T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

VİTAMİN D'NİN AKSON GELİŞİMİNDE VE REJENERASYONUNDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ

EBRU KESKİN

DANIŞMAN
Prof. Dr.ERDİNÇ DURSUN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Doktora Programı

Haziran, 2025

TEZ KABUL VE ONAYI

Ebru KESKİN tarafından, **Prof. Dr. Erdinç DURSUN** danışmanlığında hazırlanan VİTAMİN D'NİN AKSON GELİŞİMİNDE VE REJENERASYONUNDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **27/06/2025** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Erdinç DURSUN İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Sinirbilim Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Duygu GEZEN-AK İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Sinirbilim Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. İbrahim Hakan GÜRVİT İstanbul Üniversitesi Nöroloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Selma Yılmazer Haliç Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları 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 haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

EBRU KESKİN

Annem, babam ve rahmetli olan dedem Muzaffer PABUÇCU'YA ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

VİTAMİN D'NİN AKSON GELİŞİMİNDE VE REJENERASYONUNDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK) 123S438 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ile başlayıp doktora süresince de devam etmek üzere tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan ve yönlendiren, tüm zorluklar karşısında beni yüreklendiren, karşıma çıkan her türlü sorunda çözüm yolu gösteren hiçbir zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen, akademik kişiliği, çalışma prensipleri ve başarılarıyla bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Erdinç DURSUN'a gerek eğitimim gerekse tezimde bilgileriyle beni her zaman aydınlatan ve yol gösteren, bana her türlü konuda yardım eden Prof. Dr Duygu GEZEN AK'a katkıları ve çalışmamda desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, beni her durumda motive eden, çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen, dostluğu ve yardım severliği ile bulunmaz bir çalışma arkadaşları olan Dr.Öğr. Üyesi Merve ALAYLIOĞLU ve Dr.Öğr. Üyesi Büşra ŞENGÜL YEDİEL'e, MSc. Pelin SORDU, MSc. Zuhal YURTTAŞ, MSc. Bilgenur BİLGE'ye ve tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım MSc.Tugay ÇAMOĞLU , MSc. Barış BİTMEZ, MSc. Seçil DÜLGER, BSc. Rümeysa ÖZBEN, BSc. Barışcan ÜNAL, BSc. Muhammed Furkan AÇIK'A teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, manevi ve maddi olarak her konuda desteğini benden esirgemeyen, her türlü zorluğa karşı beni koruyup kollayan, sevgilerini ve inançlarını tüm kalbimle hissettiğim sevgili annem Birgül KESKİN ve sevgili babam Muhammer KESKİN'e, en sıkıntılı anlarımda yanımda olan ve beni güldürmeyi başaran kardeşlerim Pınar SARIMEŞE ve Damla ARSLAN'a bana hep inanan ve yanımda olan teyzelerim Emel PABUÇCU'ya ve Canan GÜNEY'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2025 Ebru KESKİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**

BEYAN ..... **iii**

BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**

TEŞEKKÜR ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **xi**

TABLO LİSTESİ ..... **xv**

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xvi**

ÖZET ..... **xx**

ABSTRACT ..... **xxii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **4**

2.1. SİNİR SİSTEMİNİN BİLEŞENLERİ *4*

2.1.1. Nöral gelişim 4

2.2. Nöral polarite *5*

2.2.1. Başlangıç polaritesinin oluşturulması 6

2.3. Nöronlarda mikrotübüllerin yapısı ve organizasyonu *10*

2.4. Hücrelerde dinamik mikrotübüllerin gözlemlenmesi *12*

2.5. Akson ve dendritlerde mikrotübül organizasyonu *13*

2.6. Tirozinasyon / detirozinasyon döngüsü ve nöron farklılaşması *15*

2.7. Mikrotübül ilişkili proteinlerin sınıflandırılması *16*

2.8. Nöronlarda mikrotübül stabilitesini etkileyen faktörler *16*

2.9. Mikrotübül uç izleme proteinleri *17*

2.10. Mikrotübül fonksiyonları *19*

2.11. Aksonal dejenerasyon *20*

2.12. Merkezi sinir sistemi ve periferal sinir sisteminde rejenerasyon *20*

2.12.1. Akson rejenerasyonunda içsel faktörlerin rolü 22
2.12.2. Akson rejenerasyonunda dışsal faktörlerin rolü 29

2.13. Rejenerasyon ile ilişkili sinyal yolakları *29*
2.13.1. Akson rejenerasyonunda MAPK sinyalizasyonu 30

2.14. Vitamin D (1,25 dihidroksivitamin-D3) *35*
2.14.1. Vitamin D metabolizması 36
2.14.2. Vitamin D Reseptörü (VDR) 37
2.14.3. Vitamin D'nin sinir sitemi üzerine etkileri 38
2.14.4. Vitamin D'nin rejenerasyon ile ilişkisi 39

2.15. Primer Nöron Kültürü *40*

3. YÖNTEM 42

3.1. Primer Nöron Kültürünün Hazırlanması *42*
3.1.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Embriyoların Eldesi 42
3.1.2. Petrilerin hazırlanması 42
3.1.3. Leibovitz 15 + (L-15+) medyumunun hazırlanması 43
3.1.4. Nörobazal + (NBM+) medyumunun hazırlanması 44
3.1.5. Serebral korteks diseksiyonu 44
3.1.6. Primer kortikal nöron kültürünün hazırlanması 44
3.1.7. Hemasitometri ile hücre sayımı 45
3.1.8. Ekimi yapılan primer nöronların olgunlaşması 46
3.1.9. Kültürdeki hücrelerin nöron/glia ayrımının yapılması 46

3.2. Primer kortikal nöron kültüründe gerçekleştirilen uygulamalar *47*
3.2.1. 1,25 α-dihidroksivitamin D3 (Vitamin D) uygulamaları 47
3.2.2. Plazmid ile transdüksiyonun gerçekleştirilmesi 47
3.2.3. Lentiviral partikül üretimi için transfeksiyon protokolü 50
3.2.4. Primer nöron kültüründe lentiviral transdüksiyon protokolü 51
3.2.5. Akson dejenenerasyon modelinin oluşturulması 52

3.3. Primer kortikal nöron kültürü deney grupları *53*
1)Vitamin D'nin nöron gelişimi üzerindeki etkisini araştırdığımız deney grupları 53

3.4. Gelişim döneminde nörit gelişiminin canlı hücre görüntüleme ile gösterilmesi *54*

3.5. Kültür hücrelerinden total protein izolasyonu *55*

3.6. Western Blot deneyi *55*
3.6.1. Proteinlerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi 56
3.6.2. Primer ve sekonder antikor ile işaretleme 57

3.7. Çift immün floresan işaretleme deneyleri *57*

3.8. Immunpresipitasyon deneylerinin gerçekleştirilmesi *59*
3.8.1. Hücre lizatlarının hazırlanması 59
IP lizis tamponu aşağıdaki gibi hazırlandı. 59
3.8.2. Dynabead-antikor kompleksinin hazırlanması 60
3.8.3. Elüsyon protokolü 61
3.8.4. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi 61

3.9. Sitotoksisite ölçümü *61*

3.10. İstatistiksel analiz *62*

4. BULGULAR 64

4.1. Primer kortikal nöronların morfolojik ve mikroskopik değerlendirmesi *64*

A. MAP2, GFAP ve DAPI ile nöronların çakıştırılmış hali gösterilmektedir. Büyütme: 20X. B MAP2 işaretlemesi gösterilmektedir. Büyütme 60X. C. MAP2, GFAP ve DAPI ile nöronların çakıştırılmış hali gösterilmektedir. Büyütme 60X. *66*

4.2. Sitotoksite ölçüm sonuçları *66*

4.2.1. Primer kortikal nöron kültürü sitotoksisite ölçüm sonuçları 66

Primer kortikal nöron kültürüne 24, 48,72, 96, 120 ve 144 saat süreyle yapılan 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamaları sonucu ortaya çıkabilecek sitotoksik etki, kültür ortamına salınan LDH miktarı ölçülerek saptandı. Grupların LDH salınım miktarlarındaki değişiklikler Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te gösterilmiştir. 66

4.3. Canlı hücre görüntüleme deneylerinin sonuçları *67*

4.3.1. Vitamin D uygulamalarının ilk 30 dakika içinde nörit uzunluğu ve uzama hızı üzerine etkisinin gösterilmesi 67

4.3.2. Vitamin D uygulamalarının ilk 12 saat içinde nörit uzunluğu ve uzama hızı üzerine etkisinin gösterilmesi 69

4.4. Western Blot analizi ile saptanan protein ekspresyon sonuçları *71*

4.4.1. Gelişim aşamasındaki bir nöronda vitamin D uygulamalarına bağlı olarak protein ekspresyon seviyesindeki değişimler 71

4.4.2. Olgun bir nöronda akson hasarı sonrasında vitamin D uygulamalarına bağlı olarak protein ekspresyon seviyesindeki değişimler 79

4.5. İmmunfloresan işaretleme sonuçları *81*

4.5.1. Gelişim aşamasındaki bir nöronda vitamin D uygulamalarına bağlı olarak GAP 43 ve STMN2 proteinlerinin immun floresan işaretleme ile gösterilmesi 81

4.5.2. Gelişim aşamasındaki bir nöronda dinamik mikrotübül yoğunluğunun gösterilmesi 85

4.5.3. Akson hasarı sonrasında rejenerasyon ile ilişkili proteinlerin seviyesinin gösterilmesi. 92

4.6. VDR Immunpresipitasyon (VDR-IP) deneylerinin sonuçları *97*

4.6.1. Uygulamalardan 30 dk sonra gerçekleştirilen VDR-IP deneyinin sonuçları 98

4.6.2. Uygulamalardan 12 saat sonra gerçekleştirilen VDR-IP deneyinin sonuçları 99

5. TARTIŞMA **100**

6. SONUÇ VE ÖNERİLER **109**

KAYNAKLAR **111**

EKLER **130**

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI **131**

ETİK KURUL İZİN YAZISI **132**

KURUM İZNİ YAZILARI **133**

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 16.09.2021-473019



Sayın Doç. Dr. Erdinç DURSUN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Karar No:2021/25

Başvuru : 22.06.2021/ 252213

Toplantı Tarihi : 13.09.2021

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen "Vitamin D'nin Akson Gelişiminde ve Rejenerasyonundaki Rolünün İncelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna oy çokluğuyla karar verilmiştir.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	16 Günlük Hamile Dişi
	Sayısı	1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		22.11.2021/22.11.2024

Prof. Dr. Ufuk KOLAK Başkan	Prof. Dr. Alper OKYAR Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL Üye **(Toplantıya katılmadı)**
Prof. Dr. Büket AYBAR Üye	Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR Üye	Prof. Dr. Uğur AKSU Üye
Doç. Dr. Aygül EKİCİ Üye	Dr. Öğr. Üyesi Aydın ÇEVİK Üye	Arş. Gör. Dr. Gül BAKIRER ÖZTÜRK Üye
Mak.Yük.Müh.Dr.Burak OLGUN Üye **(Toplantıya katılmadı)**	Av. Selma DEMİR Üye **(Toplantıya katılmadı)**	

..... 134

PATENT HAKKI İZNİ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖZGEÇMİŞ **135**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2-1. Nöronal polarizasyonun evreleri [29]. 6

Şekil 2-2. Memeli hücre kültüründe nöral polarizasyon [38]. 7

Şekil 2-3. Korteks gelişimi sırasında, nöronal polarizasyon radyal migrasyonla eşzamanlı bir şekilde ilerler [29]. 9

Şekil 2-4. Nöron hasarını takiben proksimal segmentin hücresel yanıtları [180]. 22

Şekil 2-5. İçsel rejeneratif kontrol basamaklarının farklı yönlerini hedefleyen rejeneratif stratejilerin geliştirilmesi [178]. 24

Şekil 2-6. Büyüme ile ilişkili moleküllerin aksonal taşınmasındaki değişiklikler [1]. 25

Şekil 2-7. DLK yolağı, memeli nöronlarında çelişkili yanıtları düzenlemektedir [235]. 32

Şekil 2-8. DLK'nin aktivasyonuna yol açan aksonal stres faktörleri [241]. 33

Şekil 3-1. Plazmid DNA'larının agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi. 50

Şekil 3-2. Kortikal nöron kültüründe MAPRE3-GFP transdüksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin gösterilmesi. 52

Şekil 4-1. 7 günlük primer kortikal nöron kültüründe nöronlar ve glia hücreleri gösterilmektedir. 65

Şekil 4-2.Primer nöron kültürü uygulamalarından 24,48,72 saat sonra deney gruplarının LDH salınma yüzdeleri. 66

Şekil 4-3. Primer nöron kültürü uygulamalarından 24,48,72 saat sonra deney gruplarının LDH salınma yüzdeleri. 67

Şekil 4-4. Vitamin D ve etanol uygulamalarına bağlı olarak ilk 30 dakika içinde nöronların faz kontrast mikroskobunda takibinin gösterilmesi. 68

Şekil 4-5. Vitamin D uygulamasının ilk 30 dakikası içinde nörit uzunluğu ve nörit uzama hızının gösterilmesi. 69

Şekil 4-6. Vitamin D ve etanol uygulamalarına bağlı olarak ilk 12 saat içinde nöronların faz kontrast mikroskobunda takibinin gösterilmesi. 70

Şekil 4-7.Vitamin D uygulamasının ilk 12 saatinde nörit uzunluğu ve nörit uzama hızının gösterilmesi. 71

Şekil 4-8. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında DLK protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. 72

Şekil 4-9. Vitamin D uygulamaları sonucu DLK protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 72

Şekil 4-10. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında DCX protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. 73

Şekil 4-11. Vitamin D uygulamaları sonucu DCX protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 74

Şekil 4-12. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında pDCX protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. 75

Şekil 4-13. Vitamin D uygulamaları sonucu pDCX protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 75

Şekil 4-14. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında 14-3-3 zeta/delta protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. 76

Şekil 4-15. Vitamin D uygulamaları sonucu 14-3-3 zeta/delta protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 76

Şekil 4-16. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında GAP43 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. 77

Şekil 4-17. Vitamin D uygulamaları sonucu GAP-43 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 77

Şekil 4-18. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında STMN2 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. 78

Şekil 4-19. Vitamin D uygulamaları sonucu STMN2 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 78

Şekil 4-20. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında GAP43 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. 79

Şekil 4-21. Vitamin D uygulamaları sonucu GAP43 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler. 79

Şekil 4-22. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında GAP43 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü. 80

Şekil 4-23. Vitamin D uygulamaları sonucu STMN2 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler 80

Şekil 4-24. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 24 saat sonra GAP43 ve STMN2 proteinlerinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 81

Şekil 4-25. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 48 saat sonra GAP43 ve STMN2 proteinlerinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 82

Şekil 4-26. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 72 saat sonra GAP43 ve STMN2 proteinlerinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 83

Şekil 4-27. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 120 saat sonra GAP43 ve STMN2 proteinlerinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi 84

Şekil 4-28. Uygulamalardan 30 dakika sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 85

Şekil 4-29. Uygulamalardan 1 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 87

Şekil 4-30. Uygulamalardan 2 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 87

Şekil 4-31. Uygulamalardan 12 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 88

Şekil 4-32. Uygulamalardan 24 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 89

Şekil 4-33. Uygulamalardan 48 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 90

Şekil 4-34. Uygulamalardan 72 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 91

Şekil 4-35. Akson hasarından 24 saat sonra GAP43 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi 92

Şekil 4-36. Akson hasarından 48 saat sonra GAP43 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi 93

Şekil 4-37. Akson hasarından 72 saat sonra GAP43 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 94

Şekil 4-38. Akson hasarından 24 saat sonra STMN2 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 95

Şekil 4-39. Akson hasarından 48 saat sonra STMN2 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi. 96

Şekil 4-40. Akson hasarından 72 saat sonra STMN2 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi 97

Şekil 4-41. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 30 dk sonra gerçekleştirilen VDR Co-IP Deneyleri 98

Şekil 4-42. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 12 saat sonra gerçekleştirilen VDR Co-IP Deneyleri. 99

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3-1. Luria-Bertani (LB) ve LB-Agar hazırlama protokolü 47

Tablo 3-2.Western Blot'ta kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları 55

Tablo 3-3. Western Blot'ta kullanılan sekonder antikorlar ve seyreltme oranları 56

Tablo 3-4. IP lizis tamponunun hazırlanması 59

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

Δ2 : Delta 2
α : alpha
β : beta
γ : gamma
ε : epsilon
ζ : zeta
η : eta
τ : tau
σ : sigma

Kısaltmalar **Açıklama**

1,25(OH2)D3 : Vitamin D, 1,25-dihidroksivitamin-D3, Vitamin D3, kalsitriol, 1α-25 dihidroksi D3
25-OHD : 25-hidroksivitamin D3
25-OHD-1α-hidroksilaz : 25-hidroksivitamin D3-1 alfa-hidroksilaz
+TIP : Artı uç izleme proteini
−TIP'ler : Eksi uç izleme proteini
AH : Alzheimer Hastalığı
ALS : Amiyotrofik Lateral Skleroz
Aβ : Amiloid beta
BDNF : Beyin kökenli sinir faktörü
cAMP : Siklik adenozin monofosfat
CEBP-1 : CAAT/Enhancer Bağlayıcı Proteini 1
CSPG : Kondroitin sülfat proteoglikanlar

DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DCX	: Doublecortin
DEAE	: Dietilaminoetil
dKO	: Çift knockout
DLK	: Çift lösin kinaz
DRG	: Dorsal kök gangliyonu
E16	: 16.embriyonik gün
EB	: Uç bağlama
GAP43	: Büyüme ile ilişkili protein 43
GDNF	: Glial hücre kökenli nörotrofik faktör
GDP	:Guanozin difosfatı
GTP	:Guanozin trifosfatı
IZ	: Ara bölge
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentazın
JNK	: c-JUN N terminal kinaz
KO	: Knockout
LC/MS	: Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre
LZK	: Lösin fermuarı taşıyan kinaz
MAG	: Miyelin oluşturan glialar
MAP	: Mikrotubul ilişkili protein
MAP1B	: Mikrotubul ilişkili protein 1B
MAP2B	: Mikrotubul ilişkili protein 2B
MAPK	: Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz
MAPKK	: Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz Kinaz
MEM	: Minimum esansiyel medyumu
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MT	: Mikrotübül
mtDNA	: Mitokondriyal DNA'ya
MTOC	: Mikrotübül organizasyon merkezİ
NBM	: Nörobazal medyum
NGF	: Sinir büyüme faktörü

NH	: Nörodejeneratif hastalık
NT3	: Nörotrofin 3
OMgp	: Oligodendrosit miyelin glikoproteini
pDCX	: Fosforile Doublecortin
PDIA3	: Protein disülfit izomeraz ailesi A üyesi 3
PH	: Parkinson Hastalığı
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PKA	: Proteşn kinaz A
PKCaMII	: Ca^{2+}/kalmodulin-bağımlı protein kinaz
PLA2	: Fosfolipaz A2
PLC	: Fosfolipaz C
PSS	: Periferik sinir sistemi
PTM	: Post-translasyonel modifikasyonlara
RGC	: Radial glia hücreleri
RGH	: Retina gangliyon hücreleri
RxR	: Retinoik asit reseptörü
S/T-P	: Serin/Treonin-Prolin
SCG10	: Superior servikal ganglion 10
STAT3	: Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
SVZ	: Subventriküler zonda
TCP.	: Tubulin Tirozin Ligaz
TFAM	: Transkripsiyon faktörü A mitokondriyal
TGF-beta	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TTL.	: Tubulin Tirozin Ligaz
UVB	: Ultraviyole B
VDBP	: Vitamin D bağlayıcı proteini
VDR	: Vitamin D reseptörü
VDRE	: Vitamin D cevap elementi
VZ	: Ventriküler zon

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

TTL : Tubulin Tirozin Ligaz

TIP : Uç izleme proteinlerini

EB : Uç bağlama

CH : Calponin homoloji

ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[VİTAMİN D'NİN AKSON GELİŞİMİNDE VE REJENERASYONUNDAKİ ROLÜNÜN İNCELENMESİ]

[EBRU KESKİN]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Doktora Programı

[Danışman : Prof. Dr. Erdinç DURSUN]

[Merkezi sinir sisteminde akson rejenerasyonunun kontrolü nörobiyolojide çözülmemiş bir sorun olarak kalmıştır. Primer nöron kültürü, nöronal polarizasyon, nörit büyümesi, akson rehberliği (yol bulma), sinaptogenez ve nöronal ağ oluşumu gibi MSS gelişiminin yanı sıra nöronal olgunlaşma ve fonksiyonel aktiviteyi incelemek için altın standart olarak kabul edilmektedir. Literatürde vitamin D'nin MSS'de akson rejenerasyonu üzerine etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Uygun nörotrofik faktörler ile akson ve nöronların uyarılması yoluyla MSS aksonlarının rejenerasyonunun bir dereceye kadar teşvik edilebildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda primer nöron kültüründe nöronların olgunlaşma sürecini temsil eden kültürün 1. ile 7. günleri arasında vitamin D'nin nöronal gelişim üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.Vitamin D'nin rejeneratif süreçler üzerindeki etkisi ise, 7. günden itibaren olgun nöron fenotipi kazanan ve yetişkin nöronlarla benzer özellikler sergileyen hücreler üzerinde incelenmiştir. Bu doğrultuda elde ettiğimiz sonuçlar; nöronal gelişim sürecinde uygulanan vitamin D'nin nörit uzunluğunu, nörit uzama hızını ve dinamik mikrotübül yoğunluğunu artırdığını; DLK-MAPK sinyal yolağında görev alan DLK proteininin seviyesini

yükselttiğini, buna karşılık DCX ve fosforile DCX (pDCX) protein seviyelerini ise azalttığını gösterdik. Bununla birlikte nöronal gelişim, aksonal yol bulma ve sinaptik plastisite gibi süreçlerde işlev gördüğü bilinen GAP43, STMN2 ve 14-3-3 zeta/delta protein seviyelerinde de vitamin D uygulamasına bağlı bir artış gözlemledik. Ayrıca, vitamin D uygulamasını takiben vitamin D reseptörü (VDR) ile DLK ve STMN2 proteinlerinin bir arada bulunabileceğini gösterdik. Aksonal hasar sonrasında gerçekleştirilen rejenerasyon deneylerinde ise, vitamin D'nin, rejeneratif süreçler ile ilişkili GAP43 ve STMN2 proteinlerinin ekspresyon düzeylerini arttırdığını belirledik. Bulgularımız, vitamin D'nin yalnızca gelişimsel süreçlerde değil, aynı zamanda rejeneratif yanıtların düzenlenmesinde de etkin bir rol oynayabileceğini göstermektedir.]

Haziran 2025 , [161.] sayfa.

Anahtar kelimeler: [vitamin D, DLK, aksonal rejenerasyon]

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

INVESTIGATING THE ROLE OF VITAMIN D IN AXON DEVELOPMENT AND REGENERATION

Ebru KESKIN

Istanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology

Supervisor : Prof. Dr. Erdinç DURSUN
Co-Supervisor: Academic Title Name SURNAME

The regulation of axonal regeneration in the central nervous system (CNS) remains an unresolved challenge in neurobiology. Primary neuron culture is considered the gold standard model for investigating various aspects of CNS development, including neuronal polarization, neurite outgrowth, axon guidance (pathfinding), synaptogenesis, neuronal network formation, maturation, and functional activity. Although a few studies have reported the potential role of vitamin D in promoting axonal regeneration within the CNS, the existing evidence remains limited. It has been demonstrated that regeneration of CNS axons can be partially induced through stimulation with appropriate neurotrophic factors. In the present study, we evaluated the effects of vitamin D on neuronal development between days 1 and 7 in primary neuron cultures, corresponding to the neuronal maturation phase. Furthermore, we examined the impact of vitamin D on regenerative processes in neurons that had acquired a mature phenotype by day 7, exhibiting characteristics similar to those of adult neurons.

Our findings showed that vitamin D administration during the developmental period enhanced neurite length, neurite outgrowth rate, and dynamic microtubule density. In parallel, vitamin D increased the expression level of DLK, a key component of the DLK-MAPK signaling cascade, while reducing the levels of DCX and its phosphorylated form (pDCX). Additionally, vitamin D treatment led to upregulation of GAP43, STMN2, and 14-3-3 zeta/delta proteins, which are involved in neuronal development, axonal navigation, and synaptic plasticity. Co-localization analysis further revealed that DLK and STMN2 proteins associate with the vitamin D receptor (VDR) following vitamin D treatment. In axonal injury-induced regeneration models, vitamin D enhanced the expression of GAP43 and STMN2, both of which are linked to regenerative responses. Collectively, these results suggest that vitamin D may contribute not only to neuronal development but also to the modulation of regenerative mechanisms within the CNS.]

June 2025, [161] pages.

Keywords: [Vitamin D , DLK , axonal regeneration]

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sistemi (MSS)'nin işlevi aksonun yapısal bütünlüğünün ve uygun bağlantısının korunması ile gerçekleşmektedir. MSS'de oluşan bir hasar, ilgili bölgedeki nöron somalarında ve aksonlarında dejenerasyona neden olur. MSS'de hem içsel hem de çevresel mekanizmalar oldukça sınırlanmış bir akson rejenerasyonuna neden olmaktadır. Hücresel ve aksonal hücre iskeletinin önemli bileşenini oluşturan mikrotübüller, akson uzaması ve geri çekilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Rejenerasyonun başarısız olduğu yetişkin MSS'de düzensiz mikrotübüller**,** geri çekilme (retraksiyon şişliklerini) oluşturmaktadır [1].

Akson büyüme konisinde tirozinlenmiş dinamik mikrotübüller ile aktin filamentlerinin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu, nöral gelişim ve akson rejenerasyonu sırasında aksonların spesifik hücresel hedeflerine ulaşmalarında rehberlik etmektedir. Mikrotübül ile ilişkili proteinlerin önemli bir alt grubu olan memeli +TIP proteinleri, büyüyen mikrotübüllerin uçlarına yerleşerek mikrotübül dinamiklerini ve diğer hücresel bileşenlerle etkileşimleri düzenler. Bu proteinlerin çoğu, uç bağlama (EB) proteinleri ile ilişkilidir ve memelilerde EB1, EB2 ve EB3 olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır [2].

Vitamin D, çok sayıda hücre tipinde güçlü bir mitoz inhibitörü ve farklılaşmanın destekleyicisidir. Uzun yıllardır esas fonksiyonunun kalsiyum ve fosfat dengesini düzenlemek ve kemik yapısını korumak olduğu düşünülen vitamin D'nin, beyinde de önemli rollerinin olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bir kolesterol omurgası taşıyan ve tüm vücutta steroid benzeri etkileri olan vitamin D'nin hormonal olarak aktif formu, 1,25 dihidroksi vitamin D3 veya 1,25-dihidroksikolekalsiferoldür. Bu hormon etkilerini farklı hücre tiplerinde ve farklı gelişim aşamalarında nükleer hormon reseptör süper ailesi üyesi vitamin D reseptörü (VDR) aracılığıyla gösterir. VDR genellikle retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturarak gen transkripsiyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gösterir [3]. RXR'den bağımsız olarak, VDR'nin hücre içi sinyal yolaklarını uyardığı da ileriye sürülmektedir [4]. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda kortikal nöronlarda vitamin D'nin, Aβ 1−42 ile indüklenen ve kalsiyum artışı ile NGF üretimini hedef alan toksisiteyi ortadan kaldırmada etkili olduğu; aynı zamanda Aβ1−42'nin VDR ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı ve vitamin D katabolizmasını hızlandıran enzim olan 25-hidroksivitamin D3 24-hidroksilaz (24OHaz)'ı

indüklediği, VDR susturulmasının ise Aβ1−42 üretimini arttırarak nörodejenerasyona yol açabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, AH'nin patolojik özelliklerinden birinin VDR ve vitamin D metabolizmasına doğrudan etkisini gösteren ilk çalışmalardır [5][6]. Grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda, vitamin D eksikliğinin yaşlı bireylerde ajitasyon ve disinhibisyon alt puanlarının artışıyla ilişkili olduğu, ayrıca bilişsel gerileme ve demans riskini artırarak klinik tabloyu olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir [7-9]. 1,25-dihidroksivitamin D3 ve reseptörlerinin, nöronlardaki amiloid işlenme yolaklarının önemli bileşenleri olduğu, vitamin D reseptörünün (VDR) nöronal plazma membranına lokalize olduğu ve APP işlenme sürecini düzenleyebileceği öne sürülmüştür [10, 11]. Ayrıca, VDR'nin mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) bağlanabildiği, mtDNA transkripsiyonunu düzenleyebildiği ve transkripsiyon faktörü A mitokondriyal (TFAM) ile etkileşime girdiği gösterilmiş; bu işlevlerin insan beyninde de gerçekleştiği ilk kez ortaya konmuştur [12]. Vitamin D ve reseptörlerinin Alzheimer hastalığı ve merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki rolleri, Gezen-Ak ve Dursun (2023) tarafından kapsamlı şekilde özetlenmiştir [13].

