Kobal J., Bucik V., Vodušek DB. (2014). Cognitive function in early clinical phase. Huntington disease after rivastigmine treatment. *Psychiatr Danub.*; 26(3):239–48.

- 17) Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.*; 72(6):971–83.
- 18) Kenney C, Hunter C, Jankovic J. (2007). Long-term tolerability of tetrabenazine in the treatment of hyperkinetic movement disorders. *Mov Disord.*; 22(2):193–7.
- 19) Paulsen JS., Ready RE., Hamilton JM., Mega MS., Cummings JL. (2001). Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*; 71(3):310–4
- 20) Levy ML., Cummings JL., Fairbanks LA., Masterman D., Miller BL., Craig AH., Paulsen JS., Litvan I. (1998). Apathy is not depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*; 10(3):314–9.
- 21) Duff K., Paulsen JS., Beglinger LJ., Langbehn DR., Stout JC. (2007). Predict-HD Investigators of the Huntington Study Group. Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study. *Biol Psychiatry.*; 62(12): 1341–6.
- 22) Como P.G., Rubin A.J., O'Brien C.F., Lawler K., Hickey C., Rubin A.E., Henderson R., McDermott M.P., McDermott M., Steinberg K., Shoulson I. (1997). A controlled trial of fluoxetine in nondepressed patients with Huntington's disease. *Mov Disord.*; 12(3):397
- 23) Beglinger L.J., Adams W.H., Langbehn D., Fiedorowicz J.G., Jorge R., Biglan K., Caviness J., Olson B., Robinson R.G., Kieburtz K., Paulsen JS. (2014). Results of the citalopram to enhance cognition in Huntington disease trial. *Mov Disord.*; 29(3):401–5

- 24) Holl A.K., Wilkinson L., Painold A., Holl E.M., Bonelli RM. (2010). Combating depression in Huntington's disease: effective antidepressive treatment with venlafaxine XR. *Int Clin Psychopharmacol.*; 25(1):46–50.
- 25) Sobczak, K., and Krzyzosiak, W. J. (2004). Patterns of CAG repeat interruptions in SCA1 and SCA2 genes in relation to repeat instability. *Hum. Mutat.* 24, 236–247. doi: 10.1002/humu.20075
- 26) Jayaraman, M., Kodali, R., and Wetzel, R. (2009). The impact of ataxin-1-like histidine insertions on polyglutamine aggregation. *Protein Eng. Des. Sel.* 22, 469–478. doi: 10.1093/protein/gzp023
- 27) Menon, R. P., Soong, D., de Chiara, C., Holt, M. R., Anilkumar, N., and Pastore, A. (2012). The importance of serine 776 in Ataxin-1 partner selection: a FRET analysis. *Sci. Rep.* 2:919. doi: 10.1038/srep00919
- 28) Hageman, J., Rujano, M. A., van Waarde, M. A. W. H., Kakkar, V., Dirks, R. P., Govorukhina, N., et al. (2010). A DNAJB chaperone subfamily with HDAC-dependent activities suppresses toxic protein aggregation. *Mol. Cell.* 37, 355–369. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.001
- 29) Månsson, C., Kakkar, V., Monsellier, E., Sourigues, Y., Härmak, J., Kampinga, H. H., et al. (2013). DNAJB6 is a peptide-binding chaperone which can suppress amyloid fibrillation of polyglutamine peptides at substoichiometric molar ratios. *Cell Stress Chaperones* 19, 227–239. doi: 10.1007/s12192-013-0448-5
- 30) Kakkar V., Meister-Broekema, M., Minoia, M., Carra, S., and Kampinga, H. H. (2014). Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. *Dis. Model. Mech.* 7, 421–434. doi: 10.1242/dmm.014563