Literatürde vitamin D'nin MSS'de akson rejenerasyonu üzerine etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bir sıçan modelinde maternal hipovitaminoz D'nin hücre iskeleti onarımında, organellerin taşınmasında ve sinaptik plastisitede yer alan transkriptlerin ve proteinlerin ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir [14]. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda vitamin D bağlayıcı proteini (VDBP) ile adiponektin arasında anneler ve yenidoğanlar arasında güçlü bir ilişki olduğunu, ancak vitamin D seviyeleri ile adipokinler arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını gösterdik [15]. Yapılan bir diğer çalışmada da anne ve yenidoğandaki VDR polimorfizmlerinin, özellikle düşük vitamin D seviyelerinde, yenidoğanın doğum ölçülerini anlamlı şekilde etkileyebileceğini ve yeterli maternal vitamin D seviyelerinin bu genetik etkinin olumsuz sonuçlarını azaltabileceğini ortaya koymaktadır [16]. Bir başka çalışmada ise maternal ve yenidoğan VDBP polimorfizmlerinin yenidoğan vitamin D düzeylerini etkilemezken, belirli maternal genotiplerin gebelikte daha yüksek vitamin D seviyeleri ile ilişkilendirildiği ve gebelerde yeterli vitamin D seviyesine ulaşmanın, VDBP ve irisin gibi biyobelirteçlerin düzenlenmesi açısından önemli olabileceğini gösterilmiştir [17, 18].

İkili lösin fermuar kinaz (DLK) sinyal yolağı, farklı model organizmalarda akson büyümesi ve nöronal göçten apoptoz ve akson dejenerasyonuna ve akson rejenerasyonunun düzenlenmesine kadar değişen nöral gelişimin çeşitli yönlerini düzenlemektedir. DLK, in vitro olarak JNK (c-JUN N terminal kinaz) aktivitesini indüklemektedir. Aktif JNK, nükleer

substratlar (transkripsiyon faktörleri ve hormon reseptörleri) ve hücre hareketi (DCX, MAP1B ve MAP2B, tau, SCG10) dahil olmak üzere hedef proteinlerin fosforillemektedir [19]. Yapılan bir çalışmada primer sıçan kortikal nöron kültüründe vitamin D'nin endotoksin kaynaklı inflamatuvar mediyatör protein üretimini MAPK yolağı aktivasyonunu inhibe ederek azalttığı gösterilmiştir [20]. 16 günlük embriyonik hipokampal progenitör hücre hattında (HIB5) yapılan bir çalışmada ise vitamin D uygulaması p42/p44 MAPK seviyelerinin artmasına neden olurken JNK aktivasyonunda anlamlı bir fark göstermemiştir [21]. Bu sonuçlar, VDR ve MAPK yolağı arasındaki karşılıklı etkileşimin doğasının hücre tipine, belirli bir koşula ve hasara özgü olduğunu göstermektedir. JNK'ler aynı zamanda 14-3-3 proteinlerini de fosforile etmektedir [22]. Bu proteinler hücre döngüsünün düzenlenmesinde, sinyal iletiminde, öğrenme ve hafıza gibi birçok nöral süreçte ve aynı zamanda akson rehberliğinin düzenlenmesinde önemlidir [23].

DCX, post-mitotik olgunlaşmamış nöronlar için bir belirteç olarak kullanılır ve yetişkin nörogenezinin bir göstergesidir. Aksonda lokalize edilmiş DCX ailesi üyeleri; nöronal hayatta kalma, büyüme konisi oluşumu ve aksonal uzama üzerindeki çeşitli etkileri ile, nöronal hasar yanıtlarının kritik düzenleyicileri olarak görülebilir [24]. Aksonların dejenerasyona karşı özellikle savunmasız olduğu ve uzun projeksiyonlu nöronların nörodejeneratif hastalıklardan en fazla etkilendiği uzun zamandır kabul görmektedir. Kültür çalışmalarında dejenere aksonları görüntülemenin en basit biçimlerinden biri, faz kontrast mikroskobu kullanmak ve dejenere olmuş ve sağlam aksonların sayısını, çapını ve uzunluğunu manuel olarak saymaktır [25].

MSS'de vitamin D'nin, akson hasarı sonrasında koruyucu etki gösterdiği ve eksikliğinin gelişimsel anomaliler ile ilişkilendirildiği bilinmektedir. Literatürde vitamin D'nin akson rejenerasyonunda rol aldığını gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda ilk amacımız; primer nöron kültüründe gelişim sırasında vitamin D uygulamalarına bağlı olarak nörit uzunluğu ve uzama hızının aynı zamanda da mikrotübül dinamiği üzerine etkisinin araştırılmasıdır. İkinci olarak ise, vitamin D'nin dejenere olmuş olgun bir nöronda dejenerasyonu geriye döndürüp döndürmeyeceğinin ve süreçteki etkisinin saptanmasıdır. Buna göre proje kapsamında vitamin D'nin nöron gelişimine olan etkisi, nöron olgunlaşmasının gerçekleştiği primer nöron kültürünün 1.-7. günleri arasında gerçekleştirilmiştir. Vitamin D'nin dejenerasyon/rejenerasyon üzerine etkileri ise 7.günden sonra olgun nöron olarak kabul edilen ve yetişkin nöronlarla aynı özelliklere sahip olan nöronlar üzerinde araştırılmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. SİNİR SİSTEMİNİN BİLEŞENLERİ

Nöron, olağanüstü bir hücre tipidir. Tipik bir omurgalı nöronu, küçük bir soma, birkaç adet dendrit ve tek bir uzamış aksondan oluşur. Akson, bilgiyi iletme işlevi doğrultusunda özelleşmişken, dendritler gelen sinyalleri alma görevini üstlenen reseptif alanları oluşturur. Akson, büyüme kapasitesi bakımından neredeyse sınırsızdır ve vücut içerisinde uzun mesafeleri katedebilir; örneğin, omurilikten ayak parmaklarına kadar uzanabilir. Buna karşın, dendritler genellikle kısa, kalın yapılı ve yoğun biçimde dallanmış yapılardır [26].

Morfolojik farklılıkların yanı sıra, akson ve dendritler bileşimsel açıdan da birbirinden ayrılır. Aksonlar, somada bulunan organellerin yalnızca sınırlı bir alt kümesini içerirken; dendritler genellikle somada bulunan tüm organel çeşitlerini barındırır. Protein sentezi ve organel biyogenezi büyük ölçüde soma içerisinde gerçekleştiğinden, her bir hücre uzantısına özgü protein ve organellerin taşınmasını sağlayan uzmanlaşmış taşıma mekanizmalarının varlığı gerekmektedir. Ayrıca retrograde taşıma, sinyal iletim moleküllerinin somaya geri iletilmesini ve protein yıkımı ile ilişkili sinyal yolakların düzenlenmesini mümkün kılmaktadır [26].

2.1.1. Nöral gelişim

Nöron gelişimi sırasında, nöral tüp hücre proliferasyonu nedeniyle hızla genişlemekte ve sonunda farklılaşmış nöronlara dönüşen progenitör hücreleri oluşturmaktadır. Yeni oluşan nöronlar, gelişmekte olan beynin farklı bölgelerine göç ederek beyin yapısının oluşumunu sağlamak üzere kendiliğinden organize olurlar [27].

Göç eden nöronlar son konumlarına ulaştıklarında, aktin açısından zengin filopoda benzer yapılar uzatarak büyüyen nöritleri oluştururlar. Bu nöritler, olgunlaşma sürecinde uzun aksonlara ve dallanmış dendritlere dönüşerek sinapsları oluşturur ve böylece diğer nöronlarla iletişim kurmalarını sağlar. Akson oluşumu, genellikle nöronların morfolojik simetrisini kıran ilk adım olup nöronal polaritenin başlangıcını temsil etmektedir [28].

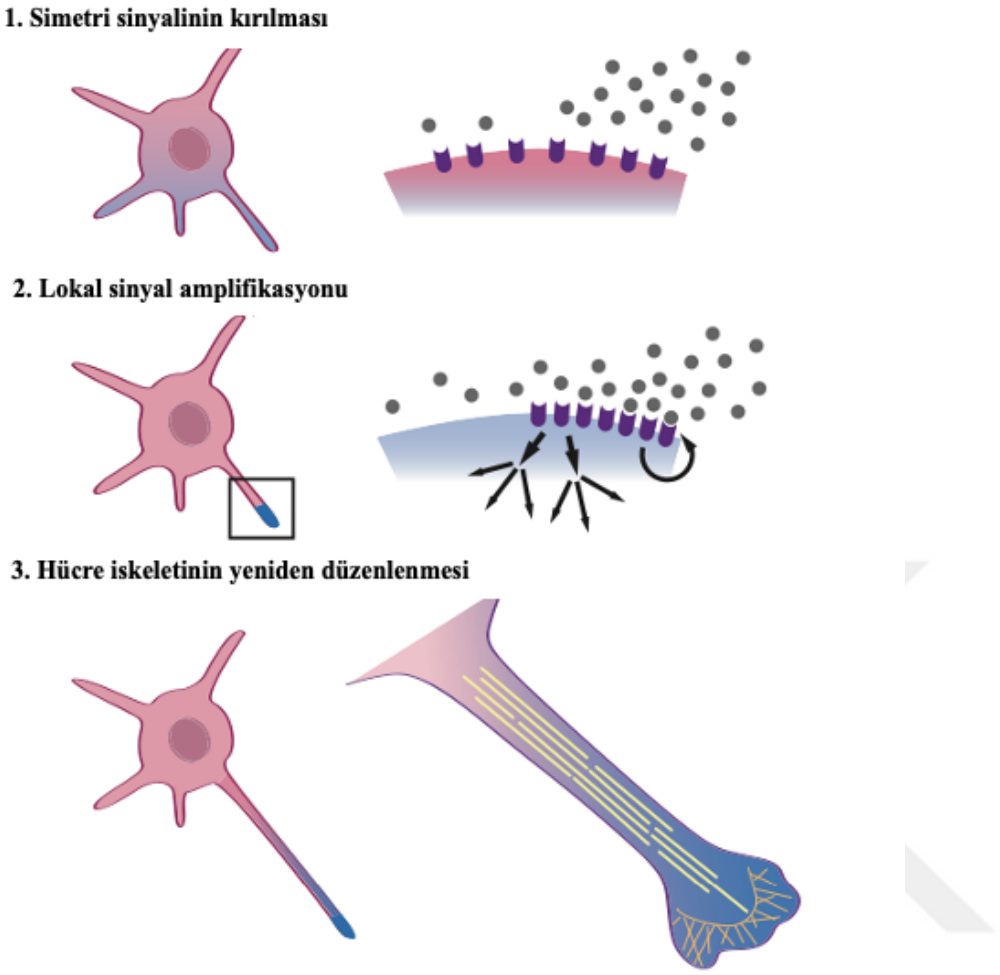
Nöral gelişim sürecinde, sinir sisteminin doğru bir şekilde bağlantı kurmasını sağlayacak yoğun bir hücresel hareketlilik söz konusudur. Bu süreç, hem göç eden nöronların uygun

anatomik konumlara ulaşmasını hem de akson uçlarının hedef dokulara yönelmesini mümkün kılmaktadır. Dolayısıyla, nöronların morfolojik, işlevsel ve bileşimsel kutuplaşmalarını (polaritelerini) kurmaları ve sürdürebilmeleri çok sayıda biyolojik zorluğun üstesinden gelmelerini gerektirir. Nöron içerisinde yer alan sofistike yapısal bileşenler ve sıkı şekilde düzenlenen transport ve hareket mekanizmalarının varlığı bu zorluklarla başa çıkmayı mümkün kılabilmektedir. Bu yapısal ve transport sistemleri içerisinde mikrotübüller, öne çıkan en temel unsurlar arasında yer almaktadır [26].

2.2. Nöral polarite

Nöronun elektrik sinyallerini almak, işlemek ve yaymak olan temel işlevi, en belirgin morfolojik özellikleri olan uzatılmış akson ve dendrit dallarıyla sıkı sıkıya bağlantılıdır. Aksonu somatodendritik bölmeden ayıran hücresel özelleşme süreci, nöronal polarizasyon olarak adlandırılır [29].

Nöronal polarite, gelişimin erken dönemlerinde oluşmakta ve nöronun ömrü boyunca korunmaktadır. Polarite oluşumu, hücre dışı bir sinyalin algılanması veya nörona uzamsal bir yönelim sağlayan sitoplazmik bir faktörün birikmesi gibi başlangıçtaki simetriyi ortadan kaldıran ilk işaret ile aksonun ve dendritin nerede büyümesi gerektiği gibi bir dizi adımı içermektedir. Bu işaret daha sonra, henüz morfolojik olarak polarize olmamış bir hücrede lipid ve protein bileşimi bakımından birbirinden farklı alt hücresel alanlar oluşturmak için hücre içi sinyal yolları tarafından yorumlanır ve güçlendirilir. Buna karşılık bu sinyaller, protein ve lipid bileşimleri açısından da farklılık gösteren iki morfolojik olarak farklı süreç üreten büyük hücre iskeleti yeniden düzenlemelerini başlatır [28, 30] (Şekil 2-1).



Şekil 2-1. Nöronal polarizasyonun evreleri [29]**.**

Polarite bir kez oluşturulduğunda, nöronun yaşamı boyunca korunmalıdır. Bu durum genellikle, her bölgeye özgü sitoplazmik ve transmembran proteinler ile organellerin doğru şekilde konumlandırılmasını sağlayan yönlendirilmiş transport mekanizmaları ya da seçici endositoz ve ekzositoz yoluyla gerçekleştirilir [31, 32]. Hücre içindeki membran bölgelerinin farklı kimliklere sahip olması, evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş bir hücresel özelliktir [33, 34].

2.2.1. Başlangıç polaritesinin oluşturulması

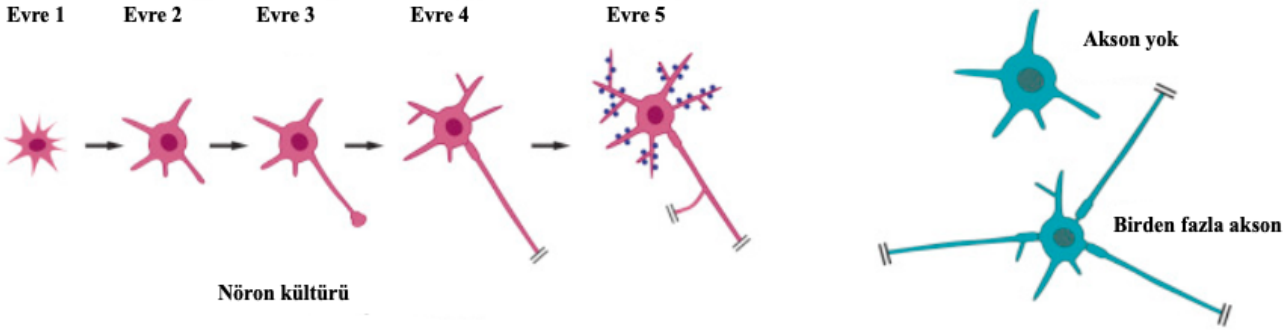
Farklı model sistemlerden elde edilen bulgular, farklılaşmakta olan nöronlarda yapısal özellikleri farklı olan membran bölgelerinin oluşumu için çeşitli stratejilerin kullanıldığını

göstermiştir. Bu stratejiler genel olarak hücre-içi mekanizmalar ve hücre dışı çevreden gelen (ekstrinsik) sinyaller olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir.

2.2.1.1. İçsel mekanizmalar

Nöronal polarite bazı durumlarda, progenitör nöronal hücrenin mevcut apikal-bazal polaritesinden türetilir. Örneğin, zebra balığı ve faredeki retinal gangliyon hücreleri ile bipolar hücrelerde akson, doğrudan bazal uzantıdan gelişebilir [35-37]. Bu tür bir polarizasyon biçimi, kültür koşullarında ya da neokortekste gözlenen polarizasyon sürecine özgü olan, olgunlaşmamış nöritlerin başlangıçta uzaması gibi belirgin morfolojik özellikleri sergilemektedir.

Ekstrinsik bir sinyalin yokluğunda polarizasyonun gerçekleştiği en iyi çalışılmış örnek, disosiye edilmiş memeli kortikal ve hipokampal hücre kültürleridir. Ekimden kısa bir süre sonra kültüre alınan hipokampal hücreler, membran yüzeyinde küçük çıkıntılar oluşturmaya başlar (evre 1); bu yapılar zamanla olgunlaşmamış, kısa ve dinamik nöritlere dönüşür (evre 2). Polaritenin ilk morfolojik belirtisi, bir nöritin diğerlerine göre daha hızlı büyüyüp uzamasıyla ortaya çıkar (evre 3); bu nörit daha sonra aksona dönüşecektir. Diğer nöritler dendritlere farklılaşır (evre 4) ve evre 5'te diken oluşturmaya başlar [38, 39] (Şekil 2-2).



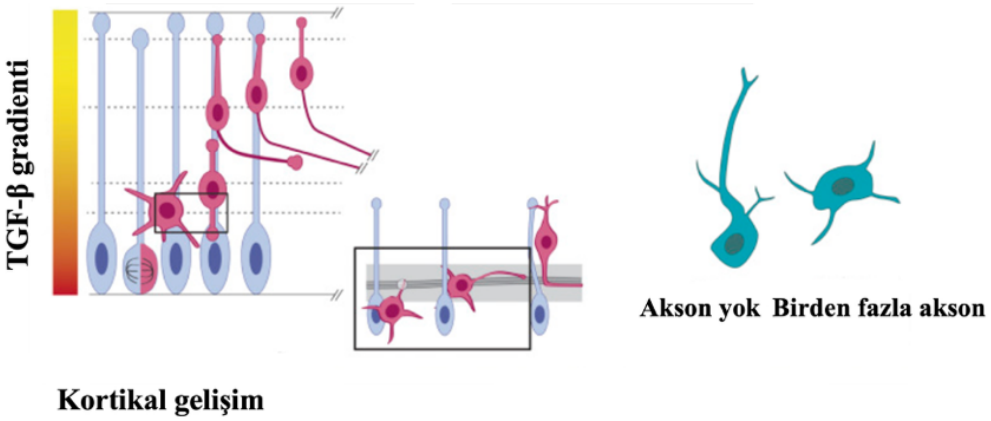
Şekil 2-2. Memeli hücre kültüründe nöral polarizasyon [38]**.**

2.2.1.2. Başlangıç polaritesinin oluşturulmasında dış sinyaller

Canlı organizmalarda akson ve dendritler, belirli bir zamansal sırayla ve karakteristik yönelimlerle uzanarak oluşur; bu özellik, nöronal bağlantıların doğru bir şekilde kurulması açısından muhtemelen kritik öneme sahiptir. Bu gözlemler, in vivo ortamda simetri kırılmasının, polariteyi belirleyen hücre-içi olaylara yön veren ekstrasellüler ipuçları tarafından kontrol edildiğini düşündürmektedir.

Nöronal polariteyi incelemek için en kapsamlı çalışılmış in vivo model, kortikal piramidal nöronlardır. Bu hücreler ventriküler zonda (VZ) doğar ve radyal glia uzantıları boyunca apikale doğru göç ederler. Subventriküler zona (SVZ) ulaştıklarında, birden fazla kısa nörit uzatırlar ve bu aşamada çok kutuplu (multi-polar) hücreler olarak adlandırılırlar.

Polarite, ilk olarak göç süreci sırasında belirginleşir; bu aşamada kısa nöritlerden biri hızla uzayarak ilerleyici (öncü) bir uzantıya dönüşürken, bir diğeri hücrenin arka kutbunu oluşturan uzantıya farklılaşır. Kalan nöritler ise gerileyerek, ara bölgede (intermediate zone, IZ) bipolar bir hücre morfolojisinin oluşmasına katkı sağlar. Önemli olarak, bu süreçte oluşan öncü ve arka uzantılar daha sonra sırasıyla apikal dendrite ve aksona farklılaşır. Yönlendirilmiş nöronal göç sırasında kurulan hücresel polarite, akson ve dendrit morfogenezinde korunarak nöronal farklılaşma sürecine aktarılır [28, 40, 41].



Şekil 2-3. Korteks gelişimi sırasında, nöronal polarizasyon radyal migrasyonla eşzamanlı bir şekilde ilerler [29].

TGF-beta, ventriküler zon (VZ)'dan salınan ve kortikal nöronlarda akson oluşumunu indükleyen başlıca sinyaldir. TGF-beta reseptörü aksonlarda zenginleşmiştir ve bu reseptörün ortadan kaldırılması, akson içermeyen kortikal nöronların oluşmasına neden olur. İn vitro ortamda uygulanan TGF-beta'nın aksonun belirlenmesini ve uzamasını indüklemek için yeterli olduğu gösterilmiştir [42].

Bir başka difüze edilebilir sinyal ise BDNF ve NT3 gibi nörotrofinlerdir. Tüm nörotrofin reseptörlerine bağlanabilen p75 ^{NTR}'nin baskılanması ya da genetik olarak ortadan kaldırılması hem kortikal hem de erişkin hipokampal nöronlarda nörogenez sürecinde akson oluşumunun başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmaktadır. Ayrıca, dominant-negatif TrkB ve TrkC reseptörlerinin ekspresyonu, çok kutuplu (multipolar) hücrelerin iki kutuplu (bipolar) hücrelere dönüşümünü engeller [37, 43, 44].

2.2.1.3. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi

Başlangıçtaki polarite sinyali, zamanla morfolojik değişikliklerin temelini oluşturan hücre iskeletinin yeniden düzenlemelerini tetikler ve hücre içi yönlü taşımayı mümkün kılar. Bu sinyalin doğru şekilde algılanması ve sitoiskelet ile ilgili efektörlere iletilmesi, ilgili sinyal iletim yolakları aracılığıyla gerçekleştirilir. Gelişmekte olan nöronların polarizasyon süreci

boyunca geçirdiği kapsamlı morfolojik değişiklikler göz önüne alındığında, aktin ve mikrotübül iskeletinin yeniden düzenlenmesi şaşırtıcı değildir. Bu yeniden düzenlenmeler yalnızca nöronal morfolojinin oluşturulması için gerekli değildir; aynı zamanda polarizasyon sürecinde yönlendirici bir rol de oynamaktadır. Aynı zamanda aktin-mikrotübül etkileşimi ve dinamikleri, akson uzarken büyüme konisinin ilerlemesinde ve yön bulmasında da kritik roller oynamaktadır [45-47].

2.3. Nöronlarda mikrotübüllerin yapısı ve organizasyonu

Tubulin, bir alfa-tubulin alt birimi ile bir beta-tubulin alt biriminden oluşan heterodimerik bir yapıdan oluşmaktadır. Bu alt birimlerin her biri, farklı gen ürünleri olup birbirlerine yüksek afinite ile bağlanırlar. Omurgalılarda genellikle 6–7 adet alfa-tubulin geni ile benzer sayıda beta-tubulin geni bulunmaktadır. Mikrotübülün bir ucu, artı uç olarak adlandırılır ve bu uç, alt birimlerin eklenmesi ve çıkarılması açısından daha elverişlidir. Diğer uç ise eksi uç olarak adlandırılır ve bu uçta dinamiklik daha düşüktür. Beta-tubulin, mikrotübülün artı ucunda, alfa-tubulin ise eksi ucunda bulunur. Bu yapısal polarite, yalnızca mikrotübülün uçlarında değil, tüm uzunluğu boyunca gözlemlenebilmektedir [48-50].

Mikrotübüller yan yana dizilerek 25 nm genişliğinde içi boş bir silindir oluşturan, doğrusal protofilamentler halinde düzenlenmiş α- ve β-tubulin heterodimerlerinden meydana gelmektedir. α- ve β-tubulin heterodimerleri, mikrotübüllerin polar yapısının temelini oluşturmaktadır. Ökaryotik hücrelerde olduğu gibi nöronlar da serbest tubulin alt birimlerinden oluşan bir havuz ve polimerize mikrotübüllerden oluşan ayrı bir havuz içerir. Bu iki havuz arasında dinamik bir denge bulunmaktadır ve mikrotübüller bu denge doğrultusunda sürekli olarak polimerizasyon ve depolimerizasyon süreçlerinden geçmektedir [26, 51].

αβ-tubulin, iki GTP bağlanma bölgesine sahiptir. α-tubulinin N-bölgesi (değiştirilemez), monomerler arasında veya dimer içinde uzunlamasına gömülü bir konumda yer almaktadır [52]. β-tubulinin E-bölgesi (değiştirilebilir) ise, açığa çıkan bir dimer yüzeyinde ve mikrotübülün artı ucundaki terminal alt birimlerde bulunmaktadır [53, 54]. Serbest αβ-tubulin dimerleri, E-bölgesinde bağlı guanozin difosfatı (GDP) guanozin trifosfat (GTP) ile değiştirerek polimerleşmeye uygun hale gelir. Bir tubulin dimeri, büyüyen bir mikrotübülün artı ucuna eklendiğinde, α-tubulin alt birimi, terminal β-tubulin alt biriminin E-bölgesindeki GTP ile temas ederek, hidroliz için gerekli olan bağlama cebini tamamlar [55]. GTP-tubulin ağı

kararlı olup polimerleşmeyi teşvik ederken, GDP-tubulin ağı kararsızdır ve depolimerizasyona eğilimlidir [56]. Uzun süredir kabul edilen "GTP-başlığı" modeline göre, bir mikrotübül artı ucunda GTP-tubulin alt birimleri bulundurduğu sürece büyümeye devam etmektedir. Bu GTP başlığı kaybolduğunda ise hızlı bir depolimerizasyon meydana gelmektedir [57]. Uzamadan kısalmaya geçiş “katastrofi”, kısalmadan uzamaya geçiş ise “kurtarma” olarak adlandırılmaktadır. Mikrotübül dinamikleri, GTP-tubulin dahil edilmesinin ve GTP hidroliz hızının dengesi tarafından yönlendirilmektedir [58]. Mikrotübülün hem polimerizasyonu hem de depolimerizasyonu, motor proteinlerin ürettiği kuvvetlerle karşılaştırılabilir büyüklükte mekanik kuvvetler üretebilmektedir [59].

Pek çok hücre tipinde mikrotübüllerin eksi uçları, nukleusa yakın konumlanan mikrotübül organizasyon merkezlerine (MTOC) bağlıdır; artı uçları ise sitoplazmaya doğru uzanmaktadır. Bu artı uçlar, uzama ve kısalma fazları arasında geçiş yapan dinamik kararsızlık olarak adlandırılan bir süreç sergiler [57]. Bu mekanizma, bireysel MT’lerin hücresel bölgeleri keşfetmelerine ve uygun bir ortamla karşılaşmadıkları takdirde geri çekilmelerine olanak tanır [60].

Hızlı dinamik özellikler sergileyen mikrotübül fraksiyonunu tanımlamak için labil, dinamik olmayan fraksiyonu tanımlamak için ise kararlı (stabil) terimleri kullanılmaktadır. Hücrelerin morfolojik stabilitelerine katkıda bulunan temel bir unsur, labil ve kararlı mikrotübül fraksiyonları arasındaki dengedir. Göreceli olarak daha sabit bir morfolojiye sahip olan nöronlarda mikrotübül kütlesinin daha büyük bir kısmı kararlı hâlde bulunur. Hem gelişmekte olan hem de olgun nöronlar, önemli düzeyde labil ve kararlı mikrotübül kütlesi içerir; ancak, olgun nöronlarda mikrotübül kütlesinin daha büyük bir oranı kararlıdır [61, 62].

Nöronlardaki mikrotübül polimerleri en az üç farklı stabilite kategorisine ayrılabilir: labil, stabil ve soğuğa-stabil. Labil kategori, asetillenmiş, detirozinlenmiş ve poliaminasyonla modifiye edilmiş tubulin bakımından nispeten yetersizdir. Stabil kategori ise asetillenmiş ve detirozinlenmiş tubulin açısından zengin olmakla birlikte poliaminasyonlu tubulin düzeyi yine düşüktür. Soğuğa-stabil kategori ise poliaminasyonla modifiye edilmiş tubulin açısından zengindir ve muhtemelen asetillenmiş ve detirozinlenmiş tubulin de içermektedir. Stabil mikrotübül kategorisi, mikrotübülle ilişkili proteinler gibi yardımcı faktörler aracılığıyla stabilize edilir ve dinamik özelliklerini sürdürür; ancak bu dinamiklik, labil kategoriye kıyasla daha yavaş gerçekleşir. Öte yandan, soğuğa-stabil mikrotübüller, tubulin alt birimlerinin

poliaminasyonu ile stabilize edilir ve bu derece yüksek stabiliteye sahip olmaları nedeniyle dinamik bir yapı göstermedikleri kabul edilmektedir. Teorik olarak, herhangi bir mikrotübül, farklı bölgelerinde bu üç stabilite sınıfının tümünü içerebilir [26].

2.4. Hücrelerde dinamik mikrotübüllerin gözlemlenmesi

Hücrelerde mikrotübüllerin dinamik kararsızlığını ölçebilmek için, tek tek mikrotübüllerin görüntülenebilmesi gerekmektedir. Hücrelerin ince kesitlerinde mikrotübüller, herhangi bir işaretleyici kullanılmadan video destekli diferansiyel girişim kontrast (DIC) mikroskopisi ile izlenebilmektedir [63, 64]. Ancak, mikrotübülleri görüntülemenin en yaygın yolu floresan temelli tekniklerdir. Bu yöntemler arasında kimyasal olarak işaretlenmiş tubulin enjeksiyonu [65, 66], hücre içine girebilen boyaların kullanımı [67] veya genetik olarak kodlanmış floresan proteinlerin hücrede üretilmesi yer almaktadır. Bu teknikler, teorik olarak hücredeki tüm mikrotübülleri görünür hale getirebilir. Birçok hücre tipinde mikrotübüller çok yoğun dizildiğinden, tek bir mikrotübülün tüm yaşam süreci boyunca izlenmesi genellikle mümkün değildir. Bu nedenle, mikrotübül dinamiklerinin farklı yönlerini inceleyebilmek için farklı işaretleme yöntemleri kullanılmaktadır.

Mikrotübüllerin tamamını işaretlemek yerine, büyüyen mikrotübüllerin uçlarını izleyen EB1, EB3 veya CLIP-170 gibi uç-izleyici proteinler (+TIP'ler) kullanılmaktadır [68, 69]. EB proteinleri, yoğun mikrotübül yapıları içinde bile mikrotübül polimerizasyonunun güvenilir şekilde ölçülmesine olanak tanır. Aynı zamanda hücre içindeki belirli bölgelerden mikrotübül nükleasyon hızının ölçülmesinde ve mikrotübül polaritesinin belirlenmesinde tercih edilen belirteçlerdir [70-73].

+TIP'ler yalnızca mikrotübül polimerizasyonu hakkında bilgi vermektedir. Mitotik iğ gibi yoğun mikrotübül dizilimleri veya nöritler gibi yapılarda mikrotübül dinamiklerinin diğer yönlerini ölçmek hâlâ zorluk teşkil etmektedir [58].

Mikrotübül yaşam döngüsüne ilişkin verileri elde etmenin en yaygın ve en güvenilir yöntemi, mikrotübül ucunun konumunu izlemek ya da her zaman noktasında mikrotübül uzunluğunu manuel olarak ölçmektir [74, 75]. Mikrotübülün eğriliğindeki değişiklikleri hesaba katmak için, mikrotübül boyunca bir eğri çizilebilir. Eğer mikrotübülün tamamı görünür değilse, bu işlem mikrotübül üzerindeki rastgele bir noktadan başlayarak da yapılabilmektedir [76].

2.5. Akson ve dendritlerde mikrotübül organizasyonu

Mikrotübüller, nöronlarda bol miktarda bulunan yapısal elemanlardır ve aksonlar ile dendritlerde paraksiyel olarak hizalanmış diziler şeklinde yerleşim göstermektedirler. Bu mikrotübül dizileri, aksonlar ve dendritler için yapısal bir iskelet görevi görerek özelleşmiş morfolojilerini kazanmalarını ve sürdürebilmelerini mümkün kılmaktadır [26].

Gelişimin erken evrelerinde ve nörit uzaması sırasında, büyüme konisi dış çevreden gelen yönlendirici sinyalleri algılayarak uzama yönünü belirler. Bu yapı, büyük oranda aktin filamentleri ve dinamik mikrotübüllerden oluşan, oldukça labil bir hücresel uzantıdır. Buna karşın, akson ve dendritlerdeki mikrotübüllerin büyük bir kısmı oldukça stabil olup, tahmini yarı ömürleri birkaç dakika olan dinamik mikrotübüllere kıyasla birkaç saat olarak belirlenmiştir [77]. Bu mikrotübüller, nöronal uzantıların büyümesini ve yapısal bütünlüğünü sağlamak amacıyla demetler halinde düzenlenmiştir.

Aksonda, mikrotübüller neredeyse tamamen tek yönlü olarak düzenlenmiştir ve artı uçları hücre gövdesi dışına akson terminaline doğru yönelmiştir. Omurgalı dendritlerinde ise mikrotübüller karışık polariteye sahiptir ; hem artı uçları hem de eksi uçları hücre gövdesi dışına bakan mikrotübüller bulunmaktadır [48-50]. Bazı alt omurgalı hayvanların dendritlerinde ise mikrotübüllerin çoğunluğu eksi ucu distalde olacak şekilde düzenlenmiştir [78, 79]. Bu durum, aksonal ve dendritik mikrotübül organizasyonu arasında daha belirgin ve derin yapısal farkların bulunduğuna işaret etmektedir.

Nöronal olmayan hücrelerde mikrotübüller genellikle, mikrotübül oluşumu için nükleasyon (çekirdeklenme) bölgeleri olarak işlev gören sentrozom gibi yapılar tarafından organize edilir. Mikrotübüller, eksi uçları sentrozomun içinde ve artı uçları sentrozomdan uzağa doğru uzayacak şekilde polimerleşir. Bu organizasyon, mikrotübüllerin düzgün yönelimli bir dizilim oluşturmasına olanak tanır. Gelişmekte olan nöronlarda da mikrotübüller başlangıçta hücre gövdesinde yer alan sentrozomda nükleasyonla oluşur; ancak daha sonra bu mikrotübüller sentrozomdan ayrılır ve aksonlar ile dendritler içine taşınmak üzere serbest hale gelir [80-83]. Bu mikrotübüller, moleküler motor proteinleri aracılığıyla taşınır; mikrotübülleri ya artı uç önde olacak şekilde (hem aksonlara hem de dendritlere doğru) ya da eksi uç önde olacak şekilde (yalnızca dendritlere doğru) yönlendirir. Dolayısıyla, nöronlarda mikrotübül organizasyonu, mikrotübüllerin nükleasyon bölgelerine olan bağlarına değil; aksine, mikrotübülleri her bir nöronal uzantıya taşıyan motor proteinlerin aktivitesine bağlı olarak belirlenmektedir [84-88].

Yakın tarihli çalışmalar, özellikle nöronal olgunlaşma sürecinde sentrozomun mikrotübül-nükleasyon kapasitesinin azalmasıyla birlikte, mikrotübüllerin akson ve/veya dendritlerde lokal olarak da nükleasyon yoluyla üretilebileceğini öne sürmektedir [89]. Göç eden bir nöronun öncül uzantısı söz konusu olduğunda, mikrotübüllerin büyük bir kısmı hâlen sentrozoma bağlı kalmaktadır [90]. Sentrozom nöronal farklılaşma sırasında parçalandığından, gama-tubulin ve diğer sentrozomal proteinler sentrozomdan sitoplazmaya yeniden dağılabilir ve burada yeni MT çekirdeklenme bölgeleri oluşturabilir [91]. Aslında, gama-tubulin ve diğer sentrozom çevresi materyali hem Drosophila hem de kemirgen nöronlarındaki dendritlerde ve aksonlarda bulunmuştur ve nöronal farklılaşmanın farklı evrelerinde önemlidir [92-94].

Nöronal mikrotübül dizilimlerinin bir diğer son derece önemli özelliği, bu yapıları oluşturan bireysel mikrotübüllerin uzunluk ve stabilite açısından gösterdiği çeşitliliktir. Bir akson ya da dendrit içerisindeki mikrotübül dizilimi, soma ile uzantının distal ucu arasında uzanmasına rağmen, bireysel mikrotübüller genellikle bu mesafenin tamamını kapsamaz. Bunun yerine, mikrotübüller uzunluk bakımından önemli ölçüde farklılık gösterir; bazıları yalnızca birkaç mikrometre—hatta bir mikrometreden daha kısa—olabilirken, bazıları yüzlerce mikrometreye kadar ulaşabilir. Özellikle daha uzun aksonlarda bu uzunluk birkaç yüz mikrometreyi bile aşabilir [95-98].

Uzun mikrotübüller iki temel işlev görür: Akson ve dendritlerin geri çekilmesine karşı koyan yapısal destek sağlarlar ve organel taşınımı için ana uzun mesafe yollarını oluştururlar. Buna karşılık, kısa mikrotübüller yüksek derecede hareketlidir ve akson içinde, muhtemelen dendritlerde de tubulinin taşınmasında kritik rol oynar. Bu kısa ve hareketli mikrotübüller, daha uzun ve durağan mikrotübüllerin oluşumu için çekirdeklenme noktası görevi görebilir veya kısmen ya da tamamen depolimerize olarak diğer mikrotübüllerin uzaması için tubulin alt birimlerini sağlayabilir. Ayrıca, kısa hareketli mikrotübüller belirli proteinler ya da sinyal molekülleri gibi bilgi taşıyan unsurların taşınmasında görev alarak nöronun farklı bölgeleri arasında iletişimi kolaylaştırabilir [99].

Mikrotübül dinamiklerini etkileyen çeşitli hücresel faktörler tanımlanmıştır; bunlar arasında tubulin izoformlarının yapısı, GTP hidrolizi, mikrotübül ilişkili proteinler ve tubulindeki çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar yer almaktadır [100, 101]. Nöronlardaki tubulin, çok sayıda tubulin izotipinin eksprese edilmesi ve her birinin post-translasyonel düzeyde de düzenlenmesi nedeniyle oldukça heterojendir. Tubulin, fosforilasyon, poliaminasyon, palmitoilasyon, S-

nitrozilasyon, ubikitinasyon, sumoilasyon, glikozilasyon ve metilasyon gibi çok çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara (PTM) uğrayabilmektedir [102-105] . Bu post-translasyonel modifikasyonlara ek olarak, nöronal mikrotübüllerin büyük çoğunluğu detirozinasyon, asetilasyon ve poliglutamilasyon yoluyla stabilize edilmektedir [101]. Tirozinasyon, keşfedilen ilk tubulin post-translasyonel modifikasyonudur [106]. Bu bulgudan kısa bir süre sonra, bu reaksiyonun geri dönüşümlü olduğu keşfedilmiştir [107]. Bu süreç, α-tubulinin C-terminalindeki tirozin kalıntısının Tubulin Karboksipeptidaz (TCP) tarafından enzimatik olarak uzaklaştırılması ve ardından Tubulin Tirozin Ligaz (TTL) tarafından yeniden eklenmesiyle gerçekleşen detirozinasyon/tirozinasyon döngüsü olarak tanımlanmıştır [108]. Tirozinasyon, dinamik mikrotübüllerin bir göstergesi iken detirozinasyon mikrotübül stabilitesinin bir göstergesi olarak tanımlanmıştır. Stabil olan akson mikrotübülleri, detirozine tubulin bakımından zengindir. Büyüme konisi ve nöritlerin distal bölgelerinde bulunan labil mikrotübüller ise çoğunlukla tirozine tubulin içermektedir [101].

2.6. Tirozinasyon / detirozinasyon döngüsü ve nöron farklılaşması

Nöronal gelişimin erken evrelerinde, tubulin PTM'leri, simetrinin bozulmasında ve hücre polarizasyonunun sağlanmasında önemli bir olay olan akson oluşumunu başlatmada rol oynamaktadır. Nöronal gelişimin erken evrelerinde, çoğu MT, tirozine tubulin içermektedir [109]. Akson özelleşmesinden hemen önce, olgunlaşmamış bir nöritin MT'leri daha stabil hale gelir ve tubulin detirozinasyonunda küçük bir artış gözlemlenir [109-111]. Aksonal MT'ler daha sonra, detirozine, Δ2 ve asetillenmiş alt birimlerin yüksek oranda olduğu, çok stabil paralel diziler halinde organize olurlar [112-114].

Aksonun en distal bölgesi çoğunlukla yüksek dinamikliğe sahip tirozinlenmiş MT'lerden oluşur [115, 116]. Nöronlar olgunlaştıkça, MT'ler daha stabil hale gelir ve PTM'ler birikmeye devam eder. Tirozinlenmiş MT'ler hücre gövdesinde bol miktarda bulunurken, post-translasyonel olarak modifiye olmuş tubulin farklı desenler halinde dendritik ve aksonal bölgelerde şekillenir; dinamik tirozinlenmiş MT'ler dendritin dış kısmında yer alırken, stabil asetillenmiş ve Δ2 tubulin demetleri iç kısımda bulunmaktadır [117].

Tubulin detirozinasyon döngüsünün fizyolojik önemi fare modellerinde açıkça gösterilmiştir. Knockout farelerde, α-tubulin C-terminal tirozine seviyelerinin bozulması, esas olarak beyin morfolojisinin değişmesine yol açmaktadır. TTL knockout fareleri, nöronal

ağlarının düzensizliği nedeniyle doğumdan hemen sonra ölmektedir [118]. Büyüme konisi oluşumu ve aksonal rejenerasyonun temel mekanizmalarından biri, MT dizilerinin ve bunların dinamik özelliklerinin düzenlenmesidir [119, 120]. Yapılan bir çalışma TTL'nin akson hasar bölgesinde tirozine α-tubulin seviyelerini arttırmak için gerekli olduğunu ve iyileşmede önemli bir rol oynadığını göstermiştir. TTL'nin down-regülasyonu ise retrograde organel taşınmasını bozmuş ve pro-rejeneratif programın aktive edilmesini geciktirmiştir [121].

2.7. Mikrotübül ilişkili proteinlerin sınıflandırılması

İşlevsel özelliklerine göre, mikrotübül ile ilişkili proteinler kabaca beş gruba ayrılabilir. Birinci grup, mikrotübül uçlarına bağlanarak mikrotübül dinamikliğini düzenleyen proteinleri içerir; bu gruba +TIP'ler ve eksi uç hedefleyen proteinler (−TIP'ler) dahil olmaktadır [51, 122]. İkinci grup, mikrotübül örgüsüne (lattice) bağlanarak mikrotübülleri stabilize eden ya da çapraz bağlayan proteinleri kapsamaktadır [123, 124]. Üçüncü grupta, mikrotübül sayısını doğrudan düzenleyen proteinler yer alır; bu gruba nükleasyon (çekirdeklenme) düzenleyicileri [125] ve mevcut mikrotübülleri kesen enzimler örnek verilebilir [126, 127]. Dördüncü grup, mikrotübüller boyunca yönlü hareket oluşturabilen ve kuvvet üretebilen kinesin ve dinein ailesi üyelerinden oluşmaktadır [128]. Beşinci grup ise, tubulinin katlanmasındaki rol alan yardımcı proteinleri ve tubulini post-translasyonel modifikasyonlarla düzenleyerek farklı mikrotübül alt tiplerinin oluşumunu sağlayan enzimleri içermektedir [129-131].

2.8. Nöronlarda mikrotübül stabilitesini etkileyen faktörler

Mikrotübülleri stabilize eden bazı proteinler onları daha sert veya daha az hareketli hale getirebilir, ancak bu her zaman doğru değildir. Örneğin, bir mikrotübül stabil olabilir ancak labil olan bir mikrotübül kadar sert olmayabilir. Aksonlardaki kısa hareketli mikrotübüller stabil alanlara sahipken hareketsiz mikrotübüller ise genellikle uzun labil alanlara sahiptir. Mikrotübüllerin yoğun şekilde demetlenmiş olması genellikle onların çok stabil olduğu şeklinde yorumlanır, ancak bu her zaman doğru değildir. Örneğin, büyüme konisine uzanan labil (kararsız) bölgeler demetlenmiş olsalar da hâlâ labil özellik gösterebilirler. Bu durum, bu alandaki en karmaşık sorulardan birisi olan mikrotübül stabilitesinin hangi faktörler tarafından belirlendiği sorusunu gündeme getirmektedir.

Literatürde mikrotübülleri stabilize eden veya destabilize eden proteinlerden sıkça bahsedilse de konu sıklıkla olduğundan daha basit şekilde sunulmaktadır. Bir mikrotübülü stabilize eden

bir protein, labil bir bölgeyi stabil bir bölgeye dönüştürebilir veya en azından her iki bölgenin de stabilitesini artırabilir. Benzer şekilde, bir mikrotübülü destabilize eden bir protein, stabil bir bölgeyi labil hale getirebilir veya her iki bölgenin de stabilitesini azaltabilir. Bir mikrotübülü stabilize eden bir protein, kararsız bir alanı kararlı bir alana dönüştürecek veya en azından her iki alanı da aksi halde olacağından daha kararlı hale getirecektir. Bir mikrotübülü destabilize eden bir protein, kararlı bir alanı kararsız bir alana dönüştürecek veya en azından her iki alanı da aksi halde olacağından daha az kararlı hale getirecektir [26].

Mikrotübülleri stabilize ettiği öne sürülen çok sayıda protein bulunmaktadır. Bunlar arasında, klasik MAP'lar (mikrotübül ilişkili proteinler) olan tau, MAP2 ve MAP1b'nin yanı sıra, mikrotübül ağına bağlanan doublecortin (DCX) gibi diğer proteinler de yer almaktadır [123, 132, 133].

DCX, protofilamentler arasındaki oluğa bağlanmaktadır ve bu konum, teorik olarak mikrotübülü depolimerizasyona karşı stabilize etmek için oldukça elverişli görünmektedir. DCX'in esas işlevinin mikrotübül sertliğini düzenleyerek büyüme konisinin yönlendirilmesini sağlamak [134], mikrotübülün protofilament sayısını 13 ile sınırlamak [135] ve aksonal dal oluşumu gibi olaylarda aktin iskeleti ile mikrotübül entegrasyonunu düzenlemek [136] olduğu gösterilmektedir.

Mikrotübül destabilizatörleri olarak adlandırılan birçok protein, mikrotübül parçalanmasını teşvik ettikleri için daha doğru bir şekilde mikrotübül depolimerazları olarak tanımlanmalıdır. Örneğin, stathmin ve onun nörona özgü varyantı SCG10, tubulin alt birimlerine bağlanarak hücre içi kullanımını engeller ve yıkım olaylarını teşvik ederek mikrotübüllerin parçalanmasına yol açar. Bu proteinler, mikrotübüllerin labil bölgelerini depolimerize ederek toplam mikrotübül kütlesini azaltır ve mikrotübül diziliminde stabil bölgelerin oranını göreceli olarak artırır [137].

2.9. Mikrotübül uç izleme proteinleri

Mikrotübül ilişkili proteinlerin bir alt grubu olan memeli artı uç izleme proteinleri (+TIP'ler) büyüyen mikrotübüllerin uçlarına yerleşir ve hem mikrotübüllerin dinamik davranışını hem de mikrotübüllerin diğer hücresel bileşenlerle etkileşimlerini düzenler [2]. Mikrotübülün GTP başlığını tanıyarak artı uca doğrudan afinitesi olabildiği gibi diğer +TIP proteinlerine

bağlanarak dolaylı yoldan da bu uçta lokalize olabilen proteinlerdir [138]. Günümüze kadar tanımlanmış 20'den fazla +TIP bulunmaktadır. +TIP proteinleri, mikrotübülün dinamik kararsızlığını etkilemekte ve mikrotübülün çekirdeklenmesinde rol oynamaktadır [51, 72, 139].

Nöronlarda, +TIP proteinleri mikrotübüllerin labil bölgelerindeki polimerleşme dinamiklerini etkileyebilir ve bu süreçleri, örneğin büyüme konisinin işleyişinde görev alan diğer hücresel bileşenlerle koordine edebilir [140]. Ayrıca, mikrotübüllerin stabilizasyonunu sağlayan "arama ve yakalama" mekanizmasında da önemli rol oynarlar. Bu mekanizmada, dinamik kararsızlık sergileyen bir mikrotübül, genellikle hücre korteksindeki yapılar tarafından artı ucundan yakalanarak seçici biçimde stabilize edilir. Bu mekanizma, örneğin hücrenin çevresel bir uyarana yanıt olarak göç yönüne karşılık gelen tarafında mikrotübüllerin stabil hale getirilmesinde kritik bir rol oynayabilir [141].

EB (uç bağlayıcı) proteinlerin, tubulinlerin nükleotid durumunu algıladığı ve in-vitroda anlık MT stabilitesinden sorumlu bölgeyi tanıdığı gösterilmiştir [142, 143]. Memelilerde üç adet EB ya da EB1-benzeri protein bulunmaktadır: EB1, EB2 ve EB3 [144]. EB1, ilk olarak APC'nin (Adenomatous Polyposis Coli) karboksil ucu ile etkileşime giren bir protein olarak tanımlanmıştır ve bu nedenle "uç-bağlayıcı" (end-binding) ismini almıştır [145]. EB proteinleri, her bir monomerinde iki korunmuş bölgeyi bir bağlayıcı bölge aracılığıyla birbirine bağlayan, göreceli olarak küçük dimerik proteinlerdir. EB proteinlerinin amino ucunda yer alan kalponin homolog (CH) bölgesi, mikrotübüllerle etkileşimi sağlar ve büyüyen mikrotübül uçlarının tanınması için yeterlidir [146, 147]. Karboksil ucunda bulunan sarmal-sarmal (coiled-coil) yapı hem homodimer hem de heterodimer oluşumundan sorumludur [148]. Bu yapıda ayrıca, EB1-benzeri proteinlerin diğer +TIP proteinlerle etkileşimini sağlayan özgün bir motif olan EB homoloji (EBH) bölgesi yer almaktadır [149].

EB proteinlerinin sarmal-sarma (coiled-coil) bölgesi, dört sarmaldan oluşan bir demetle sonlanır ve hidrofobik bir boşluk ile polar bir yüzey içermektedir. EB proteinlerinin sarmal-sarma bölgesi ve karboksil ucu, diğer +TIP proteinlerinde bulunan SxIP ve CAP-Gly motiflerine bağlanır. EB proteinleri sitoplazmada otoinhibisyonu ve mikrotübüller ile diğer +TIP proteinlerinin artı uçlardaki etkileşimini mümkün kılmaktadır [150].

Hücrelerde ve izole edilen MT'lerde yapılan çalışmalar, EB proteinlerinin MT'lerin uçlarını kuyruklu yıldız benzeri bir dağılımla süslediğini ve MT'nin en ucundan hafifçe kaydığını göstermiştir [151-153]. EB proteinlerinin GTP/GDP-Pi durumundaki tubulinleri tanıdığı ve bu

tubulinlerin GDP'ye geçişinin birinci dereceden stokastik bir süreç olduğu varsayımıyla, mikrotübüller üzerindeki EB profilleri ortalama alınarak tek bir üstel azalma fonksiyonu ile modellenmiş; bu yolla büyüme fazındaki karakteristik kuyruk uzunluğu belirlenmiştir [152, 154, 155].

Büyüyen mikrotübüller, reaksiyon karışımına düşük oranda floresanla işaretlenmiş tübülün eklenmesiyle veya EB3 gibi floresanla etiketlenmiş mikrotübül ilişkili proteinler (MAP'lar) kullanılarak izlenebilmektedir [156]. Floresanla etiketlenmiş EB proteinleri, büyüyen MT'leri izlemek ve nöronal hücrelerde in vitro ve in vivo MT organizasyonunu araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır [78, 157, 158]. Ancak, mikrotübül tabanlı yapıların bir araya gelmesi sadece +TIP'lere bağlı olmayıp aynı zamanda nörona spesifik tubulin izotiplerini, translasyon sonrası modifikasyonları , motor proteinleri ve çeşitli MAP'lar gibi pek çok düzenleyici faktörün koordineli eylemlerini de gerektirmektedir [124, 130].

2.10. Mikrotübül fonksiyonları

Mikrotübüller; hücre farklılaşması ve göçü, mitoz ve vezikül taşınması dahil çok sayıda hücre içi süreçte gerekli olan hücre iskelet unsurlarıdır. Birçok hücrede, mikrotübül ağı, bir mikrotübülün bir ucu (eksi uç) nukleusa yakın gömülü ve diğer ucu (artı uç) sitoplazmik boşluğu keşfederek büyüme ve küçülme bölümleri arasında geçiş yaparak radyal bir şekilde organize edilir. Hücresel polarizasyon ve göç için gerekli olan MT'ler, benzersiz yapısal ve fiziksel özellikler sergilemektedir. Yapılarının modülasyonu, olgunlaşmamış uzantıların aksonlara veya dendritlere farklılaşması için önemlidir [159].

Mikrotübüller nöronun erken gelişim aşamalarında örneğin soma göçü ve uzayan aksonun ucundaki büyüme konisinin ipucuna bağımlı navigasyonunda, nöronun uygun şeklinin korunmasında, aksonal ve dendritik taşımanın desteklenmesinde, yaşlılıkta bile bilişsel esnekliğe karşılık gelebilecek dendrit morfolojisindeki değişiklikler gibi yaşam boyunca önemli pek çok süreçte rol almaktadır [26]. Son yirmi yılda yapılan araştırmalar, özellikle dinamik mikrotübüllerin hem presinaptik hem de postsinaptik alanlardaki sinaptik yapıya ve fonksiyona önemli ölçüde katkı sağladığını ortaya koymuştur [160, 161].

MT'ler, nöronal morfolojiyi ve işlevi kontrol eden motor proteinler tarafından üretilen kuvvet dönüştürücüleri olarak rol almaktadır. MT yapısının önemi, beyin kusurları veya bozuklukları

gösteren hastalarda tubulin genlerindeki ve MT ile ilgili proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların tanımlanmasıyla da vurgulanmaktadır [159].

2.11. Aksonal dejenerasyon

Aksonal dejenerasyon, aksonların seçici olarak yok edildiği önemli bir gelişimsel olay olmakla birlikte yaşlanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkar ve nörodejeneratif hastalıklarda (NH) nöronal fonksiyon bozukluğunun oluşmasında belirleyici bir rol oynar [162, 163]. Yapılan çalışmalar aksonal dejenerasyonun NH'lerde nöronal hücre ölümünden önce meydana gelen erken bir olay olduğunu göstermektedir [164, 165]. Aksonal dejenerasyonun hücre soma kaybından önce ve özellikle ALS, PH ve AH dahil olmak üzere yaşa bağlı farklı hastalık modellerinde klinik semptomların başlamasından önce meydana geldiği gösterilmektedir [165-167].

Yapılan bir sinir transeksiyonu sonrasında, somadan ayrılmış (desomatize) yabanıl tip aksonların latent faz, aksonal fragmentasyon ve aksonal dağılma olmak üzere üç evreden geçtiği gösterilmiştir. Latent faz henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da farelerde sinir hasarından sonraki 1–2 gün boyunca aksonların morfolojik olarak bütünlüklerini koruduğu ve aksiyon potansiyelini iletebildiği bilinmektedir [168, 169]. Sürecin son aşamasında ise akson içindeki tüm yapılar parçalanır. Aksonal iskeletin parçalanmasını önce miyelin dejenerasyonu ardından hücresel döküntülerin uzaklaştırılması için makrofaj infiltrasyonu izler [170].

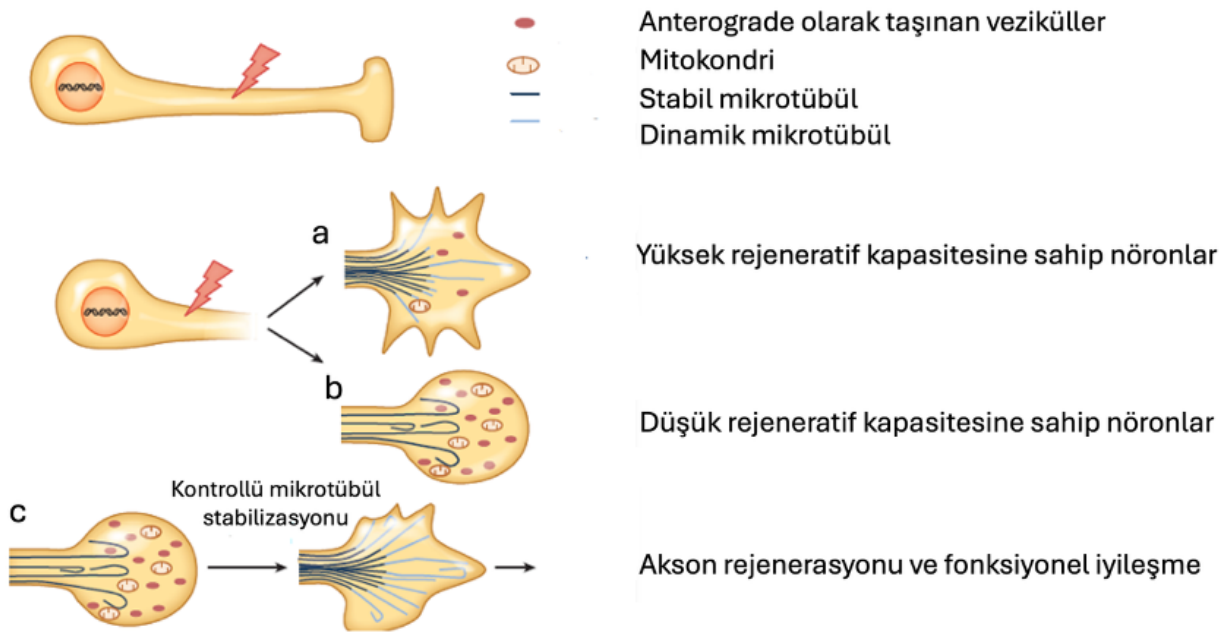
Akson hasarı sonrasında gerçekleşen rejenerasyon, nöronal homeostazda kapsamlı ve koordineli değişiklikler gerektirir. Aksonların yeniden uzayabilmesi için, büyüme konisi oluşumunu destekleyen lokal hücre iskeleti modifikasyonlarına, aksonal uzamayı sağlayacak yapı taşlarının taşınmasına, hasar sinyallerinin retrograde taşınımına, mitokondriyal trafiğin düzgün biçimde düzenlenmesine, pro-regeneratif programları başlatacak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve epigenetik modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır [171-174].