- 31) Ellisdon, A. M., Pearce, M. C., and Bottomley, S. P. (2007). Mechanisms of ataxin-3 misfolding and fibril formation: kinetic analysis of a disease-associated polyglutamine protein. *J. Mol. Biol.* 368, 595–605. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.058
- 32) Kelley, N. W., Huang, X., Tam, S., Spiess, C., Frydman, J., and Pande, V. S. (2009). The predicted structure of the headpiece of the huntingtin protein and its implications on huntingtin aggregation. *J. Mol. Biol.* 388, 919–927. doi: 10.1016/j.jmb.2009.01.032
- 33) Tam S., Spiess, C., Auyeung W., Joachimiak L., Chen B., Poirier M.A., (2009). The chaperonin TRiC blocks a huntingtin sequence element that promotes the conformational switch to aggregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1279–1285. doi: 10.1038/nsmb.1700
- 34) Saunders H. M., Gilis, D., Rooman M., Dehouck Y., Robertson A. L., and Bottomley S. P. (2011). Flanking domain stability modulates the aggregation kinetics of a polyglutamine disease protein. *Protein Sci.* 20, 1675–1681. doi: 10.1002/pro.698
- 35) Ellisdon A. M., Thomas B., and Bottomley S. P. (2006). The two-stage pathway of ataxin-3 fibrillogenesis involves a polyglutamine-independent step. *J. Biol. Chem.* 281, 16888–16896. doi: 10.1074/jbc.M601470200
- 36) Dehay B., and Bertolotti A. Critical role of the proline-rich region n Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J. Biol. Chem.* 281, 35608–35615. doi: 10.1074/jbc.M605558200
- 37) Rockabrand E., Slepko N., Pantalone A., Nukala V. N., Kazantsev A., Marsh, J. L. (2009). The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet.*; 16, 61–77. doi: 10.1093/hmg/ddl440

- 38) Thakur A. K., Jayaraman M., Mishra R., Thakur M., Chellgren V. M., Byeon I.-J. L. (2009). Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.*; 16, 380–389.
- 39) Crick, S. L., Ruff, K. M., Garai, K., Frieden, C., and Pappu, R. (2013). Unmasking the roles of N- and C-terminal flanking sequences from exon 1 of huntingtin as modulators of polyglutamine aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 110, 20075–20080. doi: 10.1073/pnas.1320626110
- 40) Liebman, S. W., and Meredith, S. C. (2010). Protein folding: sticky N17 speeds huntingtin pile-up. *Nat. Chem. Biol.* ; 6, 7–8. doi: 10.1038/nchembio.279
- 41) Monsellier, E., Redeker, V., Ruiz-Arlandis, G., Bousset, L., and Melki, R. (2015). Molecular interaction between the chaperone Hsc70 and the N-terminal flank of huntingtin exon 1 modulates aggregation. *J. Biol. Chem.*; 290, 2560–2576.
- 42) Sahoo, B., Arduini, I., Drombosky, K. W., Kodali, R., Sanders, L. H., Greenamyre, J. T., et al. (2016). Folding landscape of mutant huntingtin Exon1: diffusible multimers, oligomers and fibrils, and no detectable monomer. *PLoS ONE* 11:e0155747. doi: 10.1371/journal.pone.0155747
- 43) Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K. (1998). Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat. Genet.*; 18, 150–154. doi: 10.1038/ng0298-150
- 44) Matos, C. A., de Almeida, L. P., and Nóbrega, C. (2012). Proteolytic cleavage of polyglutamine disease-causing proteins: revisiting the toxic fragment hypothesis. *Curr. Pharm. Des.*; 22. doi: 10.2174/1381612822666161227121912

- 45) Ona, V. O., Li, M., Vonsattel, J. P., Andrews, L. J., Khan, S. Q., Chung, W. M. (1999). Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature*; 263–267. doi: 10.1038/20446
- 46) Aharony, I., Ehrnhoefer, D. E., Shruster, A., Qiu, X., Franciosi, S., Hayden, M R., et al. (2015). A Huntingtin-based peptide inhibitor of caspase-6 provides protection from mutant Huntingtin-induced motor and behavioral deficits. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2604–2614. doi: 10.1093/hmg/ddv023.
- 47) Chen, M., Ona, V. O., Li, M., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., et al. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 6, 797–801. doi: 10.1038/80538
- 48) Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., et al. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125, 1179–1191. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.026
- 49) Sawa, A., Nagata, E., Sutcliffe, S., Dulloor, P., Cascio, M. B., Ozeki, Y., et al. (2005). Huntingtin is cleaved by caspases in the cytoplasm and translocated to the nucleus via perinuclear sites in Huntington's disease patient lymphoblasts. *Neurobiol. Dis.* 20, 267–274. doi: 10.1016/j.nbd.2005.02.013
- 50) Maglione, V., Cannella, M., Gradini, R., Cislighi, G., and Squitieri, F. (2006). Huntingtin fragmentation and increased caspase 3, 8 and 9 activities in lymphoblasts with heterozygous and homozygous Huntington's disease mutation. *Mech. Ageing Dev.* 127, 213–216. doi: 10.1016/j.mad.2005.09.011
- 51) Luo, S., Vacher, C., Davies, J. E., and Rubinsztein, D. C. (2005). Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications

for mutant huntingtin toxicity. *J. Cell Biol.* 169, 647–656. doi: 10.1083/jcb.200412071

52) Warby, S. C., Doty, C. N., Graham, R. K., Shively, J., Singaraja, R. R., and Hayden, M. R. (2009). Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 121–127. doi: 10.1016/j.mcn.2008.09.007

53) Humbert, S., Bryson, E. A., Cordelie, F. P., Connors, N. C., Datta, S. R., Finkbeiner, S., et al. (2001). The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev. Cell.* 2, 831–837. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00188-0

54) Aiken, C. T., Steffan, J. S., Guerrero, C. M., Khashwji, H., Lukacsovich, T., Simmons, D., et al. (2009). Phosphorylation of threonine 3: implications for huntingtin aggregation and neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 284, 29427–29436. doi: 10.1074/jbc.M109.013193

55) E. F. E. Kuiper, Eduardo P. de Mattos, Laura B. Jardim, Harm H. Kampinga and Steven Bergink. (2017). Chaperones in Polyglutamine Aggregation: Beyond the Q-Stretch *Frontiers in Neuroscience Mini Review* doi: 10.3389/fnins.2017.00145

56) Sathasivam K, Neueder A, Gipson TA. (2013). Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 110: 2366–70.

57) Wild EJ, Tabrizi SJ. (2014). Premanifest and early Huntington's disease In: Bates G, Jones L, Tabrizi SJ, eds. *Huntington's Disease*. 4th edn. Oxford: Oxford University Press.

58) Finkel RS., Chiriboga CA., Vajsar J., Day JW., Montes J., De Vivo DC., Yamashita M., Rigo F., Hung G., Schneider E., Norris DA., Xia S., Bennett

CF., Bishop KM. (2016). Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet*; 388: 3017–26.

59) US Food and Drug Administration. (2016). FDA approves first drug for spinal muscular atrophy. [Http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm534611.htm](http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm534611.htm) (accessed May 21, 2017).

60) Edward J. Wild, Sarah J. Tabrizi. (2017). Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's Disease. *Lancet Neurol.*; 16:837-847

61) Larrouy B., Blonski C., Boiziau C., Stuer M., Moreau S., Shire D., Toulmé JJ. (1992). RNase H-mediated inhibition of translation by antisense oligodeoxyribonucleotides: use of backbone modification to improve specificity. *Gene*; 121: 189–94.

62) Hutvagner G, Simard MJ. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 9: 22–32.

63) Kordasiewicz HB., Stanek LM., Wancewicz EV., Mazur C., McAlonis MM., Pytel KA., Artates JW., Weiss A., Cheng SH., Shihabuddin LS., Hung G., Bennett CF., Cleveland DW. (2012). Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of Huntingtin synthesis. *Neuron*; 74: 1031–44.

64) Keiser MS, Kordasiewicz HB, McBride JL. (2016). Gene suppression strategies for dominantly inherited neurodegenerative diseases: lessons from Huntington's disease and spinocerebellar ataxia. *Hum Mol Genet.*; 25 (suppl R1): R53–64.