2.12. Merkezi sinir sistemi ve periferal sinir sisteminde rejenerasyon

Periferal nöronların kendi kendini onarma yeteneği ve içsel büyüme programlarının hızlı bir şekilde yeniden aktivasyonu nedeniyle, PSS'deki aksonlar hasardan sonra kendiliğinden rejenere olabilir. Bir aksonun distal kısmı, yaralanmadan sonra nöronal hücre gövdesinden ayrılır, akson bütünlüğünün bozulmasına ve parçalanmasına neden olan Wallerian

dejenerasyonu ortaya çıkar. Glial hücreler, özellikle makrofajlar tarafından döküntülerin temizlenmesi, PSS aksonal rejenerasyonunun önemli bir bileşenini oluşturarak aksonal rejenerasyon sürecini engelleyen skar (yara) oluşumunu önlemektedir [175, 176].

MSS'de başarısız ve yetersiz aksonal rejenerasyon, kısmen MSS'in değişmiş proteomik profiline, özellikle de hasar görmüş aksonların etrafındaki hücre dışı ortamın rolüne bağlanmaktadır. Hasar sonrası, oligodendrosit prekürsör hücreler, reaktif astrositler ve reaktif makrofajlar lezyon bölgesine göç ederek MSS aksonlarının büyümesi için engelleyici bir ortam oluşturan miyelin ilişkili inhibitörleri, kondroitin sülfat proteoglikanları (CSPG) ve sitokinleri salgılar [177]. Mikrotübül stabilizasyonu, merkezi ve periferal aksonlar arasındaki ikinci farktır. Hasar sonrasında, çoğu MSS aksonu geri çekilir ve yalnızca kısa mesafede minimal akson tomurcuklanmasına izin verir. MSS'in engelleyici ortamına maruz kalmaları nedeniyle, tomurcuklanan aksonların distrofik ve şişmiş uçları, büyüme konilerinde mikrotübüllerin stabilizasyonunu başlatamaz. Önceki araştırmalara göre, MSS'deki geri çekilme ampullerinde, PSS büyüme konilerinde bulunan düzenli mikrotübül demetlerinin aksine, düzensiz mikrotübüller yer almaktadır [178]. DLK – MAP2K7 – JNK1 sinyalizasyon modülünün fare hipokampal nöron kültürlerinde nörit uzaması sırasında mikrotübül demetlenmesini düzenlediği gösterilmiştir [179].



Şekil 2-4. Nöron hasarını takiben proksimal segmentin hücresel yanıtları [180].

2.12.1. Akson rejenerasyonunda içsel faktörlerin rolü

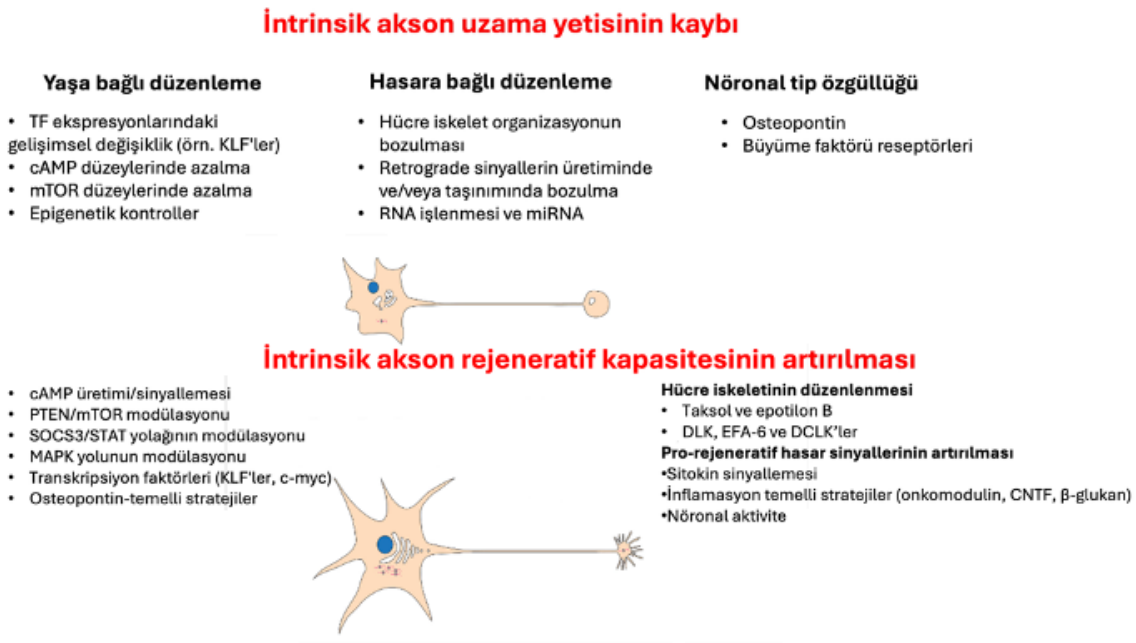
Periferik sinir onarımı biçimindeki akson rejenerasyonu, 12. yüzyıldan beri ve muhtemelen daha öncesinden bu yana klinik uygulamada yer alırken, omurilik yaralanmaları antik çağlardan beri tedavi edilemez olarak kabul edilmektedir [181]. Cajal, periferik sinir sisteminde (PSS) rejenerasyon ve merkezi sinir sisteminde (MSS) bu sürecin başarısızlığı üzerine çeşitli çalışmalar yapmış, Tello ile birlikte MSS'ye periferik sinir grefti implante ederek tarihteki ilk MSS rejenerasyon deneyini gerçekleştirmiştir [182].

Periferik sinirlerde rejenerasyonun başarılı olması, ancak merkezi sinir sisteminde (MSS) başarısız olması, periferik sinir sistemi (PSS) ortamının rejenerasyonu destekleyici, MSS ortamının ise inhibitör olduğu yönünde açık bir hipotez ortaya koymaktadır. Bu görüş, Tello ve Cajal'ın greftleme deneyiyle desteklenmiş ve Aguayo ile çalışma arkadaşlarının periferik sinirleri MSS'ye greftleyerek modern yöntemlerle rejeneratif aksonları izledikleri çalışmalarla pekiştirilmiştir [183, 184]. Hücre gövdesi greft bölgesine yakın olan bazı MSS nöronlarının, PSS ortamına doğru aksonlarını yeniden uzatabildikleri gösterilmiştir. MSS ortamında çeşitli inhibitör moleküller mevcuttur ve bazıları yaralanma sonrası artmakta veya salınmaktadır.

Başlıca inhibitör moleküller; NogoA (oligodendrositlerde bulunur), kondroitin sülfat proteoglikanlar (CSPG'ler) (glialar tarafından üretilir), miyelin ilişkili glikoprotein (MAG) (miyelin oluşturan glialar), oligodendrosit miyelin glikoproteini (OMgp), Semaforin 3A (perivasküler ve meningeal hücreler) ve Tenascin-C (astrositlerden salınır)'dir [1].

Periferik sinirlerde aksonların rejenerasyona uğramasına karşın omurilikte bu sürecin gerçekleşmemesinin sebebinin çevresel koşullardan kaynaklandığı düşünülüyordu. Aksonların kendilerine ait özellikleri büyük ölçüde göz ardı edilmişti. Ancak bu görüşün oldukça basitleştirilmiş olduğu ve farklı akson tiplerinin büyüme ve rejenerasyon yeteneklerinin oldukça değişken olduğu anlaşılmıştır. Bu konudaki ilk kanıt, embriyonik MSS dokusunun erişkin MSS içine greftlenmesiyle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Eğer greftlenen embriyonik nöronlar, embriyo gelişimi sırasında normalde aksonlarını uzattıkları olgunluk evresinde greftlenmişlerse, bu nöronlardan çıkan aksonlar, çok sayıda inhibitör molekül içeren inhibitör erişkin MSS ortamında bile uzun mesafeler boyunca büyüyebilmiştir. Omurilik, striatum, substantia nigra ve hipokampüsten elde edilen greftler, erişkin MSS'ye aksonal projeksiyonlar gönderebilmiş ve çoğu durumda bu aksonların konak nöronlarla sinaps oluşturduğuna dair çalışmalar da gösterilmiştir [185-187]. İnsan embriyolarından alınan greflerde ise aksonal büyümenin çok daha yoğun olduğu gözlenmiştir [188]. Greftlenen omurilik ve diğer MSS nöronlarının erişkin MSS içinde nörit uzatabilme yeteneği, yalnızca uygun gelişim evresindeki embriyonik nöronlarla sınırlıdır (genellikle sinaps oluşturmadan önceki evre) [189] . Örneğin, retina ganglion hücreleri, retina ve retinal amakrin hücrelerinden gelen sinyaller nedeniyle olgunlaştıkça akson uzatma yeteneklerini kaybetmektedir [190].

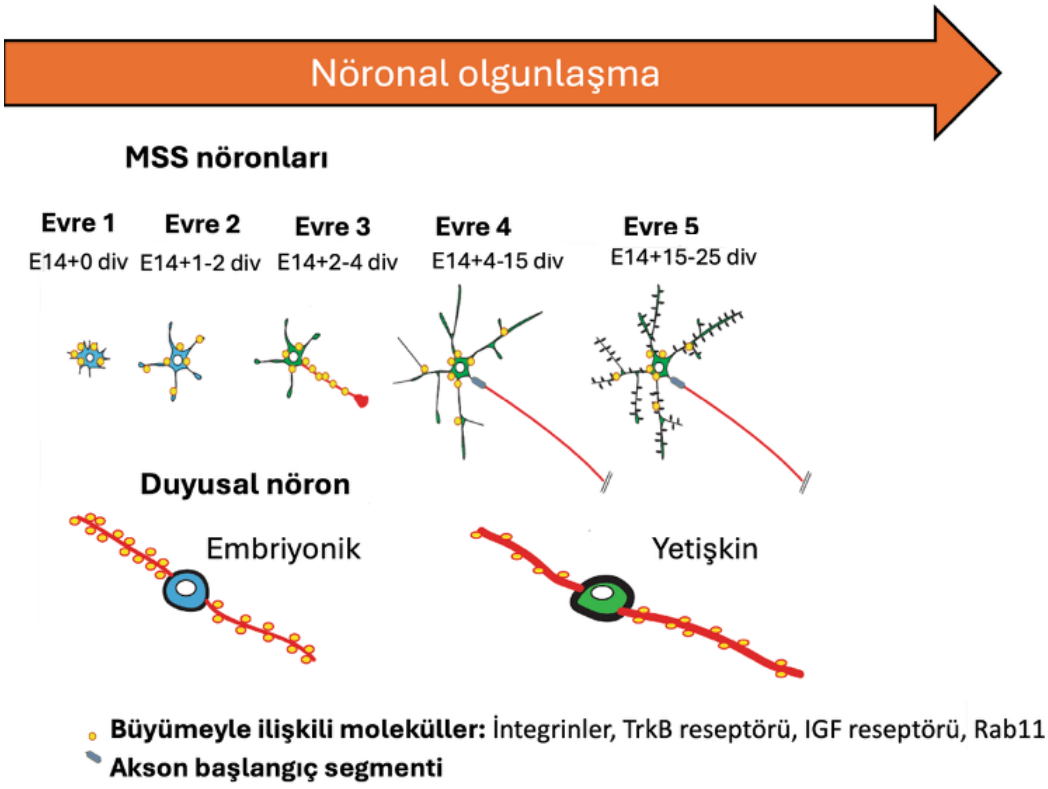
E18 günlük sıçanlardan elde edilen kortikal nöronlar, normal gelişim sırasında omuriliğe ve diğer beyin bölgelerine projeksiyon aksonları göndermeye başladıkları evrededir. Bu nöronlar kültüre yerleştirildiklerinde hızla dendrit ve akson geliştirmektedir. Eğer akson bir lazerle kesilirse, %80 oranında rejenerasyon gözlenmektedir. Sonraki haftalarda bu nöronlar uzun uzantılar oluşturur, çok sayıda sinaps geliştirir, spontan elektriksel aktivite gösterir ve gen ekspresyonları erişkin desenine geçer. Bu nöronlar olgunlaştıkça, kesilen aksonlarının rejenerasyon oranının %10'un altına düştüğü gösterilmiştir [191]. Yaralanan aksonların rejenerasyon yeteneği nöronun yaşı ve kimliğine göre değişmektedir [192]. Nöronların olgunlaştıkça aksonal rejenerasyon yeteneğini kaybetmesinin aksonların yapısal/fonksiyonel değişimi ve nöronlarda bulunan moleküler bileşenlerdeki genetik ve epigenetik değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 2-5) [1].



Şekil 2-5. İçsel rejeneratif kontrol basamaklarının farklı yönlerini hedefleyen rejeneratif stratejilerin geliştirilmesi [178]**.**

2.12.1.1. Aksonal mekanizmalar

Aksonlar; hücre membranında bulunan adezyon molekülleri, reseptörler, iyon kanalları ve mekanosensitif proteinler aracılığıyla çevreleri ile etkileşimlerini gerçekleştirmekle birlikte aksonal uzamada, membran ve çevre ile kurulan etkileşim sürecini içermektedir. Rejenerasyon sürecindeki aksonlar ekstraselüler matriksi (ECM) aşarak ilerler; bu nedenle ECM glikoproteinlerine bağlanan integrinler, rejenerasyon için gereklidir. PSS çeşitli integrinler rejenerasyon sırasında artar ve aksonun büyümesi için zorunludur [193]. MSS'de ise integrin ekspresyonu olgunlukla birlikte genel olarak azalmakta ve integrinler aksonlardan seçici olarak dışlanmaktadır (Şekil 2-6).



Şekil 2-6. Büyüme ile ilişkili moleküllerin aksonal taşınmasındaki değişiklikler [1].

Gelişimsel büyüme sürecinde tüm nöronlar, büyüme ile ilişkili molekülleri hem aksonlara hem de dendritlere taşır. MSS nöronları olgunlaştıkça, somatik, dendritik ve aksonal bölgeler şeklinde bölümlenmeye başlar. Bu bölgesel ayrışma, moleküllerin seçici taşınması yoluyla aksonların işlevsel olarak özelleşmesini sağlar ve bu süreçte birçok büyüme ile ilişkili molekül aksonlardan dışlanır. Duyusal nöronlar ise bu derece bir bölgesel ayrışma göstermez ve büyüme ile ilişkili moleküllerin aksonlara taşınması erişkinlik döneminde de devam eder. Nöronlar, işlevsel olarak özelleştikçe dendrit ve aksonların bu farklılıkların sağlanabilmesi için özgül moleküllerini uygun bölgelere taşıması gerekmektedir. Bu doğrultuda, molekülleri ve taşıma veziküllerini doğru yerlere yönlendiren karmaşık mekanizmalar gelişmiştir. Bazı moleküller doğrudan Golgi aygıtından dendrit ya da aksonlara yönlendirilir; ancak çoğu molekül önce hücre gövdesi membranına yerleştirilir, ardından hücre içine alınarak geri dönüşüm yolu aracılığıyla yönlendirilir [194].

2.12.1.2. Aksonal sinyal iletimi

Aksonal büyüme, özellikle büyüme faktörü reseptörleri (ERK, AKT), integrinler (FAK), küçük GTPazlar ve kalsiyum gibi çeşitli sinyal iletim yolları tarafından kontrol edilir. Bu sinyal yolakları, hücre iskeleti polimerizasyonu ve motor aktivitesi, transport, taşınım, gen ekspresyonu ve epigenetik dahil olmak üzere büyümeyi kontrol eden tüm mekanizmaları etkilemektedir. RhoA, birçok inhibitör yolun (özellikle NogoA ve CSPG'ler) bu rota üzerinden sinyal ilettiğinin anlaşılmasıyla ön plana çıkmıştır [1]. Büyüme faktörü reseptörleri, PIP2'yi fosforile ederek güçlü bir büyüme uyarıcısı olan PIP3'ü üreten PI3 kinazı aktive eder. PIP3, PH veya FYVE domain içeren birçok protein üzerinde etki göstererek çok sayıda işlevsel sonuca yol açar. Bu etkilerin çoğu AKT-mTOR yolakları üzerinden gerçekleşmektedir [195].

DLK, aksonlarda protein sentezini düzenlemektedir. Özellikle CEBP-1 transkripsiyon faktörünün sentezini kontrol eder. DLK'nın aynı zamanda kinesin-13 aracılığıyla mikrotübül dinamiklerini etkilediği gösterilmiştir [196, 197].

Kalsiyum, aksotomiye verilen yanıtlarda merkezi rol oynamaktadır. Aksotomi sonrasında, hasarlanmış membran yolu ile akson ucuna yüksek miktarda kalsiyum girer ve internal depolardan kalsiyum salınımına yol açar. Kesilmiş aksonların çoğu uzun süreli ve yüksek frekansta ateşleme yaparak hem tüm aksona hem de hücre gövdesine daha fazla kalsiyum girişine neden olmaktadır [171]. Bu kalsiyum sinyalleri, metalloenzimlerin aktivasyonunu başlatarak geri çekilme ampulünün oluşumunu ve çeşitli sinyal yolaklarını aktive ederek retrograde sinyallemenin merkezi bir parçası olan lokal protein translasyonunu tetiklemektedir [172].

Akson rejenerasyonu, yalnızca aksonun yeniden inşasında gerekli yapı taşlarının temin edilmesi durumunda gerçekleşebilir. Aksonal transport oldukça yavaş gerçekleşmektedir. En hızlı halinde dahi günde yaklaşık 25 cm'lik bir hızla ilerlemektedir. Hasar sinyallerinin hücre gövdesine ulaşması, protein sentezini başlatması ve sentezlenen bu yeni proteinlerin kesilmiş akson ucuna ulaşması oldukça zaman almaktadır. Lokal protein sentezi, gelişimsel dönemde aksonun büyümesi ve yönlendirilmesinin temel süreçlerinden biri olmakla birlikte büyüme konisi kaynaklı sinyal iletimini de düzenleyebilmektedir [198]. Aksotomiye yanıt olarak genetik programları kontrol eden retrograde sinyal iletim molekülleri örneğin importin beta ve

STAT3 lokal olarak üretilmektedir. Translasyona uğrayan mRNA'lar arasında aktin, tubülin, GAP-43 bulunmaktadır [199, 200].

2.12.1.3. Aksonal hücre iskeleti

Aksonal büyüme, hücre iskeleti tarafından yönlendirilmektedir. Büyüme konisinin filopod ve lamellipodlarında yer alan aktin, çevredeki yapılar ile adezyon molekülleri aracılığıyla bağlantılıdır ve miyozin aracılığıyla aksona uygulanan çekme kuvveti ile büyümeyi sağlar. Bu süreç, mikrotübüller tarafından da desteklenmektedir. Aksotomi sonrasında ortaya çıkan hücre iskeleti olaylarına ilişkin bilgilerimiz, Aplysia gibi büyük aksonlara sahip organizmalardan, C. elegans aksonlarının rejenerasyon modellerinden ve memeli aksonlarına in vitro ve in vivo olarak uygulanan aksotomi çalışmalarından elde edilmiştir [171]. İlk olay, aksonun kesilen ucunun geri çekilmesi ve ardından bir geri çekilme ampulünün oluşmasıdır. Bu olaylar, dış ortamdan aksona giren ve aynı zamanda hücre içi depolardan salınan kalsiyum düzeylerinde meydana gelen ani artışla tetiklenmektedir [201]. Kalsiyum, hücre iskeleti elemanları ile aktin ve spektrin içeren submembranöz tabakayı sindiren çeşitli proteazları aktive eder. Geri çekilme ampulünün içinde içinde rastgele düzenlenmiş mikrotübüller ve transport veziküllerinin biriktiği görülmektedir [202, 203]. Kısa süre içinde yeni mikrotübüllerin oluşumu başlamaktadır. Bu durum, mikrotübül uçlarına bağlanan proteinlerin sayısındaki artışla izlenebilmektedir. Aynı zamanda aktin filamentleri de yeniden oluşmaktadır [30].

Rejenerasyon kapasitesine sahip aksonlarda, gelişimsel dönemdeki büyüme konisine benzeyen yeni bir büyüme konisi oluşabilirken; MSS aksonları gibi rejenerasyon yeteneği olmayan aksonlarda, geri çekilme ampulü saatlerce dinamik yapısını korusa da yeni bir büyüme konisi oluşturamamaktadır [191, 204, 205]. Yapılan bir çalışmada yetişkin memeli MSS'de rejenerasyon eksikliğinin, hasarlanmış aksonların yeniden büyüme yeteneğinin azalmasına da bağlı olduğu gösterilmiştir [174]. Büyüyen akson uçlarında tirozinlenmiş, dinamik mikrotübüller bulunmaktadır [119, 206]. Azalmış detirozinasyon, optik sinir, siyatik sinir ve duyu aksonlarında Kif3C ile etkileşim yoluyla artmış rejenerasyon ile ilişkilendirilmiştir [207, 208].

2.12.1.4. Genetik ve epigenetik mekanizmalar

Rejenerasyona yetkin nöronlarda, hasar sinyallemesi soma içine yayılan bir retrograde kalsiyum dalgası gerektiren hızlı bir faz ve motor proteinler tarafından sinyal moleküllerinin retrograde taşınmasıyla karakterize edilen yavaş faz olmak üzere iki farklı geçici fazda meydana gelmektedir. Rejenerasyon-kompetan nöronlarda, aksonal membran kopması ile voltaja bağlı sodyum kanallarının açılması ve Na + / Ca^2 + değişim pompalarının değişmesi, hasar bölgesine kalsiyum iyonlarının akışını teşvik etmektedir. Bir kalsiyum dalgası, L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanallarının (VGCC'ler) hareketleri ve endoplazmik retikulumdan ryanodin reseptörleri yoluyla kalsiyum salınımı ile soma'ya yayılır [209]. Bu erken retrograde sinyal kalsiyumdur. Hasar bölgesindeki sızıntı nedeniyle kalsiyum seviyeleri hızla artar ve bu durum, hücre içi depolardan daha fazla bir kalsiyum salınımını tetikler [210]. Hücre içi kalsiyum, hasardan sonra hem akson hem de somada milimolar konsantrasyonlara ulaşır [211]. Kalsiyumun aşağı akışında yer alan çok yönlü bir sinyal iletici molekül, ikinci haberci olan siklik adenozin monofosfattır (cAMP). Sıçan dorsal kök gangliyonu (DRG) nöronlarında cAMP düzeyleri, nöronal aksonal büyüme kapasitesi ile pozitif korelasyon göstermektedir [32]. Periferik sinir hasarını takiben, kalsiyum bağımlı bir enzim olan adenilat siklaz tarafından sentezlenen cAMP, evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş ve rejeneratif süreçleri destekleyici bir kinaz olan çift lösin fermuar motif taşıyan kinazın (DLK; mitojenle ilişkili protein kinaz kinaz kinaz 12, MAP3K12 olarak da bilinir) de dahil olduğu çeşitli kritik proteinlerin aktivitesini modüle etmektedir [212-214]. Bu uyarılar, hücre gövdesinde gen ekspresyonunu değiştirir, sinyal yolaklarını aktive eder ve lezyon bölgesinde lokal translasyonu başlatarak retrograde sinyallerin oluşumunu tetikler. STAT3, DLK ve JNK gibi moleküller importin-β ve vimentin ile retrograde olarak taşınmaktadır [205]. Biyoinformatik bir çalışma, ATF3, EGR1, FOS, JUN, MYC, RELA, SMAD1 ve STAT3 gibi, aksotomi yanıtını yöneten merkezi transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir çekirdek grubu tanımlamıştır [210].

Nöronların olgunlaşma ile içsel rejeneratif yeteneklerini kaybettikleri bilinmektedir. Olgun nöronlarda, kromatin bölgelerinin maskelenmiş olması, ekspresyonu sağlanan transkripsiyon faktörlerinin beklenen rejeneratif etkileri göstermesini engellemektedir. Duyusal nöronlarda, aksotomi sonrası rejenerasyonla ilişkili genetik programın ekspresyonu, etkileşim bölgelerinin açılmasını sağlayan epigenetik değişimlerle mümkün hale gelmektedir. Histon

modifikasyonları, özellikle asetilasyon, histon asetiltransferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) tarafından düzenlenmektedir [215].

MSS kortikal nöronların olgunlaşması sırasında genomda erişilebilir bölgelerde büyük değişiklikler olmaktadır. Erişilebilir bölgelerin yalnızca %30'u hem olgun olmayan hem de olgun evrede ortaktır. Yetişkinlikte maskelenen genlerin çoğu akson büyümesiyle ilişkili iken; her iki evrede de erişilebilir kalan genler ise çoğunlukla homeostaz, veziküler taşıma ve iyon taşıması ile ilişkilidir [216].

Hasar sinyallemesinin daha yavaş fazına, hücre dışı sinyalle ilişkili kinazlar (ERK'ler), DLK, JUN N-terminal kinaz (JNK) ve STAT3 dahil olmak üzere çeşitli hasara duyarlı sinyal proteinlerinin retrograde taşınması aracılık etmektedir [167, 217-220]. MAP kinaz kinaz 1 (MAPKK1) ya da MAPKK2'nin (ERK upstreaminde yer alan MAP kinaz kinazlar) inhibisyonu ya da vimentin geninin delesyonu, periferik akson rejenerasyonunu anlamlı düzeyde azaltmaktadır [221]. Serin/treonin-protein kinaz B-raf'ın (BRAF; MAPKK1 ve MAPKK2) up streaminde yer alan bir MAPKK kinazın (MAPKKK) konstitutif aktivasyonunun erişkin omuriliğinde güçlü aksonal yeniden uzamayı indüklemek için yeterli olduğu gösterilmiştir [222].

2.12.2. Akson rejenerasyonunda dışsal faktörlerin rolü

Hem hasarlı aksonların dış ortamından türetilen dışsal faktörlerin hem de yetişkin MSS nöronlarının rejenerasyonundaki zayıf içsel potansiyelin aksonal rejenerasyonu ve filizlenmeyi sınırladığı kabul edilmektedir. CSPG, MAG, Nogo ve oligodendrosit-miyelin glikoproteini (OMgp) gibi hasarlı bölgelerin etrafındaki glial yara izlerinden salgılanan büyümeyi baskılayıcı moleküllerdir [223-226]. Bu dış inhibitör sinyallerin önlenmesi, akson rejenerasyonunu teşvik etmek için umut verici yaklaşımlar arasında yer almaktadır.

2.13. Rejenerasyon ile ilişkili sinyal yolakları

Gelişmekte olan nöronlarda, aksonun oluşması ve uzaması; zamansal ve mekânsal olarak düzenlenen özgün sinyalizasyon yolakları tarafından sıkı biçimde kontrol edilmekte ve koordine edilmektedir [227, 228]. Bu sinyal yolakları, büyüme konisindeki hücre iskeleti

dinamiklerini ve somada gen ekspresyonunu düzenleyerek nöronal morfogenez üzerinde belirleyici rol oynar. Ancak erişkin dönemdeki yaralanmış nöronlarda, bu sinyalizasyon süreçleri hem mekânsal hem de zamansal düzeyde bozulmakta, bazı yolaklar ise aksonal uzama ve nöronal hayatta kalım üzerinde birbirine zıt etkiler göstermektedir [180].

2.13.1. Akson rejenerasyonunda MAPK sinyalizasyonu

MAPKKK'ler (Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz Kinazlar), çevresel değişiklikleri ve hücrelerin içsel durumlarını algılayarak, sinyale bağlı ve hücreye özgü yanıtları başlatır. 1990'lı yılların ortalarında, kinaz keşiflerinin yoğunlaştığı bir dönemde, beyne özgü olarak zenginleşmiş iki yakın ilişkili kinaz tanımlanmıştır: Çift lösin fermuarı taşıyan kinaz (DLK, aynı zamanda ZPK ve MUK olarak da bilinir) ile lösin fermuarı taşıyan kinaz (LZK) [229, 230].

MAPK'lar (Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinazlar), hücre içine sinyal iletimini üç basamaklı bir kinaz kaskadı aracılığıyla gerçekleştirirler.

1. MAP3K'lerden (Raf1, Cot1, DLK veya ASK1/TAK1/PTK1)
2. MAP2K'lere (MEK1/2, MEK5, MKK7/MEK4 veya MEK3/6) ve
3. MAPK'lara (ERK1/2, ERK5, JNK'ler, p38 kinazları).

MAPK'lar (Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz); hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon, rejenerasyon, stres yanıtı ve apoptozun düzenleyicileridir. Nöronlarda, MAPK sinyalleşmesinin aksonal rejenerasyon ve dejenerasyonda rol oynadığı gösterilmiştir. Bu moleküllerin kaybı distal dejenerasyonu yavaşlatmakta ve proksimal nörit uzamasını engellemektedir [193, 231-233].

MAPK'lar çeşitli transkripsiyon faktörlerini (örneğin c-Fos, c-Jun, PU.1, MEF2, ATF2, c-Myc ve Sp1) aktive eder; bu da proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümü gibi süreçleri düzenleyen genlerin ekspresyonunu tetiklemektedir [234]. MAPK kinaz kinaz kinaz olan ikili lösin fermuar kinazı (DLK) aksonal hasar sinyallemesinin olası bir düzenleyicisi olarak dikkat çekmektedir. DLK sinyal yolakları, aksonal büyüme ve nöronal migrasyondan apoptoz ve akson dejenerasyonuna kadar sinir sistemi gelişiminin çeşitli yönlerini düzenleyen sinyal yolaklarından biridir. DLK sinyallemesinin, hasar sonrası hem nörodejenerasyonu hem de rejenerasyonu kontrol etmede önemli bir rol oynadığı da ortaya konulmuştur. DLK, gelişim

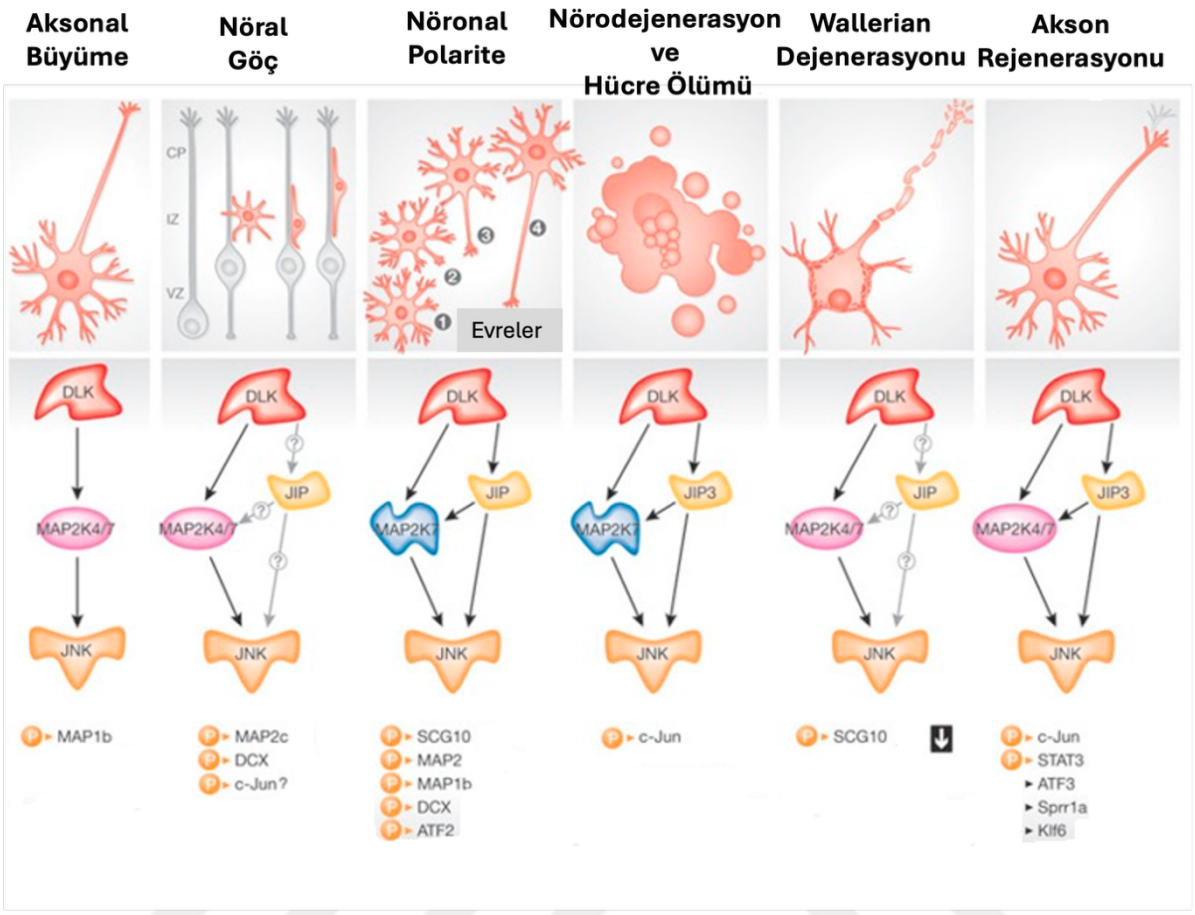
sürecinde ve aksonal hasar sonrası kritik koşullar altında birbirine zıt yanıtları başlatan bir ana sensör işlevi görebilir. Memelilerde DLK, Ca^{2+} bağlanması yoluyla aktivitenin düzenlenmesini sağlayan bölgeden yoksundur [235].

DLK, in vitro sistemlerde JNK (c-Jun N-terminal kinaz) aktivasyonunu indüklemektedir [236]. Memelilerde aktive edilmiş JNK, nükleer substratlar (transkripsiyon faktörleri, hormon reseptörleri, HNRPK ve TIF-IA) ile protein yıkımı (E3 ubiquitin ligaz Itch), apoptoz (Bcl-2 ailesi üyeleri Bax ve Bad), sinyal iletimi (JIP1, Shc) ve hücre hareketi (keratin 8, DCX, MAP1B ve MAP2B, tau, SCG10, kinesin, paxillin) gibi çok çeşitli hücresel süreçlerde görev alan nükleer olmayan substratları fosforile eder [22]. Bu nedenle, JNK yolağı, mikrotübül düzenleyici bu proteinleri harekete geçiren aday bir sinyal yolağıdır [19].

MAP kinazlar, mikrotübül dinamiğinin güçlü düzenleyicileridir [237]. DLK hem JNK'leri hem de p38α–δ MAPK yolaklarını aktive eden bir MAP3K (Mitojen-ile aktive olan protein kinase kinase kinase) olarak işlev görür [230, 236]. MAPK yolakları, sırasıyla MAP3K, MAP2K ve MAPK'den oluşan üç basamaklı modüler kaskadlar halinde düzenlenmektedir. Bu modüler yapı, DLK sinyallemesinin çok çeşitli uyarılara yanıt olarak düzenlenmesine olanak tanır. Transkripsiyon faktörleri, iskelet sistemi bileşenleri, membran transport proteinleri ve diğer protein kinazlar dahil olmak üzere çok sayıda hedefin fosforilasyona-bağlı olarak modülasyonuna yol açar.

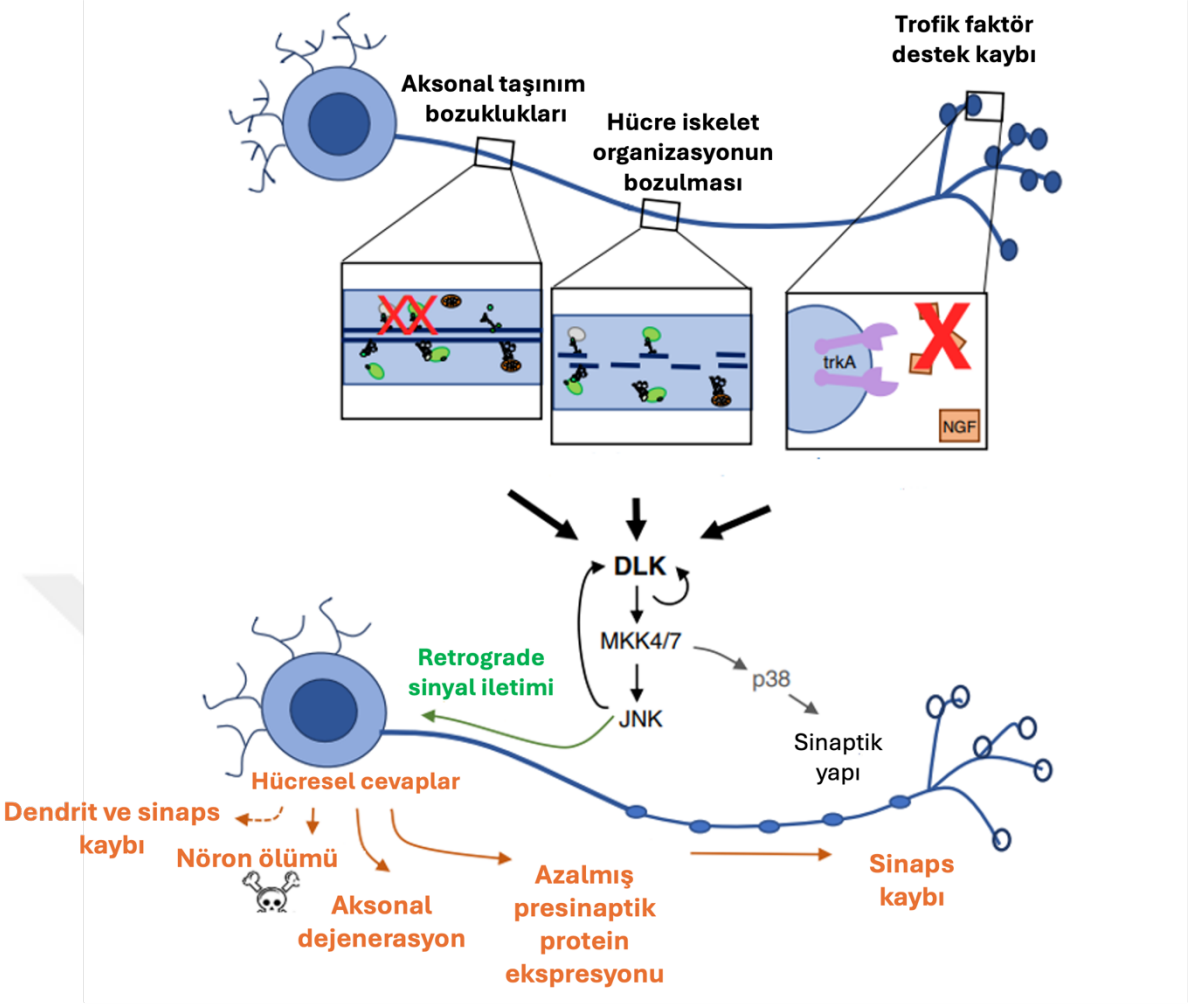
DLK–JNK sinyal yolağı in vivoda nöral gelişim sürecinde akson oluşumu ve nöronal migrasyonun yanı sıra nöronal apoptoz ve akson dejenerasyonu gibi süreçlerde farklı roller üstlenmektedir (Şekil 2-7) [235]. Kortikal nöronların in vitro polarizasyonu sırasında, DLK–JNK yolağı, evre 1'den evre 3'e geçiş süreci olan büyüyen akson aracılığıyla nöronal polaritenin belirlendiği aşamada belirgin bir rol oynamaktadır. Bu işlev, mikrotübül stabilitesinin zamanında düzenlenmesine bağlıdır [19].

Çeşitli model sistemlerinde akson rejenerasyonunun teşvik edilmesinde DLK'nın rolü ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda, DLK homologları DLK-1 (Caenorhabditis elegans) ve Wallenda (Drosophila)'nın yaralanma sonrasında sırasıyla aksonun yeniden büyümesini ve rejenerasyonunu düzenlediği gösterilmiştir [197, 214, 219].



Şekil 2-7. DLK yolağı, memeli nöronlarında çelişkili yanıtları düzenlemektedir [235].

DLK proteini, aksonlarda lokalizedir ve gelişmekte olan memeli sinir sisteminde beyin, omurilik ve duyu gangliyonları gibi çeşitli anatomik bölgelerde eksprese edilmektedir [238, 239]. DLK proteini aynı zamanda büyüme konisinde de bulunmakta ve nukleustaki stres yolaklarını aktive etmek için retrograde olarak taşınabilmektedir [237, 240]. DLK aktivasyonuna yol açan stres faktörleri Şekil 2-8'te gösterilmiştir.



Şekil 2-8. DLK'nin aktivasyonuna yol açan aksonal stres faktörleri [241]**.**

DLK aktivasyonuna yol açan aksonal stres örnekleri: Aksonal transport bozuklukları, aksonal hücre iskelet yapısının bozulması ve trofik faktör sinyallemesinin inhibisyonu sonucunda DLK aracılı sinyal yolağı aktive edilir. Hücresel yanıtlar arasında presinaptik proteinlerin ekspresyon düzeylerinde azalma ve postsinaptik reseptör fonksiyonu ile sinaptik homeostaz mekanizmalarını bozan, henüz tanımlanmamış sinyaller yer almaktadır**.**

DLK proteini, yüksek derecede korunmuş bir ubiquitin ligaz olan Pam/Highwire/Rpm-1 (PHR) tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir [237]. Bu baskılamanın, bazı akson yönlendirme kararları, aksonların doğru bölgelerde sonlanması, presinaptik yapının oluşumu ve dendrit dallarının gelişimi açısından önemli olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, DLK'nın baskılanması ile aktifleşmesi arasındaki denge, sinir sistemi gelişiminin belirli zaman noktalarında kritik bir rol oynamaktadır [241, 242].

DLK geninin homozigot delesyonuna sahip (null mutant) farelerde, nöronal migrasyon bozuklukları ile ön komissür ve korpus kallozum gibi bazı majör aksonal traktuslarda hipoplazi gözlemlenmiştir [238, 243, 244]. Fare kortikal nöronlarında DLK susturulmasına bağlı olarak ortaya çıkan akson oluşum bozukluklarının, aktif JNK1'in ekspresyonu ile kurtarılabildiği gösterilmiştir [19]. Retina gangliyon hücrelerinde (RGH) yapılan optik sinir ezilme hasarı sonrasında akson ve hücre gövdelerinde DLK protein düzeylerinde hızlı bir artış ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bununla birlikte RGH'lerde hem proapoptotik hem de rejenerasyon ile ilişkili genlerin indüksiyonu gerçekleşir. Retinada DLK delesyonunun ise optik sinir hasarından sonra RGH'lerin dejenerasyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir [245].

Hücre iskeleti bileşenleri de büyüyen aksonlara yapısal destek sağlamaktadır. Aktin temelli hücre iskeletinin sürekli yeniden modellenmesi ve mikrotübül stabilitesindeki değişiklikler, nöronal polarizasyonu etkilemektedir [111, 246, 247]. SCG10, MAP2, tau, MAP1B, CLIP proteinleri ve DCX gibi birçok mikrotübül düzenleyici protein akson oluşumunu düzenlemektedir [248-250]. DLK–JNK yolaklarının substratları olan SCG10, DCX ve MAP2 gibi mikrotübül düzenleyicilerin susturulması, kültürdeki fare kortikal nöronlarında çok kutuplu hücrelerin birikimine neden olmaktadır [19].

Akson oluşumunu kontrol etmeye ek olarak, DLK-JNK yolağı, fare kortikogenezi sırasında radyal göçün önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir [238, 251, 252]. Yeni üretilen nöronların radyal ve teğetsel göçü neokorteks oluşumuna katkıda bulunur ve genellikle akson oluşumu ile ilişkilidir [40, 253]. DLK ve fosfo-JNK'lerin ekspresyonunun, 16. embriyonik günde (E) fare kortikal intermediate bölgede ventriküler bölge ve kortikal plağa göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Radyal glia hücre mimarisini etkilemeksizin, DLK geninin mutasyonunun in vivoda kortikal plak boyunca nöronların yanlış yerleşimine neden olduğu gösterilmiştir [238].

Superior servikal ganglion 10 (SCG10) olarak bilinen protein, stathmin-benzeri protein ailesine ait, büyüme ile ilişkili nöronal bir proteindir ve nöronların büyüme konilerinde zengin olarak bulunur; aynı zamanda JNK substratıdır. SCG10, mikrotübülleri destabilize eden bir etkiye sahiptir. SCG10'un Ser62 ve Ser73 kalıntılarının JNK tarafından fosforilasyonu mikrotübül destabilize edici aktivitesini azaltır ve bu sayede nöronlar strese maruz kaldığında büyüme konisinde mikrotübül oluşumunun kontrolü sağlanabilir [254]. SCG10 aynı zamanda gelişmekte olan ve rejenerasyon sürecindeki aksonlarda yüksek düzeyde eksprese edilen büyüme ile ilişkili nöronal protein olarak bilinmektedir [255].

JNK'ler nörit büyümesini ve nöronal göçü modüle etmek için doublekortinleri fosforile eder [256]. DCX, post-mitotik olgunlaşmamış nöronlar için bir belirteç olarak kullanılır ve yetişkin nörogenezinin bir göstergesidir [257].

DCX, mikrotübülleri stabilize eden, evrimsel olarak korunmuş doublekortin (DC) domainleri aracılığıyla mikrotübüllerle etkileşen bir mikrotübül ilişkili proteindir [258, 259]. JNK sinyal yolağının nöronal migrasyonla ilişkisi ilk kez, serebral kortekste radyal olarak göç eden nöronlarda JNK aktivitesinin artması ile gözlemlenmiş ve dominant JNK mutantı ya da JNK inhibitörü SP600125 uygulamasının migrasyonunu azaltması ile ortaya konulmuştur [252].

JNK, 14-3-3 proteinlerini de fosforilleyebilmektedir. Bu sitozolik bağlayıcı protein ailesinin, hücre proliferasyonu ve ölümü de dâhil olmak üzere birçok biyolojik süreçte rol oynadığı gösterilmiştir [260]. 14-3-3 proteinleri genellikle, R-S-X-p(S/T)-X-P motifine sahip fosfoproteinlerle etkileşir [261]. Bu etkileşim, 14-3-3 proteinlerinin bağlandıkları partnerleri sitoplazmada tutarak onların hücre içi hedeflenme motiflerini örneğin nükleer lokalizasyon sinyallerinin maskelenmesine olanak tanır [262, 263]. Dolayısıyla, 14-3-3 proteinlerinin bu etkileşimlerinin herhangi bir şekilde bozulması, bağlandıkları proteinlerin hücre içindeki farklı bölgelere taşınmasını mümkün kılabilir.

2.14. Vitamin D (1,25 dihidroksivitamin-D3)

Vitamin D, mantar kaynaklı formu olan D vitamini 2 (ergokalsiferol) ve hayvansal kaynaklı formu olan vitamini D3 (kolekalsiferol) dâhil olmak üzere, sekosteroid hormonlar grubunu oluşturmaktadır. Bu iki form, sırasıyla 25-hidroksilaz ve 1-α -hidroksilaz olmak üzere iki farklı P450 enzimi aracılığıyla gerçekleştirilen iki aşamalı hidroksilasyon sonrası, aktif form olan 1,25-$(OH)_2D_3$ yani kalsitriol'e dönüşmektedir [264].

Vücudumuz vitamin D'yi hem diyet ile hem de deride gerçekleşen biyosentez yoluyla elde eder. Vitamin D 'nin doğal formu olan D3 vitamini, deride 7-dehidrokolesterolden sentezlenir. UVB ışınımı, deride öncül madde olan 7-dehidrokolesterolü, önce pre-D3 vitaminine ardından da D3 vitaminine dönüştürür. Derideki sentez, D3 vitamini için temel bir kaynak olup mevsim ve coğrafi enlem gibi çevresel faktörlere duyarlıdır [265].

İnsan ve domuz modellerinde yapılan çalışmalar, D3 vitamininin esas olarak yağ dokusunda (yaklaşık dörtte üç oranında) ve daha düşük miktarlarda kas, karaciğer ve deri gibi diğer

dokularda dağıldığını göstermektedir. 25-(OH)D3'ün dağılımı ise farklı bölmelerde benzer şekilde gerçekleşmektedir (serum %30; kas %20; yağ dokusu %35; diğer dokular %15) [266].

Genetik manipülasyon yapılan fare modelleri, vitamin D'nin sadece klasik hedef dokularında değil, aynı zamanda iskelet dışı sistemlerde de (örneğin kanser ilerlemesinin engellenmesi, kardiyovasküler etkiler, otoimmün hastalıkların düzenlenmesi) önemli rol oynadığını ortaya koymuştur [265].

2.14.1. Vitamin D metabolizması

Vitamin D3 tek başına biyolojik olarak aktif değildir. Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D_3 (1,25-$(OH)_2D_3$), iki farklı basamakta ve farklı organlarda gerçekleşen hidroksilasyon ile üretilmektedir. Sentezlendikten (veya diyet yoluyla alındıktan) sonra vitamin D ve metabolitleri, kanda taşınmalarını sağlayan D vitamini bağlayıcı proteinlere (DBP) bağlanır. DBP'ler, vitamin D_3'ü karaciğere taşır ve burada C-25 pozisyonunda ilk hidroksilasyon tepkimesi gerçekleşerek 25-$(OH)D_3$ oluşur. 25-$(OH)D_3$, vitamin D'nin dolaşımdaki başlıca formudur. Bu nedenle vücuttaki vitamin D düzeyinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.

Karaciğerde vitamin D metabolizmasında görev alan temel 25-hidroksilaz enzim CYP2R1'dir [267]. 25-$(OH)D_3$ daha sonra böbreğe taşınır; burada süzülerek, DBP için yüzey reseptörleri ve megalin/kubulin kompleksi aracılığıyla proksimal renal tübül epitel hücrelerine alınır [268, 269]. Proksimal renal tübüllerde, 25-$(OH)D_3$, renal 25-$(OH)D_3$ 1α-hidroksilaz (CYP27B1) tarafından C-1 pozisyonunda hidroksile edilerek 1,25-$(OH)_2D_3$ sentezlenir. Bu form, kalsitriol olarak da bilinir ve biyolojik olarak aktiftir [270, 271].

Dolaşımdaki 1,25-$(OH)_2D_3$ seviyeleri C-24 pozisyonunda hidroksilasyon gerçekleştiren bir diğer hidroksilaz olan CYP24A1 enzimi aracılığıyla düzenlenir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan 24,25-$(OH)_2D_3$, 1,25-$(OH)_2D_3$'ün atılımını kolaylaştırabilir veya C-1 pozisyonundaki hidroksilasyon için kullanılabilir öncül havuzunu azaltarak biyolojik etkinliğini sınırlayabilir[272]. CYP24A1 ayrıca, 1,25-$(OH)_2D_3$'ü ve 25-$(OH)D_3$'ü sırasıyla 1,25-$(OH)_2D_3$-26,23 lakton ve 25-$(OH)D_3$-26,23 lakton türevlerine dönüştürür. Vitamin D reseptörlerini (VDR) eksprese eden hücrelerin büyük çoğunluğunda CYP24A1'in bulunması, bu enzimin yalnızca dolaşımdaki 1,25-$(OH)_2D_3$ düzeylerini değil, aynı zamanda hücre içi düzeylerini de lokal olarak düzenleyebileceğini göstermektedir [273]. Vitamin D'nin metabolizmasının

merkezi sinir sisteminde, özellikle de beyinde gerçekleştiğine dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [6, 274-276].

2.14.2. Vitamin D Reseptörü (VDR)

Endokrin bir hormon olan $1,25(OH)_2D_3$, nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan transkripsiyon faktörü vitamin D reseptörüne (VDR) yüksek afinite ile bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler [277]. Bağlanmamış VDR'nin ise sürekli olarak nukleus ile sitoplazma arasında taşındığını gösterilmiştir [278].

VDR, sıçanlarda olduğu gibi insanlarda da embriyonik beyin boyunca yaygın şekilde dağılmış olup, özellikle nöroepitelyum ve proliferatif bölgelerde belirgin şekilde bulunmaktadır [279-283]. Retinoik X reseptörü (RXR) ailesinin nükleer reseptörleri ile heterodimerizasyondan sonra, VDR ve ligandı, yüzlerce hedef genin promotör bölgelerinde bulunan vitamin D'ye cevap veren elemanlara (VDRE) bağlanır [284].

VDR'nin etkisi, gen ekspresyonunun aktivasyonu ya da inhibisyonunu sağlayan demetiltransferaz ve RNA polimeraz gibi enzimatik aktiviteleri içeren, henüz tam olarak tanımlanmamış birçok faktöre bağlıdır. VDR tarafından hedeflenen genlerden bazıları, $1,25-(OH)_2D_3$'ü bağlayarak onun aktivasyonunu sağlayan ya da yıkımını başlatan proteinleri kodlamaktadır. Bu durum, güneş ışığına aşırı maruziyet veya yüksek düzeyde diyetle alım sonucunda oluşabilecek vitamin D toksisitesine karşı, otoregülatör bir mekanizmanın varlığına işaret etmektedir. VDR'nin hedef genleri arasında, ağrı iletim yollarında rol oynayan proteinleri kodlayan genler de bulunmaktadır. Bu genler arasında büyüme faktörü reseptörleri, iyon kanalları, nörotrofik faktörler ile nöronal akson büyümesini modüle eden proteinler yer almaktadır [285].

Genomik etkilere ek olarak, transkripsiyonel düzenlemeden bağımsız şekilde gerçekleşen hızlı, genomik olmayan etkiler de $1,25(OH)_2D_3$ yanıtı olarak tanımlanmıştır. Bu etkilerin hücre tipine özgü olduğu ve fosfolipaz A2 (PLA2), fosfolipaz C (PLC), protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC), Ca^{2+}/kalmodulin-bağımlı protein kinaz (PKCaMII), mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK), Src tirozin fosforilasyonu ve fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K) gibi kinazlar aracılığıyla iletildiği bildirilmiştir [286-289].

$1,25(OH)_2D_3$ tarafından uyarılan ve genomik olmayan tamamen VDR'den bağımsız yeni bir membran reseptörü aracılığıyla hücresel işlevleri iletilebilmektedir [286, 290-292]. VDR'nin,

hücre membranı üzerinde bulunan caveola adı verilen bölgelerde lokalize olduğu ve membran reseptörlerinden biri olan Protein disülfit izomeraz ailesi A üyesi 3 (PDIA3, aynı zamanda 1,25D_3-MARRS ya da ERp57 olarak da adlandırılır) ile etkileşime girdiği veya onunla sinerjik bir şekilde çalıştığı gösterilmiştir [293-297]. 1,25$(OH)_2D_3$'ün klasik nüklear VDR içinde yer alan alternatif bir ligand bağlanma bölgesine bağlanarak non-genomik etkiler oluşturabildiği de rapor edilmiştir [298, 299]. Genomik olmayan yanıtların fizyolojik etkileri arasında; kalsiyum alınımı ve salınımının, hücre içi pH'ın, insülin sekresyonunun ve hücre göçünün düzenlenmesi yer almaktadır [288, 300].

2.14.3. Vitamin D'nin sinir sitemi üzerine etkileri

Vitamin D reseptörü (VDR), merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerinde geniş ölçüde eksprese edilmektedir. Kolekalsiferolün, biyosentezinde görev alan temel enzimlerin de beyin dokusunda da eksprese ediliyor olması, bu molekülün yalnızca sistemik değil, aynı zamanda parakrin ve otokrin etkilere sahip bir nörosteroid hormon gibi işlev gördüğünü düşündürmektedir [301]. VDR, sıçanlarda gelişimin erken dönemlerinde, embriyonik gün E12 ile E15 arasında tespit edilebilir; VDR seviyeleri sütten kesilmeye kadar (postnatal 21gün) artış göstermekte ve erişkin beyinde de varlığını sürdürmektedir [283, 302, 303].1,25$(OH)_2D_3$ çeşitli nörotrofik faktörlerin ve bunlara ait reseptörlerin ekspresyonunu indüklemektedir. Vitamin D sinir sistemi hücrelerinde; sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin 3 ve glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF) üretiminin artırılmasını uyarmaktadır [304-307]. Aynı zamanda nöroaktif bir madde olarak, parvalbumin gibi kalsiyum-bağlayıcı proteinlerin regülasyonda rol almaktadır [308]. Doğum öncesinde vitamin D eksikliğinin beyin gelişimini bozduğu, yetişkin dentat girusta büyüme faktörlerinin ve nörotrofin reseptörlerinin ekspresyonunu değiştirdiği; yetişkin hipovitaminoz D'nin ise, hipokampusun alt granüler bölgesindeki nöroblastların proliferasyonunu arttırdığı ve nöronal farklılaşmalarını değiştirdiği gösterilmektedir. Bu çalışmalar ile vitamin D'nin nörogenezin potansiyel bir modülatörü olabileceği düşünülmektedir [309, 310].

Vitamin D, farklı sinyal yolakları aracılığıyla nöroprotektif ve immun düzenleyici etkilere sahiptir; ve glioma hücre hatlarında pro-apoptotik özellikler göstermektedir [301]. Çeşitli hasar veya hastalık durumlarında örneğin iskemik olaylarda, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Multipl Skleroz, AIDS ya da diğer enfeksiyonlar nöronlar ve nöron dışı hücrelerde indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) sentezinin vitamin D tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir [311]. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda kortikal nöronlarda

Aβ1−42'nin VDR ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı ve vitamin D katabolizmasını hızlandıran enzim olan 25-hidroksivitamin D3 24-hidroksilaz (24OHaz)'ı indüklediği, VDR susturulmasının ise Aβ1−42 üretimini arttırarak nörodejenerasyona yol açabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, AH'nin patolojik özelliklerinden birinin VDR ve vitamin D metabolizmasına doğrudan etkisini gösteren ilk çalışmalardır [5, 6, 312]. Daha önce yürüttüğümüz çalışmalarda, vitamin D eksikliğinin yaşlı bireylerde ajitasyon, saldırganlık ve disinhibisyon alt puanlarının artışıyla ilişkili olduğu, ayrıca bilişsel gerileme ve demans riskini artırarak klinik tabloyu olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir [7-9]. Ayrıca, vitamin D eksikliğinin ApoEε4 alelini taşımayan Alzheimer hastalarında, ε4 taşıyıcılarına kıyasla daha yüksek riskle ilişkili olduğu da araştırma grubumuz tarafından ortaya konmuştur [313]. 1,25-dihidroksivitamin D3 ve reseptörlerinin, nöronlardaki amiloid işlenme yolaklarının önemli bileşenleri olduğu, vitamin D reseptörünün (VDR) nöronal plazma membranına lokalize olduğu ve APP işlenme sürecini düzenleyebileceği öne sürülmüştür [10, 11]. Ayrıca, VDR'nin mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) bağlanabildiği, mtDNA transkripsiyonunu düzenleyebildiği ve transkripsiyon faktörü A mitokondriyal (TFAM) ile etkileşime girdiği gösterilmiş; bu işlevlerin insan beyninde de gerçekleştiği ilk kez ortaya konmuştur [12]. Vitamin D ve reseptörlerinin Alzheimer hastalığı ve merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki rolleri, Gezen-Ak ve Dursun (2023) tarafından kapsamlı şekilde özetlenmiştir [13].