- 65) Bennett CF, Swayze EE. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 50: 259–93.
- 66) Leavitt B, Tabrizi S, Kordasiewicz H., Landwehrmayer B., Henry S., Zanzi T., Swayze E., Norris D., Smith A., Lane R., Bennett F. (2016). Discovery and early clinical development of ISIS-HTTRx, the first HTT-lowering drug to be tested in patients with Huntington's disease. *Neurology* 2016; 86 (suppl 16): PL1.002 (abstr).
- 67) Miller TM., Pestronk A., David W., Rothstein J., Simpson E., Appel SH., Andres PL., Mahoney K., Allred P., Alexander K., Ostrow LW., Schoenfeld D., Macklin EA., Norris DA., Manousakis G., Crisp M., Smith R., Bennett CF., Bishop KM., Cudkovic ME. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol.*; 12: 435–42.
- 68) Aisen P. (2015). A Phase II trial of AAV2-NGF in mild to moderate Alzheimer's disease. *J Prev Alzheimers Dis*; 10: 274–75.
- 69) McBride JL., Pitzer MR., Boudreau RL., Dufour B., Hobbs T., Ojeda SR., Davidson BL. (2015). Preclinical safety of RNAi-mediated HTT suppression in the Rhesus macaque as a potential therapy for Huntington's disease. *Mol Ther*; 19: 2152–62
- 70) Klug A. (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem*; 79: 213–31.
- 71) Zeitler B, Froelich S, Yu Q, Pearl J., Paschon DE., Miller JC., Li D., Marlen K., Guschin D., Zhang L., Mendel M., Munoz-Sanjuan I., Rebar EJ., Urnor FD., Gregory PD., Zhang HS., (2014). Allele-specific repression of mutant Huntingtin expression by engineered zinc finger transcriptional repressors as

a potential therapy for Huntington's disease. *Mol Ther*; 22 (suppl 1): S233 (abstr).

- 72) Garriga-Canut M., Agustín-Pavón C., Herrmann F., Sánchez A., Dierssen M., Fillat C., Isalan M. (2012). Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 109: E3136–45.
- 73) Savić N, Schwank G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl Res*; 168: 15–21.
- 74) Yuwei Jiang, Sarah R. Chadwick, Patrick Lajoie. (2016) Endoplasmic Reticulum Stress: The Cause and Solution to Huntington's Disease ?. *Brain Research* 1648 2016; 650-657.
- 75) Ron, D., Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*; 8, 519–529.
- 76) Walter, P., Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*; 334, 1081–1086.
- 77) Hetz, C., Glimcher, L.H. (2011). Protein homeostasis networks in physiology and disease. *Curr. Opin. Cell. Biol.*; 23, 123–125.
- 78) Hetz, C.A., Soto, C. (2006). Stressing out the ER: a role of the unfolded protein response in prion-related disorders. *Curr. Mol. Med.*; 6, 37–43
- 79) Scheper, W., Hoozemans, J.J. (2009). Endoplasmic reticulum protein quality control in neurodegenerative disease: the good, the bad and the therapy. *Curr. Med. Chem.*; 16, 615–626.
- 80) Torres, M., Matamala, J.M., Duran-Aniotz, C., Cornejo, V.H., Foley, A., Hetz, C. (2015). ER stress signaling and neurodegeneration: at the

intersection between Alzheimer's disease and Prion-related disorders. *Virus Res.* 2015; 207, 69–75.

- 81) Vidal, R., Caballero, B., Couve, A., Hetz, C. (2011). Converging pathways in the occurrence of endoplasmic reticulum (ER) stress in Huntington's disease. *Curr. Mol. Med.*; 11, 1–12
- 82) Vidal, R.L., Figueroa, A., Court, F.A., Thielen, P., Molina, C., Wirth, C., Caballero, B., Kiffin, R., Segura-Aguilar, J., Cuervo, A.M., Glimcher, L.H., Hetz, C. (2012). Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21, 2245–2262.
- 83) Vidal, R.L., Hetz, C. (2012). Crosstalk between the UPR and autophagy pathway contributes to handling cellular stress in neurodegenerative disease. *Autophagy*; 8, 970–972.
- 84) Yang, F., Luo, J. (2015). Endoplasmic reticulum stress and ethanol neurotoxicity *Biomolecules*; 5, 2538–2553.
- 85) Schönthal, A.H. (2012). Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica*; 857516.
- 86) Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* ; 13, 89–102
- 87) Duennwald, M.L., Lindquist, S. (2008). Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Genes Dev.*; 22, 3308–3319.