2.14.4. Vitamin D'nin rejenerasyon ile ilişkisi

Vitamin D ve akson rejenerasyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Sıçanlarda bir periferik sinir travmasının hayvan modelinde, vitamin D2 'nin aksogenezi, akson çapını ve fizyolojik olgunlaşmayı artıran güçlü bir nöromodülatör bileşik olduğu gösterilmektedir. Aynı zamanda Wallerian dejenerasyonunu sınırlayarak koruyucu bir rol oynayabilir [14].

Vitamin D uygulamasından sonra aksogenezde gözlenen artış, akson çapındaki artışla paraleldir. Başka bir sinir travması hayvan modelinde, yüksek dozda verilen kolekalsiferolün, proksimal uçta korunan veya yeni oluşan aksonların sayısını, distal uçtaki akson çapını ve hem distal hem de proksimal uçlarda nörit miyelinasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [314].

Sıçan kortikal nöron kültürlerinde vitamin D uygulamasının MAP2, GAP43 ve sinapsin-1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [306]. Buna paralel olarak, maternal hipovitaminoz D

sıçan modelinde, hücre iskeleti onarımında (nörofilament, tubulin, aktin, MAP2, glial fibriler asidik protein), organellerin moleküler taşınmasında (kreatin kinaz b, kinesin, RhoA, dinaktin) ve sinaptik plastisite (drebrin, GAP43, konneksin 43) yer alan transkriptlerin ve proteinlerin azaldığı gösterilmiştir [315, 316].

Hipokampal hücre kültürüne eklenen kalsitriolün nörit büyümesini arttırdığı gösterilmiştir [317]. Hamile sıçanların diyetinden vitamin D çıkarıldığında ise yenidoğan ve erişkin yavruların beyinlerinde NGF ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir [309, 318]. 16 günlük embriyonik hipokampal progenitör hücrelerde yapılan bir çalışmada vitamin D'nin P42/P44 MAPK seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir [21].

2.15. Primer Nöron Kültürü

Ayrışmış (disosiye,izole) primer nöron kültürleri, tek hücre düzeyinde ve ağ ölçeğinde, MSS gelişiminin yanı sıra nöronal olgunlaşma ve fonksiyonel aktiviteyi incelemek için mükemmel in vitro araçlardır. Bu kültürler, in vivo koşullara kıyasla daha kontrollü bir bağlamda mekanik olarak içyüzü anlamamızı sağlamaktadır [319, 320]. Primer nöronal kültürler üzerine yapılan çalışmalar, nöronal polarizasyon, nörit büyümesi, akson rehberliği (yol bulma), sinaptogenez ve nöronal ağ oluşumu, aktivite ve olgunlaşma gibi gelişimle ilgili birçok temel keşfe katkıda bulunmuş, in vivo olarak meydana gelen birçok olayı in vitroda özetlemiştir [321, 322].

Ayrıştırılmış nöron kültürleri ilk olarak embriyonik sıçanlardan geliştirilmiş (Banker ve Cowan, 1977), ancak kısa süreli kültürler ile (<5 gün) sınırlı kalmış veya doku ekstreleriyle birlikte ko-kültür gerektirmiştir. Daha sonra, olgun nöronlar ve uzun süreli çalışmalar için daha karmaşık nöronal kültür protokolleri geliştirilmiştir [323]. Primer nöronların kültürlenmesi için en sık kullanılan kaynak, geç embriyonik veya erken doğum sonrası (postnatal) kemirgenlerin (sıçanlar ve fareler) korteks veya hipokampüsüdür [320, 324]. Primer nöronlar, kültüre edildiklerinde birkaç gün veya hafta içinde belirgin şekilde ayrışmış akson, dendrit, dendritik dikenler ve sinapslar oluşturarak farklılaşabilirler. Kültür ortamı ve koşullarının değiştirilmesiyle, nöronal hayatta kalma, farklılaşma ve fenotipin çeşitli yönlerini yönlendiren birçok faktör belirlenmiştir [325]. Glial hücreler, kültürdeki nöronlar için kritik destek sağlamaktadır [326-328]. Glial proliferasyonu kontrol altına almak veya nöron-glia karışımını önlemek için çeşitli yöntemler tanımlanmıştır [324]. Laboratuvarımızda, son 20 yılı aşkın süredir E16–18 sıçan embriyolarından elde edilen primer nöron kültür protokolünü geliştirmiş

bulunmaktayız. Bu protokol, daha önce yayımlanmış çeşitli çalışmalarda başarıyla kullanılmıştır.

3. YÖNTEM

Çalışmada 15 adet Sprague Dawley cinsi hamile sıçandan alınan 16 günlük embriyolar kullanıldı. Embriyo beyinleri çıkarılarak serebral korteks bölgeleri diseksiyonla ayrıldı. Elde edilen nöronlar ile primer nöron kültürleri hazırlandı. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen nöron kültürleri, kültürdeki nöronlara vitamin D uygulamaları, canlı hücre görüntüleme ve akson hasar deneyleri, protein izolasyonları, western blot ve immunfloresan işaretleme deneyleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sinirbilim Anabilim Dalı, Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Primer Nöron Kültürünün Hazırlanması

Primer nöron kültürleri ekibimizin daha önce yayınlanan çalışmalarına göre gerçekleştirilmiştir [5, 6, 10, 11, 312, 329-332] .

3.1.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ve Embriyoların Eldesi

Deneylerde kullanılacak olan embriyoları elde etmek üzere her deney için Sprague-Dawley cinsi 5 dişi sıçan 2 erkek sıçanla bir gece birlikte bırakıldı. Ertesi gün vajinal yayma preparatı yapılarak fekondasyon kontrolü yapıldı. Yayma preparatında sperm pozitifliği bulunan dişi sıçanlar hamileliğin 0. gününde kabul edildi (0. embriyonik gün; E0). Ayrıca ertesi gün dişi sıçanlar ayrı bir kafese alınarak ağırlıkları da takip edildi. Ağırlık değişimleri 10-30 gr arasında ise gebelik negatif, 30-45 gr arasında ise şüpheli gebelik, 45 gr ve üzerinde ise gebelik olarak değerlendirildi. Aynı zamanda abdominal palpasyon ile yavruların varlığı fiziksel olarak tespit edildikten sonra vajinal plak tayini ile de gebeliğin teyidi gerçekleştirildi. Hamile sıçanlar 16. günde steril odada izofluran anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Maya, mantar ve bakteri kontaminasyonunu önlemek üzere %70 etanolde 5 dk bekletilen hamile sıçanlardan sezaryan çıkarılan embriyolar (E16) PBS (Gibco BRL 10010. Invitrogen Inc., New York, USA) içeren steril bir petriye alındı.

3.1.2. Petrilerin hazırlanması

Nöron kültürü 35 mm çapında 6 kuyulu plakalar (Corning 3506. Corning Inc. New York, USA), 24 kuyulu plakalar ve 100 mm'lik petriler kullanılarak yapıldı. Ekim yapılacak petriler deneyden bir gün önce aşağıdaki protokole göre poly-L-ornithine (Sigma P-4957. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) ile kaplanarak hazırlandı.

1. Stok poly-L-ornithine solusyonu, 750 µl poly-L-ornithine (PLO), 49,25 ml 0,20 µm filtreden (Sartorius 16534. Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, GE) geçirilmiş MiliQ dH2O ile karıştırılarak hazırlandı.

2. 35 mm'lik petrilere 1,5 ml PLO solusyonu konuldu.

3. PLO ile kaplanan petriler 37° C'deki, %5 CO2 içeren etüvde bir gece bekletildi.

4. Ertesi gün petriler 3 kere filtreden (0,20µm) geçirilmiş MiliQ dH2O ile yıkandı.

5. Her bir petriye 0,5 ml Leibovitz 15 + medyumu eklenerek kullanılıncaya kadar 37° C, %5 CO2 içeren etüvde bırakıldı.

3.1.3. Leibovitz 15 + (L-15+) medyumunun hazırlanması

L-15+ medyumu aşağıdaki protokole göre bir gün önceden hazırlandı.

1. 200 ml L-15 Medyum (GibcoBRL 11415-064. Invitrogen Inc., New York, USA) içine,

2. Conalbumin (Sigma C-7786. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 0,1 mg/ml

3. %7,5 Sodyum bikarbonat (GibcoBRL 25080-094. Invitrogen Inc., New York, USA), kültürdeki final konsantrasyon 0,63 mg/ml

4. Putrescine (Sigma P-7505. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 0,1 mM

5. Insülin (GibcoBRL 12585. Invitrogen Inc., New York, USA), kültürdeki final konsantrasyon 10 ng/ml

6. Sodyum selenit (Sigma S-5261. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 30 nM

7. Progesteron (Sigma P-6149. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 20 nM

8. Glikoz (Sigma G-7021. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 20 mM

9. PenStrep (Sigma P-4333 Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), kültürdeki final konsantrasyon 10 IU/ml olacak şekilde eklendi. L-15+ hazırlandıktan sonra 0,22 µ'luk filtreden geçirildi ve kullanılana kadar +4 o C'de saklandı.

3.1.4. Nörobazal + (NBM+) medyumunun hazırlanması

Serum içermeyen bir medyum olan Nörobazal medyum, 50 ml NBM'ye (GibcoBRL 21103-049. Invitrogen Inc., New York, USA), 1 ml B-27 (GibcoBRL 17504-044. Invitrogen Inc., New York, USA), 50 µl PenStrep (Sigma P-4333. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE), 350 µl %9'luk NaCl2 (Sigma S-3014. Sigma- Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) eklenerek hazırlandı. NBM+ hazırlandıktan sonra 0,22 µ'luk filtreden geçirildi ve kullanılana kadar +4 ^{o} C'de saklandı.

3.1.5. Serebral korteks diseksiyonu

Petriye alınan embriyolar Sınıf 100 Steril Oda içinde bulunan Sınıf II Biyolojik Güvenlik Kabinine alındı ve bundan sonraki tüm işlemler bu güvenlik kabini içinde gerçekleştirildi. Embriyoların beyinleri, kafa derisi ve kranial kemikler açılarak çıkartıldı. Beyinler steril PBS içeren steril bir petriye aktarıldı. Stereo mikroskop (Leica EZ4, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, GE) altında bistüri kullanılarak serebellum ayrıldı. 0,2 mm'lik pensler (Dumont tipi no:5) kullanılarak Goslin ve Banker'ın yöntemiyle [333]16 günlük embriyolardan sağ ve sol hemisfere ait meningial membrandan arındırılmış serebral korteksler çıkarıldı.

3.1.6. Primer kortikal nöron kültürünün hazırlanması

Serebral kortekslerin çıkartılmasından sonra primer nöron kültürleri aşağıdaki protokole göre hazırlandı

1. Tüm serebral korteksler çıkartıldıktan sonra steril PBS içeren ayrı petrilerde toplandı, iki bistüri kullanılarak küçük parçalara bölündü.

2. Petrinin içindeki dokular 5ml PBS içeren 15 ml'lik polipropilen tüpe alındı. Dokuların çökmesi beklendi, fazla PBS atıldı.

3. Dokuların üzerine 1 ml % 4 BSA (GibcoBRL 15260. GibcoBRL 25080-094. Invitrogen Inc., New York, USA) ve 3 ml L-15+ medyumundan oluşan 4 ml'lik karışım eklendi.

4. Hücreler, cam pipet kullanılarak homojen hale gelene kadar karıştırıldı.

5. Bu karışım 4 ml %4 BSA içeren tüpe BSA'nın üzerinde bir katman oluşturacak şekilde eklendi.

6. 1000 RPM'de 2 dk boyunca santrifüj edildi.

7. Üst sıvı dikkatlice atıldı.

8. Çökelti üzerine 8 ml L-15+ medyumu eklendikten sonra 1000 RPM'de 3 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst sıvı atıldı ve çökelti üzerine 10 ml L-15+ medyumu eklenip cam pastör pipeti ile 2-3 kere karıştırıldı.

9. Hücre sayısı hemasitometre ile aşağıda açıklandığı gibi hesaplandı. Hücreler, 35 mm'lik petriye, her bir petride 1,5 ml (L-15+ medyumu) total hacim içerisinde $6x10^5$ hücre olacak şekilde ekildi.

10. 24 saat sonra tüm petrilerden L-15+ medyumu tamamen alınarak yerine 1,5 ml NBM+ medyumu konuldu. Daha sonra her iki-üç günde bir NBM+ medyumunun yarısı taze NBM+ medyumu ile değiştirildi.

11. Vitamin D'nin nöron gelişimi üzerine etkisini incelemek üzere NBM+ geçildiği esnada vitamin D ve etanol uygulamaları gerçekleştirildi. Uygulamalar 7.güne kadar devam edildi.

12. Nöronlar aksonal hasar deneylerini gerçekleştirmek üzere olgunlaşmaları için 37^o C'de, %5 CO2 içeren etüvde 7 gün bekletildi. Vitamin D ve etanol uygulamaları aksonal hasar modeli oluşturulduktan sonra gerçekleştirildi.

3.1.7. Hemasitometri ile hücre sayımı

1. Polipropilen tüpte toplanan hücrelerden 10 µl alınıp temiz bir tüpe konuldu.

2. Üzerine 10 µl tripan mavisi (GibcoBRL, 15250061. Invitrogen Inc., New York, USA) eklendi.

3. Hemasitometrinin her iki tarafına aldığı kadar ve eşit miktarda örnek konuldu.

4. İçine boya almamış ve parlak görünen hücreler canlı olarak değerlendirilerek sayıldı. Sayımlar iki ayrı araştırmacı tarafından tekrarlandı.

5. Toplam hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Toplam hücre sayısı = Hücre sayısı x 10^4/ml x hücrelerin içinde bulunduğu L15+ medyumunun miktarı x 2

Ekim yapılacak 35 mm'lik petri sayısı = Toplam hücre sayısı / $6x10^5$

3.1.8. Ekimi yapılan primer nöronların olgunlaşması

Primer kortikal nöron kültüründeki hücreler ekimi takip eden 7 gün içerisinde akson ve dendritlerini uzatarak olgun nöronlar haline geldi.

3.1.9. Kültürdeki hücrelerin nöron/glia ayrımının yapılması

Kültürdeki hücreler nöron ve gliaya özgü antikorlar kullanılarak immünfloresan yöntemi ile işaretlendi (Şekil 4-1). Nöronların ayrımı nöron belirteci olan MAP2 primer antikoru, glia hücreleri ise bir glial hücre belirteci olan glial fibriler asidik protein (GFAP) primer antikoru kullanılarak yapıldı. Primer antikorların uygulanmadığı sadece sekonder antikorların uygulandığı kültür hücreleri negatif kontrol olarak kullanıldı.

İmmünfloresan boyama protokolü

1. Gün:

1. Kültürdeki hücreler %3,7'lik paraformaldehit (Sigma 15,812-7. Sigma- Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içerisinde oda sıcaklığında 30 dk fikse edildi.

2. Hücreler 3 defa 10'ar dk 2 ml PBS ile yıkandı.

3. Hücreler % 0,02 triton X-100 (Sigma X-100. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içeren T-PBS içerisinde hazırlanan %30'luk normal keçi serumunda (Chemicon S26. Millipore Corp. California, USA) oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

4. Hücreler % 0,02 T-PBS ve % 1.5 keçi serumu içinde hazırlanan MAP2 (Thermo Fisher Scientific, MA5–12826) ve GFAP (Millipore AB5804. Millipore Corp. California, USA) antikoru ile sırasıyla 1:500 ve 1:400 oranında sulandırıldı, gece boyu + 4°C'de bekletildi.

2. Gün

5. 3 kere 10'ar dk oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı.

6. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler karanlık ortamda yapıldı. Hücreler % 1,5 keçi serumu % 0,02 T-PBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılan keçi anti-fare IgG, Alexa Flour 568 (Abcam, ab175473) ve 1:300 oranında sulandırılan keçi anti tavşan IgG Alexa Flour 488 (Thermo Fisher Scientific, A11034) sekonder antikorları ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. 3 kere 10’ar dk oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı

8. Hücreler 1:15000 oranında dH2O ile sulandırılmış 1 ml DAPI (4',6- Diamidino-2-Phenylindole) solusyonu içinde solüsyonu içinde 15 saniye bekletilip hemen çekildi.

9. Kapama medyumu (ThermoFisher, P36970) ile kapatıldı ve görüntüleme sistemi için BioTek Lionheart FX kullanıldı.

Her bir petrinin rastgele alanlarından TR, I3 ve A3 filtreleri ile çekilen 10’ar adet fotoğraf çakıştırıldı ve nöron ve glia hücrelerinin sayımı yapıldı. Sayım sonucunda nöron ve glia sayıları toplam hücre sayısına oranlanarak nöron/glia oranı saptandı (Şekil 4-1).

3.2. Primer kortikal nöron kültüründe gerçekleştirilen uygulamalar

3.2.1. 1,25 α-dihidroksivitamin D3 (Vitamin D) uygulamaları

1,25 α-dihidroksivitamin D3 uygulama doz ve sürelerinde ekibimizin önceki çalışmaları temel alındı [6, 10, 312, 331]. 10^{-4} M 1,25 α-dihidroksivitamin D3 (Sigma C-9756. Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim, GE) 1,5 ml NBM+ içeren petrilere, final konsantrasyon 10^{-8} M olacak şekilde 24, 48 , 72 , 96, 120 ve 144 saat süresince uygulandı. Uygulamalardan sonra protein izolasyonları ve immunfloresan işaretleme deneyleri gerçekleştirildi.

3.2.2. Plazmid ile EB3-GFP transdüksiyonunun gerçekleştirilmesi

Rat MAPRE3 genini taşıyan GFP etiketli lentiviral plazmid (OriGene, RR203870L4), ve GFP etiketli boş lentiviral plazmid olan MOCK (OriGene, PS100093) aşağıda verilen protokole göre çoğaltıldı. Plazmid izolasyonunun ardından, lentiviral plazmidler HEK293T hücre hattında paketlenerek çoğaltıldı. Elde edilen lentiviral partiküller, gen transferini sağlamak amacıyla primer nöron kültürlerine transdüksiyon yoluyla doğrudan uygulandı. Transdüksiyonu takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde transdüksiyonun başarısı plazmiddeki GFP etiketi ile kontrol edildi. Verimliliğin yüksek olduğu zaman aralığı belirlendikten sonra 1,25 α-dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamaları yapıldı.

3.2.2.1. MAPRE3 plazmidi ve boş plazmidin (MOCK Plazmid) çoğaltılması

Tablo 3-1. Luria-Bertani (LB) ve LB-Agar hazırlama protokolü

%0.5	Yeast Extract

85.6 mM	NaCl
% 0.5	Tryptone
100 mL	dH_2O

LB agar hazırlanması

% 1.5 AGAR

1. Tabloya göre hazırlanan 500 ml LB içerisine %1.5 (w/v) agar eklenerek LB-AGAR hazırlandı ve iyice karıştırıldı.
2. Erlenmayer alüminyum folyo ile kapatılıp 20 dakika otoklavlandıktan sonra çıkartılıp 55ºC'de soğumaya bırakıldı.
3. LB-AGAR ateşin yanında açılarak içerisine Alpha Gold Competent Cell için 34 µg/ml Kloramfenikol seleksiyon antibiyotiği eklendi ve nazikçe karıştırıldı.
4. LB-AGAR 100 mm'lik petrilere 15-20 ml olacak şekilde döküldü ve kapakları kapatıldıktan sonra agarın donması için gece boyu bırakıldı.

3.2.2.2. Bakteriyel transformasyon protokolü

Liyofilize halde gelen MAPRE3 plazmidi (OriGene RR203870L4) ve MOCK plazmidi (OriGene, PS100093) üzerine 100 µl dH_2O eklenerek 10 µg olacak şekilde çözündürüldü.

1. -80ºC'den çıkartılan Alpha Gold Competent Cell (OriGene CC100001) buz üzerine alındı ve tüp yavaşça alt üst edilerek hücreler karıştırıldı.
2. 50 µl Alpha Gold Competent Cell'e 2 µl *MAPRE3* plazmidi eklendi ve birkaç saniye nazikçe karıştırıldı.
3. 30 dakika süren buz üzerindeki inkübasyondan sonra 30-45 saniye 42 ºC'de su banyosunda bekletildi ve tekrar buza alınıp 2 dakika buz üzerinde bekletildi.
4. Transformasyon reaksiyonu 1 ml olacak şekilde katabolit içermeyen süper optimal medyum (SOC, Invıtrogen 15544-034) ile sulandırıldı. (50 µl hücre + plazmide, 950 µl SOC medyumu eklendi).
5. 37ºC'de 200 RPM'de 60 dakika çalkalanan tüplerden 200 µl alınarak antibiyotik içeren LB-agar petrilerine ekim yapıldı ve 37ºC'de gece boyu inkübe edildi.
6. Petriler inkübatörden çıkarıldı ve oluşan kolonilerden birkaçı pipet ucu ile toplandı.

7. Bu pipet ucu daha önce ısıtılıp 37ºC'ye getirilen ve içerisinde Kloramfenikol (34µg/ml) bulunan 5 ml LB'nin içerisine bırakıldı. Ağzı yarım kapatılıp kısmi şekilde bantlandı.
8. Yaklaşık olarak 6-7 saat 37ºC'de 200 RPM' de inkübe edildi.
9. İnkübasyon sırasında kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek üzere içerisinde hücre bulunmayan ve LB içeren bir tüp de eş zamanlı olarak inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrasında 5 ml LB'nin içerisinde üreme meydana geldi.
11. Tüp içerisinde hücreleri içeren 5ml LB daha önce ısıtılıp 37ºC'ye getirilen ve içerisinde Kloramfenikol bulunan 50 ml LB içeren bir erlenmayerin içerisine döküldü ve 37ºC 200 RPM' de gece boyu inkübe edildi.
12. Erlenmayer içerisinde üremenin olduğu bulanıklıktan ve kokudan teyit edildi.
13. Plazmid izolasyonuna başlandı.

MOCK-GFP plazmidinin çoğaltılması içinde aynı basamaklar gerçekleştirildi.

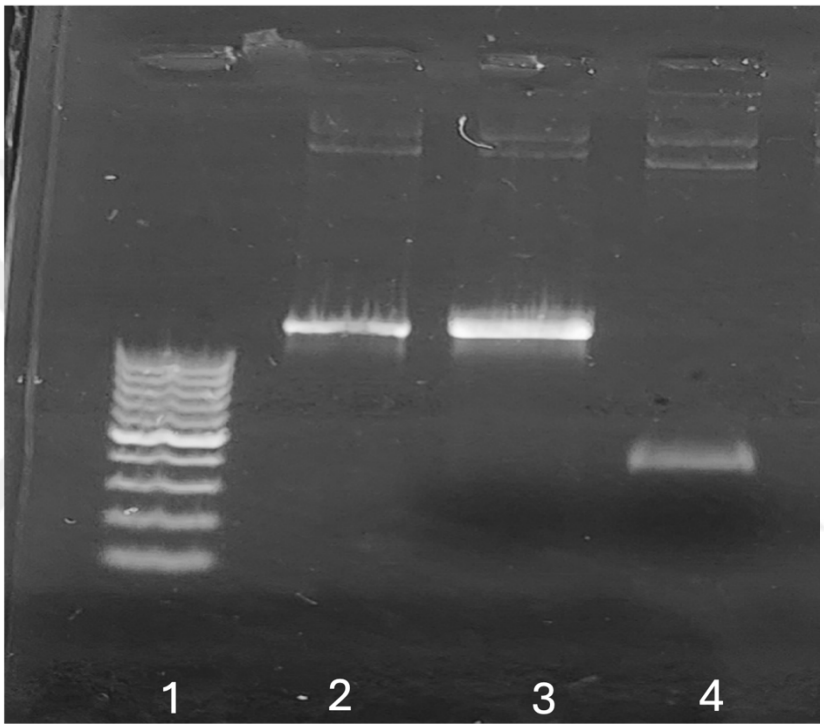
3.2.2.3. Plazmid İzolasyonu

PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (K2100-10 Invitrogen Inc., New York, USA) protokolüne uygun olarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Erlenmayerde bulunan plazmidler 15ml'lik tüplere 5 ml olacak şekilde alındı ve tüpler 15 dk 3900xg'de santrifüj edildi.
2. Hücreler çöktürüldü ve çökelti üzerine 250 µl R3 solüsyonu eklenerek homojen hale getirildi.
3. Tüplere L7 solüsyonu eklendi ve tüpler alt üst edilerek homojen hale getirildi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
4. Tüplere N4 solüsyonundan 350 µl eklendi ve hızlıca çalkalanarak 14.000xg'de 10 dk. santrifüj edildi.
5. Üst sıvı toplanıp toplama tüpü içerisindeki spin kolona konuldu ve 1 dk 12.000xg'de santrifüjlendi.
6. Her bir tüpe W9 solüsyonundan 700 µl konuldu ve 1 dk 12.000xg'de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve spin kolon yeni bir tüpe aktarılıldı.
7. Tüpler boş olarak 1 dk 12.000xg'de santrifüj edildi ve üst sıvı atılarak 65ºC'de ısıtılan TE solüsyonundan konuldu ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
8. 2 dk 12.000xg'de santrifüj edildi ve spin kolon atılarak plazmid DNA'sı elde edildi.

3.2.2.4. DNA saflığı ve miktarının tespiti

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların saflık ve miktar tayini Nanodrop One (Astranet Systems Ltd Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. MAPRE3 (EB3) veya Boş Plazmid (MOCK plazmid) varlığını göstermek üzere polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu MAPRE3 ve MOCK genine ait elde edilen bantlar gözlemlendi (Şekil 3-1).



Şekil 3-1. Plazmid DNA'larının agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi.

1. 100 baz çiftlik DNA belirteci. 2 ve 3. MAPRE3 plazmid DNA'ları (1573 baz çifti) 4. MOCK plazmid DNA'sı.

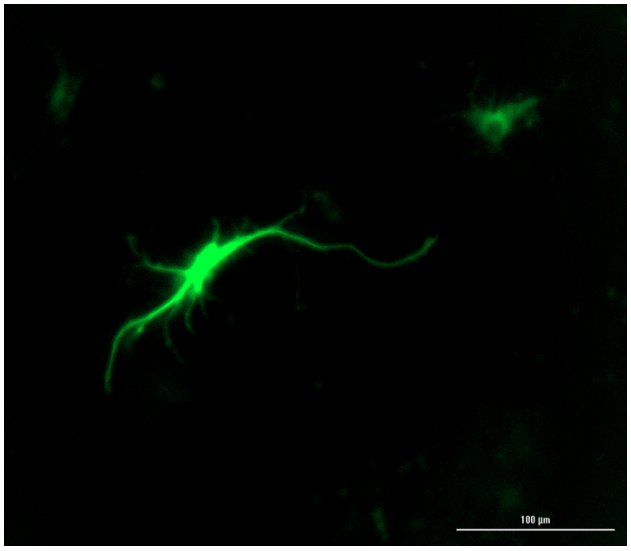
3.2.3. Lentiviral partikül üretimi için transfeksiyon protokolü

1. 100 mm'lik petrilere HEK293T hücreleri ekildi. Hücrelerin yoğunluğu %70 olduğunda transfeksiyon deneyine başlandı.
2. Lentiviral paketleme kiti (TR30037,OriGene) 120 µL ultra saf su ile çözülerek homojen hale getirildi (0,5 µg/µl). Kısa süreli santrifüj yapıldı.
3. 1 ml DMEM (Gibco,41966-029) içine MAPRE3 taşıyan 10 µg plazmid ve 20 µL lentiviral paketleme plazmidi (10 µg/µl) eklendi. Karışım homojenize edildi.

4. Ayrı bir tüpte, 1 mL DMEM (Gibco, 41966-029) içerisine 80 µL DNAfectin ™ Plus transfeksiyon ajanı (G2500, abm) eklendi.
5. Her iki karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
6. Transfeksiyon ajanı içeren karışım, plazmid ve paketleme plazmidi karışımının üzerine konuldu. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
7. Daha sonra bu karışımın üzerine 4.5 mL DMEM (Gibco, 41966-029) eklendi ve %70 yoğunluğa sahip HEK293T hücrelerinin bulunduğu petri kabına uygulandı.
8. Hücreler 37°C ve %5 CO_2 koşullarında 5 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyon süresinin ardından, hücrelerin bulunduğu medyumdan 3.5 ml alındı ve üzerine konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS (Gibco,10270106) eklendi.
10. Transfeksiyonun 24. saatinde medyum değişimi yapıldı.
11. Transfeksiyonun 48. saatinde süpernatant toplanarak 4°C'de 3000 × g'de 15 dakika santrifüj edildi.
12. Üst sıvı dikkatlice yeni bir 50 ml'lik tüpe aktarıldı ve 0.45 µm por çapına sahip filtreden geçirildi. Elde edilen viral süpernatant -80°C'de saklandı.

3.2.4. Primer nöron kültüründe lentiviral transdüksiyon protokolü

1. Primer kortikal nöronlar, kültürün 2. gününde NBM, B27 ve NaCl içeren antibiyotiksiz medyuma geçirildi.
2. 24 kuyulu petrilere kuyu başında 250 µl antibiyotik içermeyen NBM medyumu ve 250 µl MAPRE3-GFP ve MOCK-GFP lentiviral süpernatantları (viral partikül konsantrasyonuna göre belirlenmiş hacimde) eklendi.
3. Hücreler, viral partiküllerle birlikte 37°C, %5 CO_2 atmosferinde 16 saat inkübe edildi.
4. Transdüksiyondan 16 saat sonra, viral partiküllerin hücrelerden uzaklaştırılması için antibiyotik içermeyen NBM^+ medyumu ile medyum değişimi yapıldı.
5. Hücrelerin GFP ekspresyonu, floresan mikroskop altında izlenerek transdüksiyon etkinliği değerlendirildi. En yüksek GFP sinyalinin gözlendiği zaman noktası 72 saat olarak belirlendi (Şekil 3-2). 10^{-8} M 1,25 α-dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamaları yapıldı.



Şekil 3-2. Kortikal nöron kültüründe MAPRE3-GFP transdüksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin gösterilmesi.

GFP kuyruğu takip edilerek en yüksek ışımanın MAPRE3-GFP transdüksiyonundan 72 saat sonra gerçekleştiği gösterilmiştir.

3.2.5. Akson dejenenerasyon modelinin oluşturulması

100 mm'lik petriye ekilen kortikal nöronlarda kültürün 7. gününde aksonal dejenerasyon modeli aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

1. 100 mm'lik petriye ekilen kortikal nöronlar 5 ml PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldı.
2. Hücrelerin üzerine 1 ml % 0.25 tripsin (Gibco, 25200-056) eklenerek inkübatörde bekletildi. İnkübasyon boyunca faz kontrast mikroskop altında nöral ağların ayrılması izlenip takip edildi.
3. Hücrelerin ayrılması gerçekleştirildikten sonra her 1 ml proteaz için 5 ml NBM^{+} ile ayrışma durduruldu.
4. Serolojik pipet ile hücreler nazikçe titre edildi.
5. 50 ml'lik tüpe toplanan hücreler üzerine 5 ml medyum eklendi.
6. 1000xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında üst sıvı atıldı. Hücreler kibarca yeniden süspanse edilerek hemasitometrede sayıldı.

7. 6 kuyulu kültür tabağına her kuyuda $6x10^5$ olacak şekilde hücrelerin ekimi gerçekleştirildi.

8. Hücrelerin yeniden ekilmesi ile 10^{-8}M 1,25 α-dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamalarına başlandı.

3.3. Primer kortikal nöron kültürü deney grupları

1)Vitamin D'nin nöron gelişimi üzerindeki etkisini araştırdığımız deney grupları

- **Kontrol grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmayan grup
- **Etanol uygulanan grup:** 7 gün boyunca 3 günde bir 1,25 dihidroksivitamin D3'nin çözündürüldüğü 10^{-8} M etanol uygulanan grup (kültürün 2.günü ve 5.günü uygulama)
- **1,25 dihidroksivitamin D3 uygulanan grup** : 7 gün boyunca 3 günde bir 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup (kültürün 2.günü ve 5.günü uygulama)

Vitamin D'nin gelişim aşamasında nörit uzunluğu ve nörit uzama hızı üzerine etkisini incelemek üzere canlı hücre görüntüleme mikroskobunda nöronlar takip edildi. Gelişim aşamasında rol olan DLK, DCX, pDCX, GAP43, STMN2 ve 14-3-3 zeta/delta proteinlerinin seviyesi Western Blot deneyleri yapılarak gösterildi.

Akson büyümesi üzerine etkisini incelemek üzere akson büyüme konisinde yer alan proteinler immunfloresan işaretleme (IF) ile gösterildi. Aynı zamanda vitamin D uygulamasına yanıt olarak VDR'nin hangi proteinler ile bir arada bulunduğunu saptamak üzere immunpresipitasyon (IP) deneyleri yapıldı.

2) EB3-GFP aşırı ekspresyonu ile nöritogenezi uyarılmış kortikal nöronlarda vitamin D uygulamasının nöron gelişiminde mikrotübül dinamiği üzerindeki etkisini araştırdığımız deney grupları

- **EB3-GFP(**pLenti-C-mGFP-P2A-Puro**) aşırı ekspresyonu yapılan kontrol grubu:** 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulanmamış bir hücrenin mikrotübül dinamiği üzerine etkisini sağlayacak grup

- **Myc-GFP tag içeren boş plasmid (MOCK plazmid) ve etanol uygulanan grup:** ORF içermeyen sadece ilgili promoter ve kuyruğu (Myc-GFP) içeren grup
- **Myc-GFP tag içeren boş plasmid (MOCK plazmid) sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan kontrol grubu:** ORF içermeyen sadece ilgili promoter ve kuyruğu (Myc-GFP) içeren ve 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulanan kontrol grubu
- **EB3-GFP aşırı ekspresyonu sonrasında 10^{-8}M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup:** EB3-GFP aşırı üretiminin gerçekleştiği ve 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulanan grup

Gelişim aşamasında EB3-GFP aşırı ekspresyonu ile indüklendiği ileri sürülen nöritogeneze ek olarak vitamin D uygulamasının dinamik mikrotübüller üzerindeki etkisi, dinamik mikrotübül organizasyonunu gösteren tirozinlenmiş tübülinler immünfloresan işaretleme ile gösterildi.

3) Vitamin D'nin kültürün 7.günündeki olgun nöronlarda dejenerasyon sonrasında rejenerasyon üzerine etkisini araştırdığımız deney grupları

- **Kontrol grubu:** Herhangi bir uygulama yapılmayan grup
- **1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup:** Hücrelerde akson hasarı oluşturulduktan sonra 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup 7.günde, 48 saat süreyle 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulanan deney grubu.
- **Etanol uygulanan grup:** 1,25 dihidroksivitamin D3'in çözündürüldüğü etanol uygulanan grup

3.4. Gelişim döneminde nörit gelişiminin canlı hücre görüntüleme ile gösterilmesi

Primer kortikal nöron kültürün 2.gününde 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 vitamin D ve etanol uygulamalarına başlandı. Kortikal nöronlar uygulamalardan hemen sonra 30 sn aralıklar ile 30 dk boyunca ve 30 dk aralıklar ile 12 saat boyunca 20X büyütmede faz kontrast olarak Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobunda Gen5 yazılımı ile canlı hücre görüntüleme mikroskobunda takip edildi. Kontrol grubu, etanol uygulaması yapılan grup ve vitamin D

uygulaması yapılan gruplar için nörit uzunluk ölçümleri yapıldı. Nöritlerin uzama hızı ise; toplam nörit uzunluk değişimlerinin toplam zamana bölünmesi ile hesaplandı.

$V = \frac{\Delta L}{\Delta t}$ µm/sn (L=uzunluk; t=zaman).

3.5. Kültür hücrelerinden total protein izolasyonu

İzolasyona başlamadan önce 200 µl M-PER (Thermo Scientific 78501, Thermo Fisher Scientific Inc. Illinois, USA) , 2 µl Halt proteaz (Thermo Scientific 78429) ve 20 µl Fosfataz inhibitöründen oluşan lizis tampon karışımı hazırlandı.

Kültürdeki her 2 petriden ilkine lizis tampon eklendi. Hücreler kazınarak kaldırıldı ve diğer petriye aktarıldı.Diğer petrilerde de aynı işlem uygulandıktan sonra elde edilen tüm hücreler 3-5 kere pipetlenerek ve sonrasında da 1 dakika vortekslenerek 10 dakika 14.000 g'de santrifüj edildi. Proteinleri içeren üst sıvı temiz bir tüpe alınarak, -80^{o}C'de saklandı.

3.6. Western Blot deneyi

Nöron gelişiminde rol alan proteinlerin seviyesini incelemek üzere kültürün 2. gününde ve 5. gününde yapılan 1,25 dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamalarından 24,48,72,96 ve 120 saat sonra DLK, Doublecortin (DCX), Fosforile DCX, 14-3-3 zeta proteinlerinin ve akson büyüme konisinde yer alan proteinler olan GAP43, STMN2 proteinlerinin seviyesi Western blot deneyleri yapılarak belirlendi. Deneylerinde kullanılan antikorlar ve oranları aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3-2.Western Blot'ta kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları

Primer Antikor	Antikorun Üretildiği Canlı	Dilüsyon
DLK (Thermo, PA5-32173)	Tavşan	1:1500
Doublecortin (Santa Cruz, sc-271390)	Fare	1:500
Phospho Doublecortin (Ser334) (Thermo, PA5-17002)	Tavşan	1:800

14-3-3 zeta/delta(GWB-ASC334)	Tavşan	1:1000
GAP43 (Neuromic, MO22118)	Tavşan	1:500
STMN2 (Thermo, 10586-1-AP)	Tavşan	1:3000

Tablo 3-3. Western Blot'ta kullanılan sekonder antikorlar ve seyreltme oranları

Sekonder Antikor	**Antikorun Üretildiği Canlı**	**Dilüsyon**
Anti-fare IgG H&L (HRP)/ (Abcam, ab97040)	Keçi	1:3000
Anti-tavşan IgG H&L (HRP)/(Thermo Scientific,65-6120)	Keçi	1:3000

3.6.1. Proteinlerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi

1. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları NanoDrop One cihazı ile ölçüldü.

2. Belirlenen protein konsantrasyonları doğrultusunda her bir gruba ait protein örneği, eşit konsantrasyonda olacak şekilde hesaplanarak 1,5 ml'lik vida kapaklı tüplere aktarıldı.

3. Proteinlerin üzerine, içerisinde %10 β-merkaptaetanol (AppliChem, A1108) olacak şekilde hazırlanan 4X Bolt LDS (lityum dodesil sülfat) örnek yükleme tamponunu (Invitrogen, B0007) final konsantrasyonu 1X olacak şekilde eklendi.

4. Bolt % 4-12 Bis-Tris Plus jel (Invitrogen, NW04120BOX) elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, tank final konsantrasyonu 1X olacak şekilde dH2O ile seyreltilerek hazırlanan 20X Bolt MES SDS (sodyum dodesil sülfat) yürütme tamponu (Invitrogen, B0002) ile doldurulduru.

5. DLK, DCX, fosforile DCX,14-3-3 zeta, GAP43 ve STMN2 protein seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan proteinler 100ºC'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra, jele yüklendi.

6. Her bir jelin ilk kuyusuna, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher, 26619) ve MagicMark XP Western Protein Standard (ThermoFisher, LC5602)'ın 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanan protein standartı yüklendi.

7. Proteinler, Invitrogen PowerEase500 elektroforez sisteminde 200 voltta 25 dakika yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı.

8. Elektroforez sonrası moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, jelden Power Blotter Select Transfer Stacks (Invitrogen, PB5310) PVDF membrana aktarıldı.

9. Proteinlerin transferi, Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6.2. Primer ve sekonder antikor ile işaretleme

1. Proteinlerin aktarıldığı membranlar miktarı saptanmak istenen proteinlere karşı oluşturulmuş antikorlar ile işaretlendi.
2. Membran öncelikle PBS içerisinde çözündürülen %5 süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi.
3. 5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra 10 ml PBS içerisinde çözündürülen %5 süt tozu ve primer antikor ile bir gece +4ºC de inkübe edildi.
4. Membranlar tekrar 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandıkan sonra 10 ml PBS içerisinde çözündürülen %5 süt tozu ve uygun sekonder antikor ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 kere, 5 dakika PBS ile yıkandı.
5. Luminol ve hidrojen peroksit çözeltileri içeren kemilüminesan substrat (ThermoScientific, 34580) ile membran 5 dk inkübe edildi.
6. ChemiDoc MP (Biorad, 12003154) cihazında görüntüleme yapıldı ve ImageJ yazılımıyla grupların bant yoğunlukları ölçüldü.

3.7. Çift immün floresan işaretleme deneyleri

Nöronlar henüz gelişim aşamasında iken kültürün 2. gününde 10^{-8} M vitamin D ve etanol uygulamalarını takiben 24, 48, 72 ve 120 saat sonra vitamin D'nin akson büyümesi üzerine

etkisini incelemek için büyüme konisinde yer alan proteinler olan GAP43 ve STMN2 antikorları kullanılarak immun floresan işaretleme deneyleri gerçekleştirildi.

1. Kültürdeki hücreler %3,7'lik paraformaldehit (Sigma 15812-7) içerisinde oda sıcaklığında 30 dakika fikse edildi. Hücreler 3 defa 2 ml PBS ile yıkandı.

2. Hücreler PBS içerisine % 0,02 triton X-100 (Sigma X-100) ve %30 keçi serumu (Chemicon S26) eklenerek hazırlanan T-PBS içinde 1 saat oda sıcaklığında bloklandı.

3. 3 kez hızlıca PBS ile yıkama yapıldı.

4. Primer antikor ile işaretleme %0,02 T-PBS içinde %1,5 keçi serumu olacak şekilde 1:200 oranında sulandırılarak hazırlanan GAP43 (Neuromic, MO22118) antikoru ile yapıldı. Gece boyu +4°C'de bekletildi.Ertesi gün 3 kez 10 dakika süre ile PBS ile yıkama yapıldı.

5. Yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan TPBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılarak hazırlanan Alexa Fluor 488 işaretli anti-rabbit IgG (A11034, Thermo Fisher) sekonder antikoru ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Bu basamaktan itibaren tüm işlemler karanlıkta gerçekleştirildi.

6. İnkübasyon sonunda 3 kez 10 dakika süre ile PBS ile yıkama yapıldı.

7. STMN2 antikoru ile de işaretleme yapmak için % 0,02 T-PBS içinde %10 keçi serumu olacak şekilde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca ikinci bir bloklama yapıldı. 3 kez hızlıca yıkama yapıldı.

8. Hücreler % 0,02 T-PBS içinde %1,5 keçi serumu olacak şekilde 1:50 oranında sulandırılarak hazırlanan STMN2 (10586-1-AP, Thermo Fisher) primer antikoru ile işaretlendi ve örnekler 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

9. İnkübasyon sonunda 3 kez 10 dakika süre ile PBS ile yıkama yapıldı.

10. Hücreler yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan TPBS içerisinde 1:200 oranında sulandırılarak hazırlanan Alexa Fluor 568 işaretli anti-rabbit IgG (A1101,Thermo Fisher) sekonder antikoru ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

11. İnkübasyon sonunda 1:15000 oranında dH2O ile sulandırılarak hazırlanan DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) solüsyonu içinde 15 saniye bekletildi.

12. 3 kez 10 dakika süre ile PBS ile yıkandıktan sonra kapama medyumu(P36970, ThermoFisher) ile kapatıldı.

13. Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) ile görüntüleme yapıldı. Her bir gruba ait olan görüntüler, Gen5 (Biotek) yazılımı kullanılarak montaj ve dekonvolüsyon işlemleri sonrası birleştirilerek tek bir görüntü haline getirildi.

3.8. Immunpresipitasyon deneylerinin gerçekleştirilmesi

Gelişim aşamasındaki bir nöronda vitamin D'nin ilişkili olabileceği proteinleri saptamak amacıyla kültürün 2. gününde 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamalarından 30 dk ve 12 saat sonra vitamin D'nin hızlı cevabını incelemek üzere lizat VDR antikoru ile çöktürülerek VDR immunopresipitasyon (VDR-IP) deneyleri yapıldı.

Gelişim sırasındaki bir nöronda vitamin D'nin ilişkili olabileceği proteinleri saptamak amacıyla araştırdığımız deney grupları

- Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmayan grup,
- Etanol uygulaması yapılan grup: Kültürün 2. gününde vitamin D'nin çözündürüldüğü etanol uygulanan grup,
- 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup: Kültürün 2. gününde 10^{-8} M vitamin D uygulaması yapılan grup,
- Negatif kontrol olarak yalnızca bead ve IgG uygulaması yapılan grup.

3.8.1. Hücre lizatlarının hazırlanması

IP lizis tamponu aşağıdaki gibi hazırlandı.

Tablo 3-4. IP lizis tamponunun hazırlanması

IP lizis tamponu içeriği (pH 7,4)
150 mM NaCl (Sigma, S-3014)
50 mM Tris (AppliChem, A2264, 1000)
0,5 mM EDTA (Sigma, E5134)
%1 Triton X-100 (Sigma, x-100)
1:100 protein inhibitör kokteyl (PIC)

1. 100 mm'lik petride %90-%100 yoğunluktaki hücreler buz üzerinde konuldu ve eski medyum çekildi.

2. Hücreler bir kez 5 ml soğuk PBS ile yıkandı.

3. 1 ml soğuk PIC (+) lizis tamponu eklendi ve hücreler kazıyıcı kullanılarak kazındı.

4. Lizatı 1,5 ml soğuk tüplere alındı.1 dk vortekslendi. +4 derecede shakerda 30 dk inkübe edildi.

6. İnkübasyon sonrası +4 derecede en yüksek hızda 15 dk santrifüj edildi.

7. Süpernatant IP işleminde kullanılmak üzere alındı.

8. 1 ml lizata VDR antikoru eklendi. Negatif kontrol olarak ise lizata IgG antikoru eklendi. Gece boyu +4 derecede inkübasyona bırakıldı. Hücre lizatı input olarak kullanılmak üzere steril 1,5 ml'lik tüpe alındı.

3.8.2. Dynabead-antikor kompleksinin hazırlanması

1. Stok dynabead tüpü (10015D,Thermo) homojen kahverengi görüntü alıncaya kadar vortekslendi.

2. 50 µl dynabead alındı ve steril 1,5 ml'lik tüpe konuldu. Negatif kontrol için 25 µl dynabead kullanıldı.

3. Tüp 1 dk manyetik rackte (DynaMag $^{TM-2}$, 12321D) tutuldu ve tüp rackten alınmadan sıvı uzaklaştırıldı.

4. Dynabead içeren tüp rackten alındı ve PBS eklenerek resüspanse edildi. Tüp 1 dk manyetik rackte tutuldu. Üst sıvı atılarak yine PBS içerisinde resüspanse edilerek manyetik rackte 1 dk inkübe edildi. Üst sıvı atıldı.

5. Hücre lizatı dynabead üzerine eklendi. 4 saat +4 derecede inkübe edildi.

3.8.3. Elüsyon protokolü

1. Lizat-bead-antikor kompleksi 2 dk manyetik rackte tutularak üst sıvı uzaklaştırıldı.

2. 3 kez 200 µl PBS ile yıkandı.

3.Son yıkamadan sonra üst sıvı atıldı. 60 µl PBS eklenerek yeni tüpe aktarıldı.

4. IP örnekleri üzerine 1:4 oranında LDS sample buffer ve β-merkaptoetanol karışımı eklendi. Örnekler 100ºC'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra manyetik rackte 2 dk bekletildi.

5. Uygun miktarda alınan örnek Western blot deneyinde kullanılmak üzere tüplere aktarıldı.

3.8.4. Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Proteinler daha önce de ifade edildiği gibi , Invitrogen PowerEase500 elektroforez sisteminde 200 voltta 25 dakika yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı. Jeldeki proteinlerin PVDF membran üzerine aktarılması Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

Kullanılan primer antikorlar:

Anti-DLK (Thermo, PA5-32173)	Dilüsyon: 1: 1500
Anti-Doublecortin (E-6): (Santa Cruz, sc-271390)	Dilüsyon: 1:500
Anti fosfo-Doublecortin(ser 334) (PA517002)	Dilüsyon 1:800
Anti STMN2 (Thermo, 10586-1-AP)	Dilüsyon 1:3000
Anti VDR (Abcam, 3508)	Dilüsyon 1:500

Kullanılan Sekonder Antikorlar

Goat Anti-Mouse IgG HL(HRP) (Abcam, ab97040) Dilüsyon: 1:3000

Rabbit IgG (HRP) Antibody (Thermo Scientific, 65-6120) Dilüsyon: 1:3000

3.9. Sitotoksisite ölçümü

Sitotoksisite ölçümü, kültürdeki membranı hasarlı veya ölü hücrelerden medyuma salınan laktat dehidrogenaz miktarının belirlenmesiyle gerçekleştirildi. LDH salınımı

deneylerinde kullanılacak negatif kontrol, düşük konsantrasyonlu kontrol, yüksek konsantrasyonlu kontrol grupları diğer deneyler yapılırken hazırlandı. Kültür medyumu NBM+'dan oluşan negatif kontrol, kültür medyumundaki LDH aktivitesini belirlemek üzere hazırlandı. Her deneyde kullanılan ve hiçbir madde verilmeyen kontrol grupları hücrelerden normal koşullardaki LDH salınımı belirlemek üzere düşük konsantrasyonlu kontrol grubu olarak alındı. Kültür medyumuna %2 Triton X-100 eklenip 24 saatlik inkübasyon ile oluşturulan yüksek konsantrasyonlu kontrol grubu hücrelerden salınabilecek en yüksek LDH miktarını belirlemek için kullanıldı. Uygulama süreleri sonunda kontrol gruplarına ve deney gruplarına ait kültür medyumlarından 1 ml örnek ELISA çalışmaları için toplandı ve -80^{o}C'de saklandı. LDH salınımı Cytotoxicity Detection (LDH) kiti (Roche, 11 644 793 001) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Her bir örnekten 100 µl 96 kuyulu mikroplakalara yüklendi.

2. Üzerlerine taze hazırlanmış 100 µl katalizör ve boya çözeltisi içeren reaksiyon karışımı eklendi, 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi.

3. İnkübasyon sonrası örneklerin absorbansları 492 nm'lik filtre ile Thermo MultiSkan EX (Thermo Fisher ScientificTM Delaware, USA) ELISA okuyucuda okundu. Her bir örneğe ait ölçümler 3 kere tekrarlandı.

3.10. İstatistiksel analiz

Lionheart FX otomatik hücre görüntüleme mikroskobunda Gen5 yazılımı kullanılarak nörit uzunluk ölçümü yapılan nöronlara ait veriler, Western blot deneylerine ait Image J ölçümünden elde edilen ham veriler GraphPad InStat DTCG 3.06 (GraphPad Software, Inc. San Diego USA) veya SPSS 24.0 yazılımı kullanılarak verinin normal dağılıp dağılmamasına ve elde edilen SD'lerin arasındaki farkın anlamlı olup olmamasına göre önce one-way ANOVA, takibinde çoklu karşılaştırma için Tukey-Kramer Multiple Comparision testleri ile veya önce Kruskal Wallis, sonrasında çoklu karşılaştırma için Dunn's Multiple Comparision testleri ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. $p<0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

Mikrotübül dinamiğinin belirlenebilmesi için MAPRE3 (EB3) -GFP deneyleri sonucunda Image J programı ile ölçümü alınan tirozinlenmiş tubulin immün yoğunluk ham verileri ve akson hasar deneyleri sonrasında rejenerasyon indeksini belirlemek üzere GAP43 ve STMN2 immünfloresan işaretlemeleri kullanılarak elde edilen floresan yoğunluk ölçümleri, hücre alanı ölçülerek tanımlanan düzeltilmiş total hücre floresan yoğunluğu (CTCF-corrected total cell

fluorescence; CTCF = integrated density − (area of selected cell × mean fluorescence of background readings) olarak hesaplandı. [10, 334]. Ölçümler her grubun rastgele seçilen 10 alanından alınan fotoğraflar üzerinden gerçekleştirildi ve analizleri yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada, 16 günlük Spraque-Dawley sıçan embriyolarının neokorteks bölgelerinden primer kortikal nöron kültürü yapıldı.

1) **Nöron gelişimi esnasında vitamin D uygulamasına bağlı olarak;**

- Nörit uzunlukları ve nörit uzama hızları canlı hücre görüntüleme mikroskobunda takip edilerek ölçümleri manuel olarak yapıldı.
- DLK ve DLK-MAPK sinyal yolağının hedefleri olan DCX, fosforillenen DCX ve 14-3-3 zeta/delta ve akson büyüme konisinde yer alan ve rejenerasyon belirteci olarak ifade edilen GAP43 ve STMN2 protein seviyelerindeki değişiklikler saptandı.
- Ek olarak, GAP43 ve STMN2 proteinlerinin seviyelerindeki ve lokalizasyonlarındaki değişiklikler immünfloresan işaretleme yöntemi ile incelendi.
- Mikrotübül dinamiğini incelemek üzere MAPRE3 (EB3)-GFP aşırı ekspresyonu ile nörit oluşumunun uyarıldığı nöronlarda dinamik mikrotübülleri gösteren tirozinlenmiş tubulin immun sinyal yoğunluğunu belirlemek üzere immunfloresan işaretleme deneyleri yapıldı.
- Gelişim aşamasındaki bir nöronda vitamin D'nin bir arada bulunabileceği proteinleri saptamak amacıyla VDR immünopresipitasyon (VDR-IP) deneyleri yapıldı.
- Yapılan uygulamaların muhtemel toksik etkileri ise sitotoksisite testi ile saptandı.

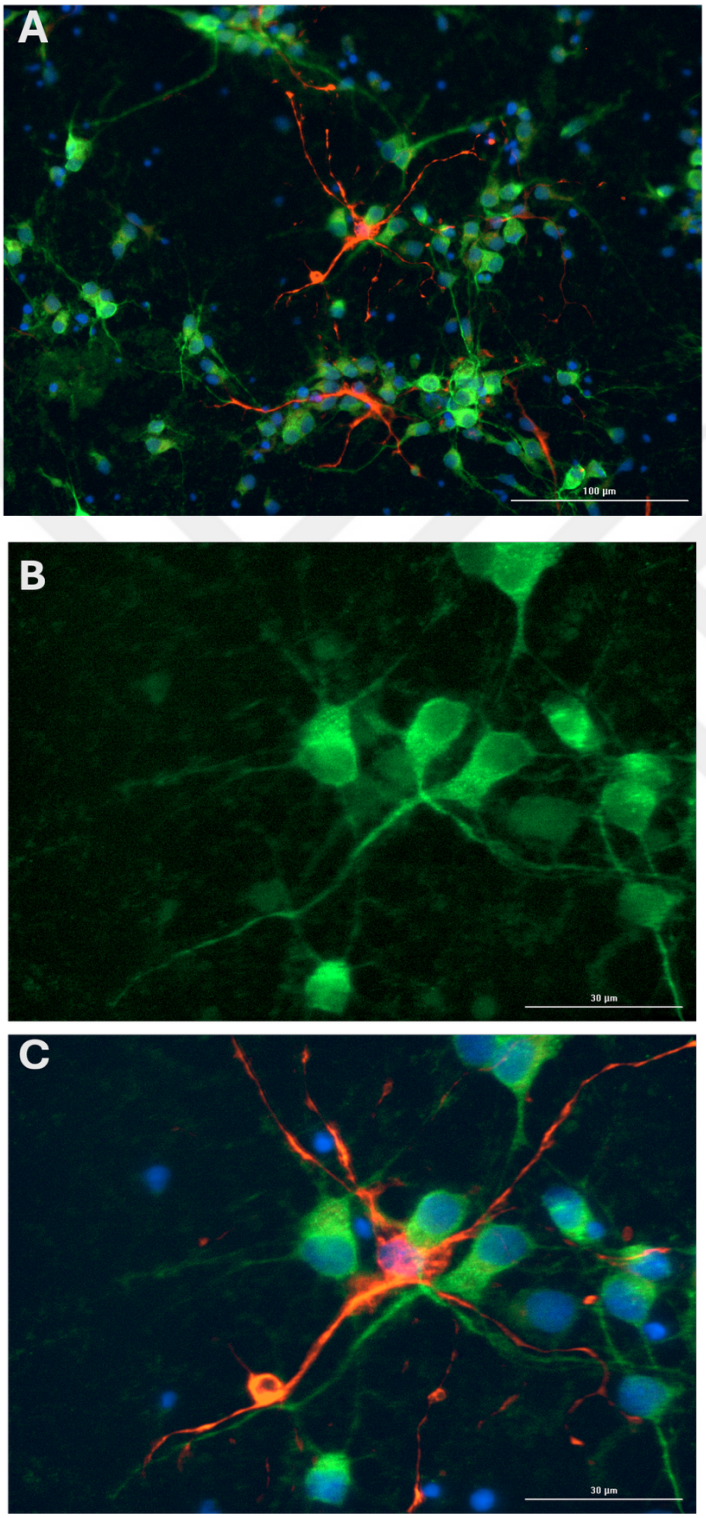
2) **Olgun bir nöronda akson hasarı sonrasında vitamin D uygulamasına bağlı olarak;**

- Rejenerasyon ile ilişkili proteinler olan GAP43 ve STMN2 protein seviyelerindeki değişiklikler Western Blot ve immunfloresan işaretleme deneyleri ile gösterildi.

4.1. Primer kortikal nöronların morfolojik ve mikroskopik değerlendirilmesi

Primer kortikal nöron kültürleri olgunlaştıkları gün olan 7.günde bir nöron belirteci olan MAP2 ve glia hücreleri için GFAP antikorları ile immunfloresan yöntemi ile işaretlenerek

kültürdeki nöron/glia oranı primer kortikal nöron kültürü için %7 olarak belirlendi. Böylece kültürlerin nöron bakımından zengin olduğu saptandı (Şekil 4-1).



Şekil 4-1. 7 günlük primer kortikal nöron kültüründe nöronlar ve glia hücreleri gösterilmektedir.