- 88) Yang, H., Liu, C., Zhong, Y., Luo, S., Monteiro, M.J., Fang, S., (2010). Huntingtin interacts with the cue domain of gp78 and inhibits gp78 binding to ubiquitin and p97 VCP. *PLoS One*; 5, e8905.
- 89) Leitman, J., Ulrich Hartl, F., Lederkremer, G.Z. (2013). Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat. Commun.*; 4, 2753
- 90) Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*; 431, 805–810.
- 91) Lajoie, P., Snapp, E.L. (2010). Formation and toxicity of soluble polyglutamine oligomers in living cells. *PLoS One*; 5, e15245.
- 92) Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., Cuervo, A.M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat. Neurosci.*; 13, 567–576.

## HAM VERİLER



**FORMLAR**



## ETİK KURUL KARARI



## PATENT HAKKI İZİNİ



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖRODEJENARİTİF HASTALIKLARIN TEDAVİSİ  
ÇALIŞMALARINDA KULLANILMAK ÜZERE  
HUNTINGTON HÜCRE HATTI MODELLERİNİN  
ÜRETİLMESİ

DOKTORA

HALUK CAMCI

DOÇ. DR. ÜMİT ŞAKİR ZEYBEK

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2018

## Nörodejenaritif Hastalıkların Tedavisi Çalışmalarında Kullanılmak Üzere Huntington Hücre Hattı Modellerinin Üretilmesi

### ORJİNALLIK RAPORU

% <b>1</b> BENZERLİK ENDEKSİ	% <b>1</b> İNTERNET KAYNAKLARI	% <b>1</b> YAYINLAR	% ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
---------------------------------	--------------------------------------	------------------------	-----------------------

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://thejns.org">thejns.org</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>2</b>	<a href="http://www.frontiersin.org">www.frontiersin.org</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>3</b>	Jiang, Yuwei, Sarah R. Chadwick, and Patrick Lajoie. "Endoplasmic reticulum stress: The cause and solution to Huntington's disease?", <i>Brain Research</i> , 2016. Yayın	<% <b>1</b>
<b>4</b>	Mark A. Behlke. "Chemical Modification of siRNAs for <i>In Vivo</i> Use", <i>Oligonucleotides</i> , 12/2008 Yayın	<% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://www.ci-naps.fr">www.ci-naps.fr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	Tian, Wei, Chengcheng Zhao, Qingchuang Hu, Jianjun Sun, and Xiuli Peng. "Roles of Toll-like	<% <b>1</b>

receptors 2 and 6 in the inflammatory response to *Mycoplasma gallisepticum* infection in DF-1 cells and in chicken embryos", *Developmental & Comparative Immunology*, 2016.

Yayın

7	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	<% 1
	İnternet Kaynağı	
8	Kampinga, Harm H, and Steven Bergink. "Heat shock proteins as potential targets for protective strategies in neurodegeneration", <i>The Lancet Neurology</i> , 2016.	<% 1
	Yayın	
9	<a href="http://fac.org.ar">fac.org.ar</a>	<% 1
	İnternet Kaynağı	

Alıntıları çıkart  
Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde  
üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	HALUK	<b>Soyadı</b>	CAMCI
<b>Doğ.Yeri</b>	KARTAL/İSTANBUL	<b>Doğ.Tar.</b>	21.03.1982
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	15268484288
<b>Email</b>	<a href="mailto:halukcamci@yahoo.com.tr">halukcamci@yahoo.com.tr</a>	<b>Tel</b>	0 535 558 55 09

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	Gebze Yüksek Teknoloji Üniversitesi	2011
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2006
<b>Lise</b>	Kartal Süleyman Demirel Lisesi	1999

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Müdür	EK-İM İç ve Dış Tic. Ltd. Şti.	2011-
2.	Satış Temsilcisi	EK-İM İç ve Dış Tic. Ltd. Şti.	2005-2011
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi		72

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	İyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Sinema, Edebiyat, Futbol, Tenis