Nöronlar, nöron belirteci olan MAP2 ile yeşil; glia hücre belirteci olan GFAP ile kırmızı, nukleus DAPI ile mavi renkte işaretlenmiştir.

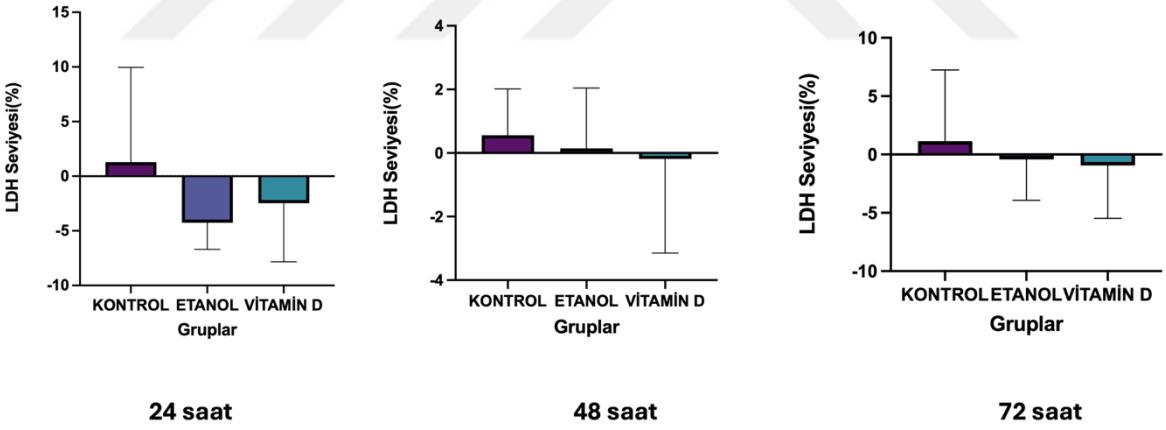
A. MAP2, GFAP ve DAPI ile nöronların çakıştırılmış hali gösterilmektedir. Büyütme: 20X. **B** MAP2 işaretlemesi gösterilmektedir. Büyütme 60X. **C**. MAP2, GFAP ve DAPI ile nöronların çakıştırılmış hali gösterilmektedir. Büyütme 60X.

4.2. Sitotoksite ölçüm sonuçları

4.2.1. Primer kortikal nöron kültürü sitotoksisite ölçüm sonuçları

Primer kortikal nöron kültürüne 24, 48,72, 96, 120 ve 144 saat süreyle yapılan 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamaları sonucu ortaya çıkabilecek sitotoksik etki, kültür ortamına salınan LDH miktarı ölçülerek saptandı. Grupların LDH salınım miktarlarındaki değişiklikler Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te gösterilmiştir.

4.2.1.1. 24, 48 ve 72 saatlik deney grupları

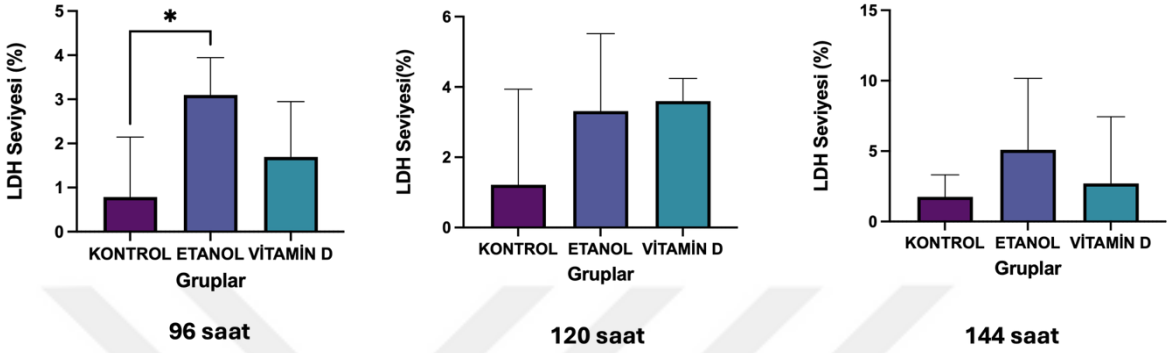


Şekil 4-2.Primer nöron kültürü uygulamalarından 24,48,72 saat sonra deney gruplarının LDH salınma yüzdeleri.

Kontrol grubu LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir.

- 24,48ve 72 saat süreyle 10-8 M vitamin D ve etanol uygulaması yapılan primer kortikal nöron kültürüne ait deney grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamaktadır.

4.2.1.2. 96, 120, 144 saatlik deney grupları



Şekil 4-3. Primer nöron kültürü uygulamalarından 96,120,144 saat sonra deney gruplarının LDH salınma yüzdeleri.

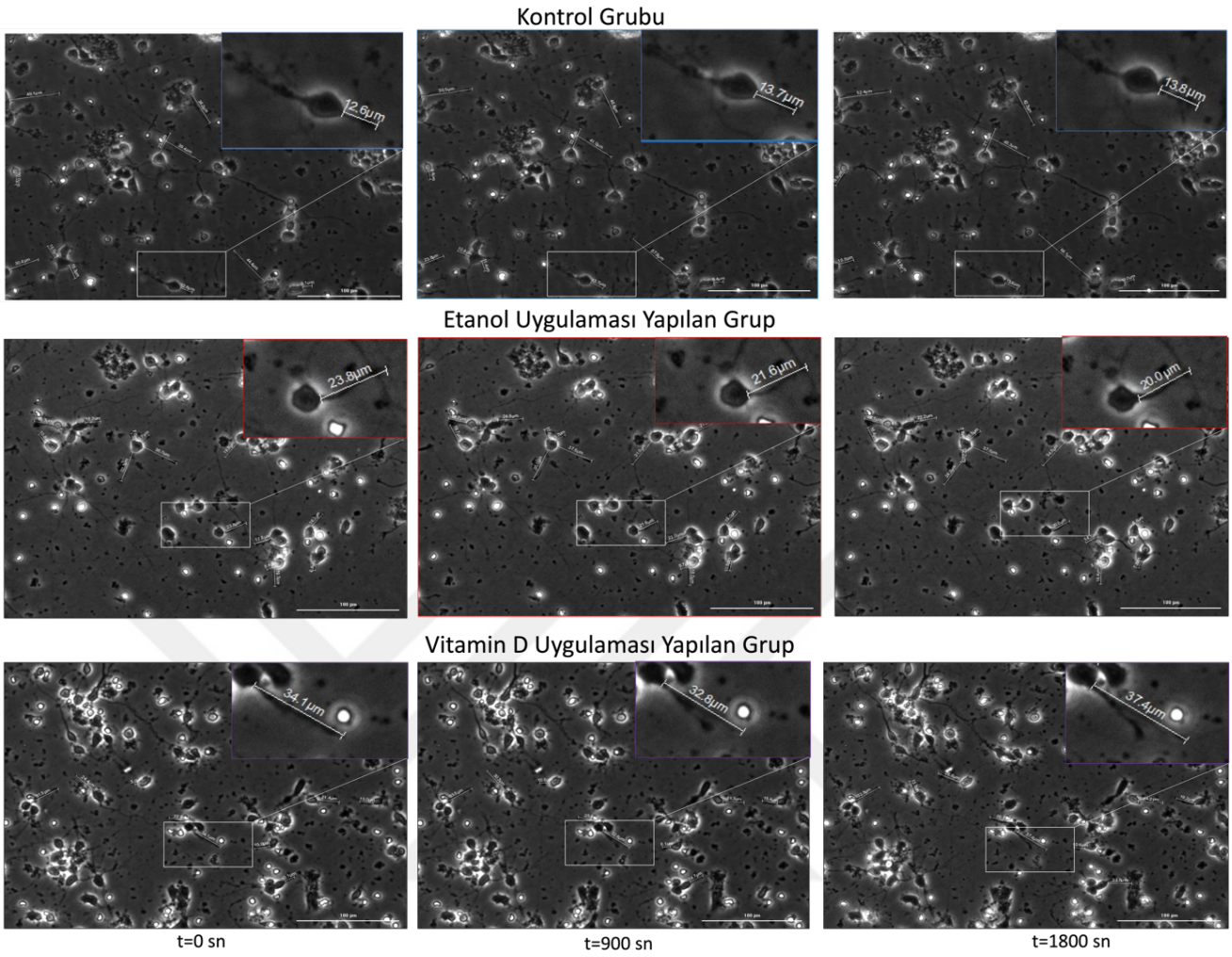
Kontrol grubu LDH salınımı % 0 olarak kabul edilmiştir.

10-8 M vitamin D ve etanol uygulamalarından 96 saat sonra primer kortikal nöron kültüründe LDH salınımı etanol grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Uygulamalardan 120 ve 144 saat sonra ise LDH salınımları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

4.3. Canlı hücre görüntüleme deneylerinin sonuçları

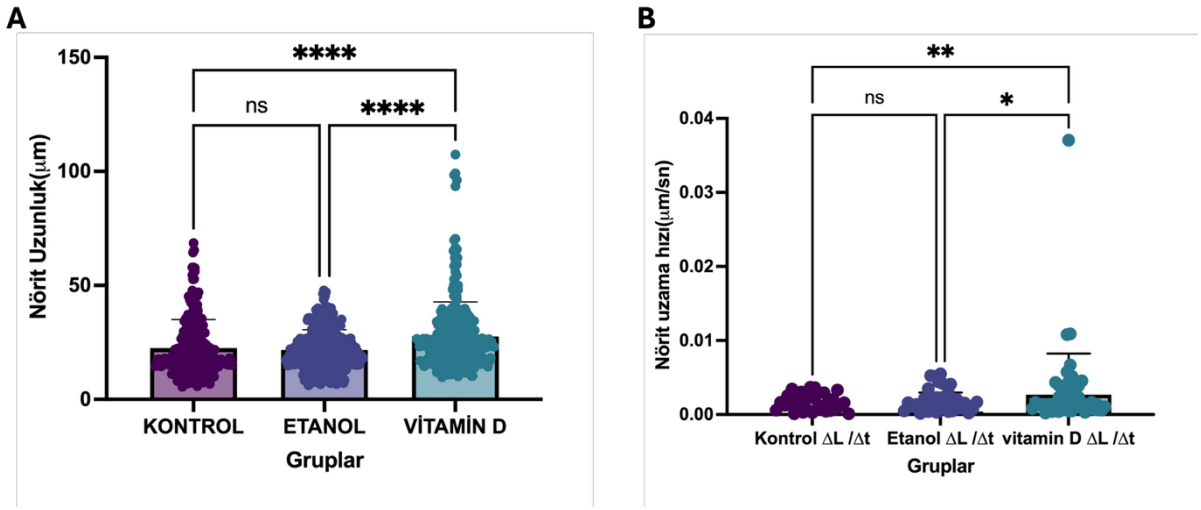
4.3.1. Vitamin D uygulamalarının ilk 30 dakika içinde nörit uzunluğu ve uzama hızı üzerine etkisinin gösterilmesi

Primer kortikal nöron kültürünün 2.gününde 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamalarına başlandı. Uygulamalardan sonra 30 dakika boyunca 30 sn aralıklar ile nöronlar canlı hücre görüntüleme cihazında faz kontrast mikroskobunda takip edildi.



Şekil 4-4. Vitamin D ve etanol uygulamalarına bağlı olarak ilk 30 dakika içinde nöronların faz kontrast mikroskobunda takibinin gösterilmesi.

Kültürün 2.günü vitamin D ve etanol uygulamalarından sonra 30 sn aralıklar ile 30 dk süresince canlı hücre görüntüleme cihazında takip edilmiştir. Faz kontrast mikroskobundan elde edilen temsili görüntüler sırasıyla t=0 sn, t=900 sn ve t =1800 sn zaman noktalarında gösterilmektedir. Büyütme: 20X.



Şekil 4-5. Vitamin D uygulamasının ilk 30 dakikası içinde nörit uzunluğu ve nörit uzama hızının gösterilmesi.

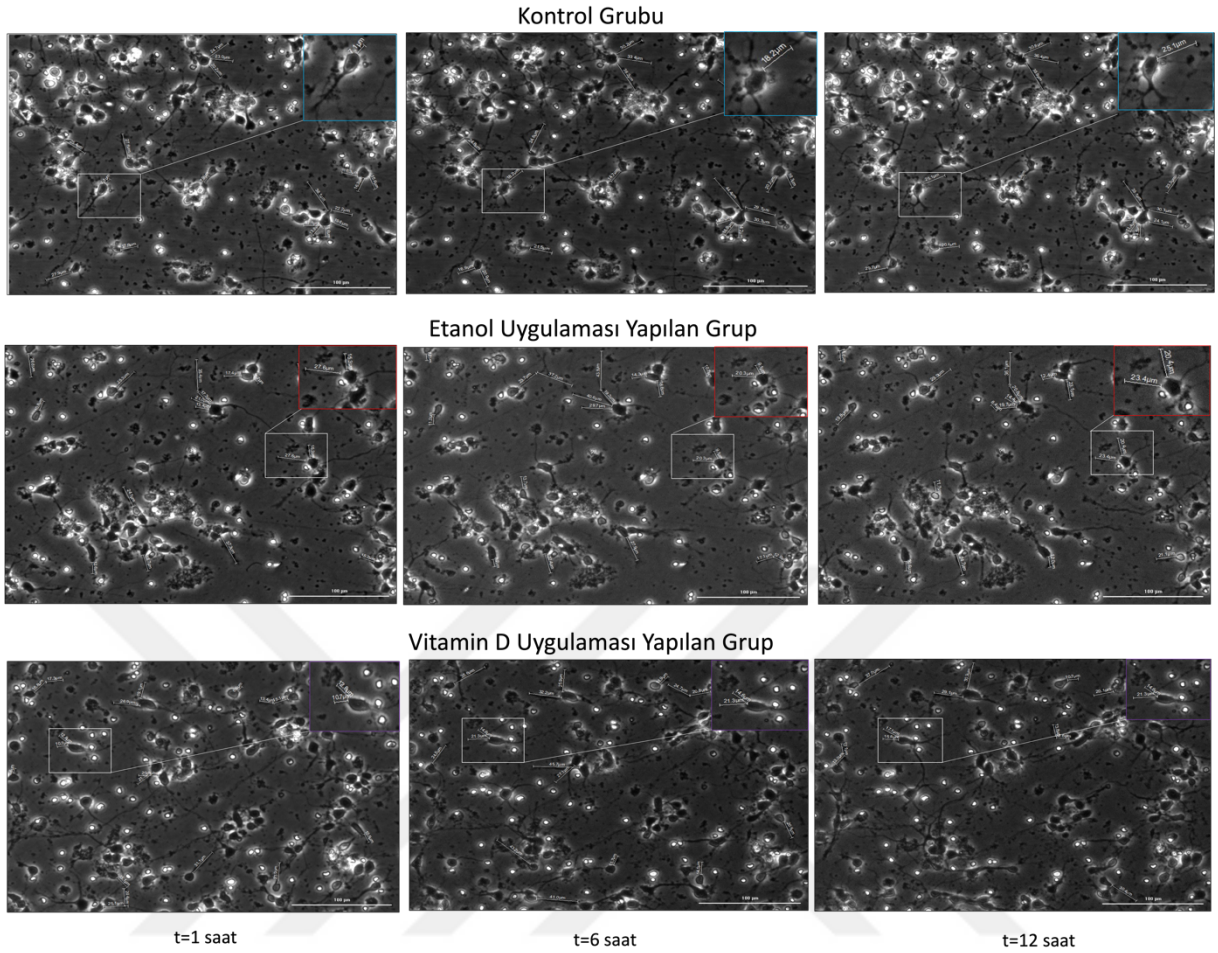
A. Vitamin D uygulamasına bağlı olarak ilk 30 dk içerisinde nörit uzunluğu vitamin D grubunda hem etanol hem de kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$).

B. Vitamin D uygulamasına bağlı olarak ilk 30 dk içerisinde nörit uzama hızı vitamin D grubunda hem kontrol hem de etanol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.05$).

* $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

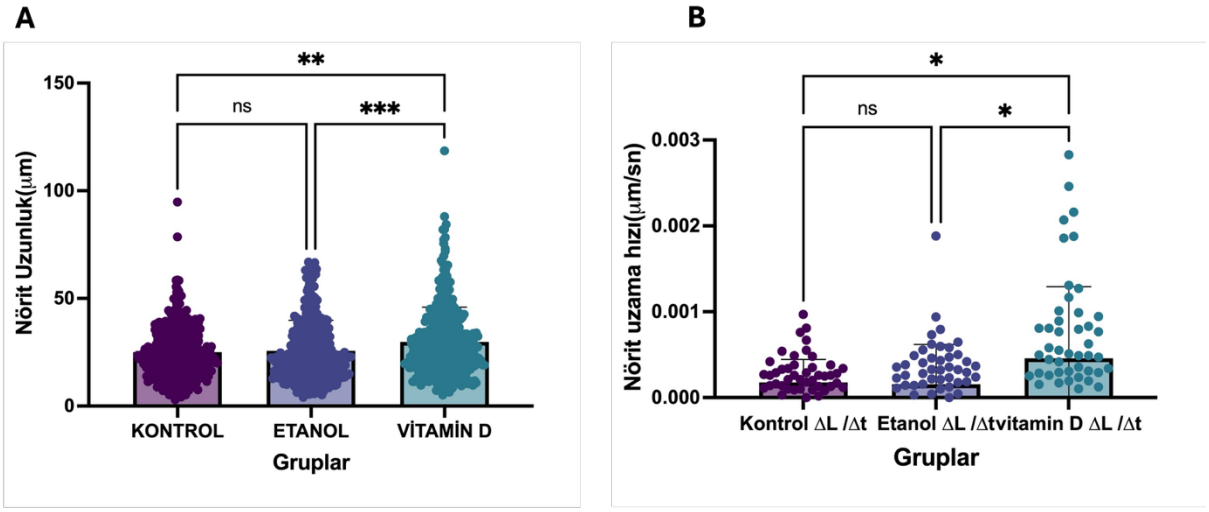
4.3.2. Vitamin D uygulamalarının ilk 12 saat içinde nörit uzunluğu ve uzama hızı üzerine etkisinin gösterilmesi

Primer kortikal nöron kültürünün 2.gününde 10^{-8}M 1,25 dihidroksivitamin D3 ve etanol uygulamalarına başlandı. Uygulamalardan sonra 12 saat boyunca 30 dk aralıklar ile nöronlar canlı hücre görüntüleme cihazında faz kontrast mikroskobunda takip edildi.



Şekil 4-6. Vitamin D ve etanol uygulamalarına bağlı olarak ilk 12 saat içinde nöronların faz kontrast mikroskobunda takibinin gösterilmesi.

Kültürün 2.günü vitamin D ve etanol uygulamalarından sonra 30 dk aralıklar ile 12 saat süresince canlı hücre görüntüleme cihazında takip edilmiştir. Faz kontrast mikroskobundan elde edilen temsili görüntüler sırasıyla t=1 saat, t=6 ve t=12 saat zaman noktalarında gösterilmektedir. Büyütme: 20X.



Şekil 4-7.Vitamin D uygulamasının ilk 12 saatinde nörit uzunluğu ve nörit uzama hızının gösterilmesi.

A. Vitamin D uygulamasına bağlı olarak ilk 12 saat içerisinde nörit uzunluğu vitamin D grubunda hem etanol hem de kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.01$).

B. Vitamin D uygulamasına bağlı olarak ilk 12 saat içerisinde nörit uzama hızı vitamin D grubunda hem kontrol hem de etanol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.05$).

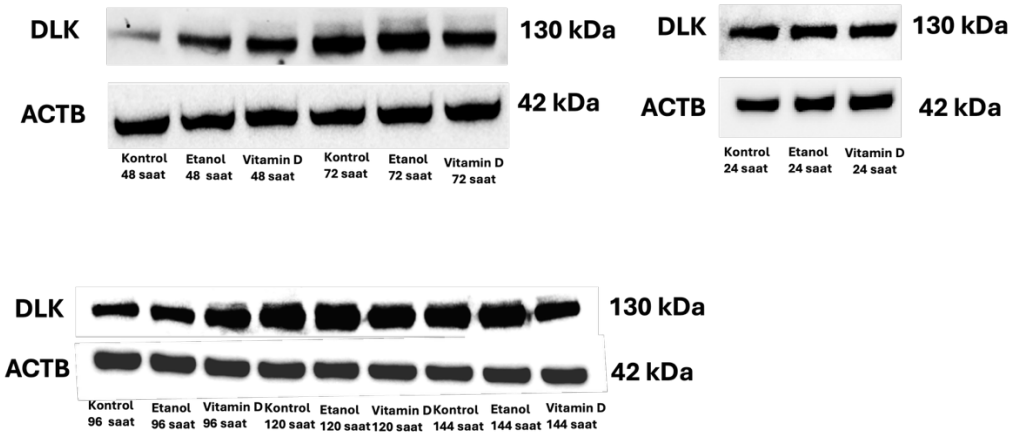
* $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

4.4. Western Blot analizi ile saptanan protein ekspresyon sonuçları

4.4.1. Gelişim aşamasındaki bir nöronda vitamin D uygulamalarına bağlı olarak protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

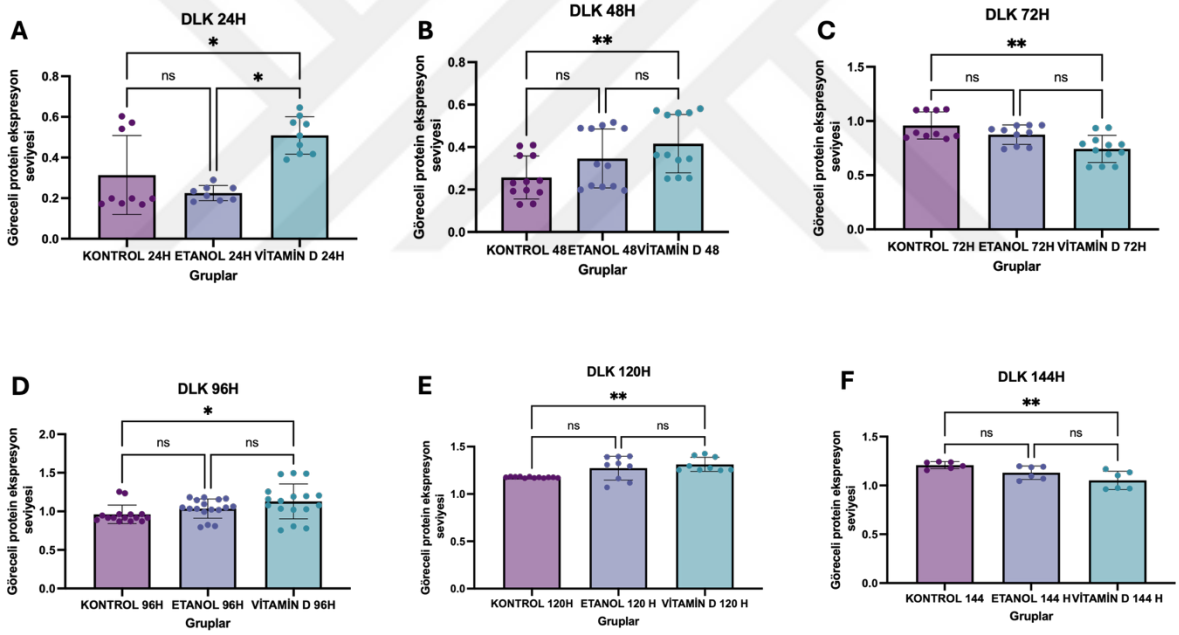
4.4.1.1. Dual lösin kinaz (DLK) protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde ve 5. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonra DLK protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-8 ve Şekil 4-9'da gösterilmektedir.



Şekil 4-8. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında DLK protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.

ACTB (Beta Aktin) antikoru referans protein olarak kullanılmıştır.



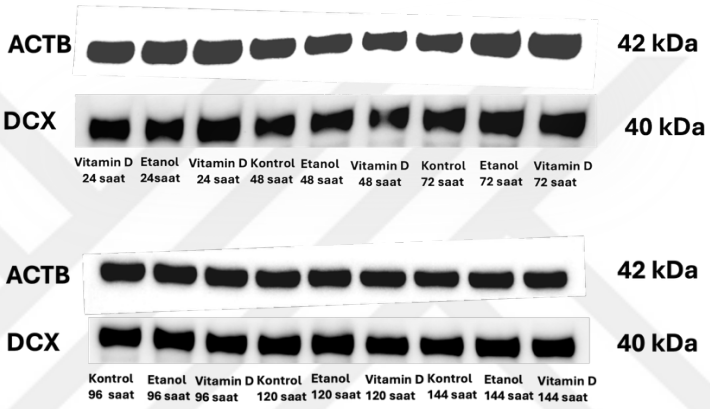
Şekil 4-9. Vitamin D uygulamaları sonucu DLK protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

A. Uygulamalardan 24 saat sonra DLK protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda hem kontrol hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.05$). **B**. Uygulamalardan 48 saat sonra DLK protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra ise DLK protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). **D-E**. DLK protein ekspresyon seviyesi uygulamaların 96. ve 120. saatinde vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.01$). **F**. Uygulamaların 144. saatinde ise DLK protein seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna

kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

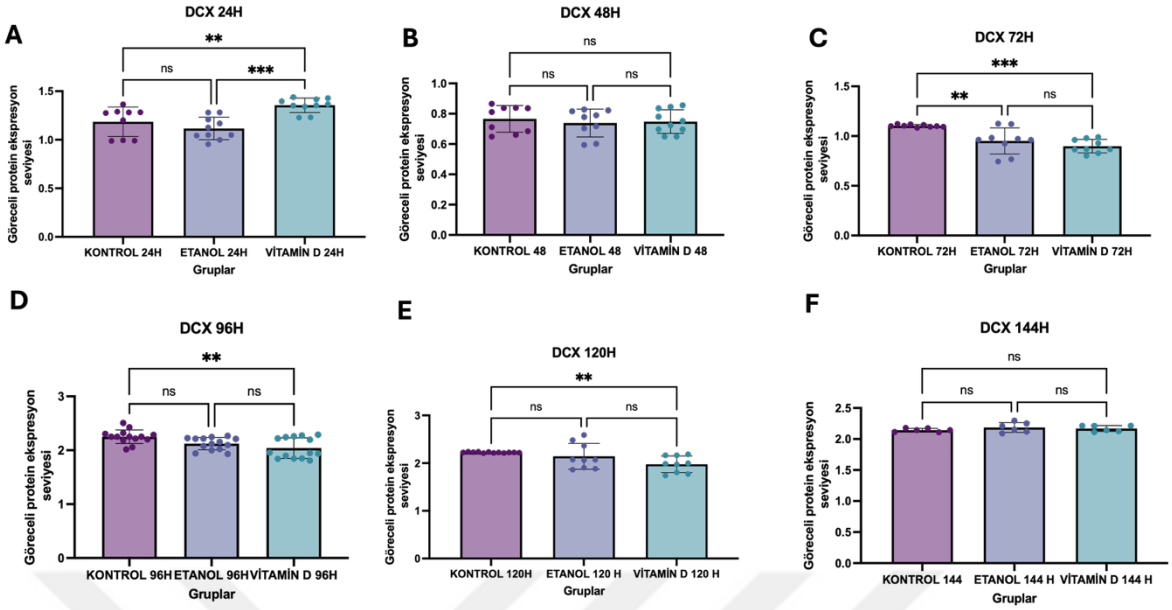
4.4.1.2. Doublecortin (DCX) protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde ve 5. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonra DCX protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-10 ve Şekil 4-11'te gösterilmektedir.



Şekil 4-10. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında DCX protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.

ACTB (Beta Aktin) antikoru referans protein olarak kullanılmıştır.

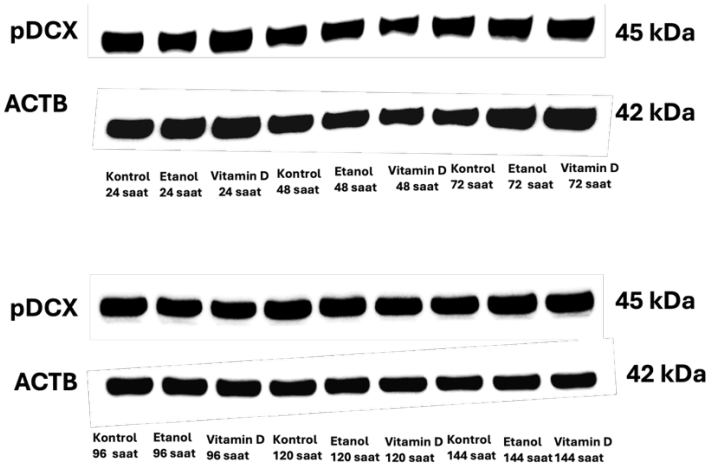


Şekil 4-11. Vitamin D uygulamaları sonucu DCX protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

A. Uygulamalardan 24 saat sonra DCX protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda hem kontrol hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.001$). **B**. Uygulamalardan 48 saat sonra DCX protein ekspresyon seviyesi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir. **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra ise DCX protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). **D-E**. DCX protein ekspresyon seviyesi uygulamaların 96. ve 120. saatinde vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.01$). **F**. Uygulamaların 144. saatinde ise DCX protein seviyesi gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark göstermemiştir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

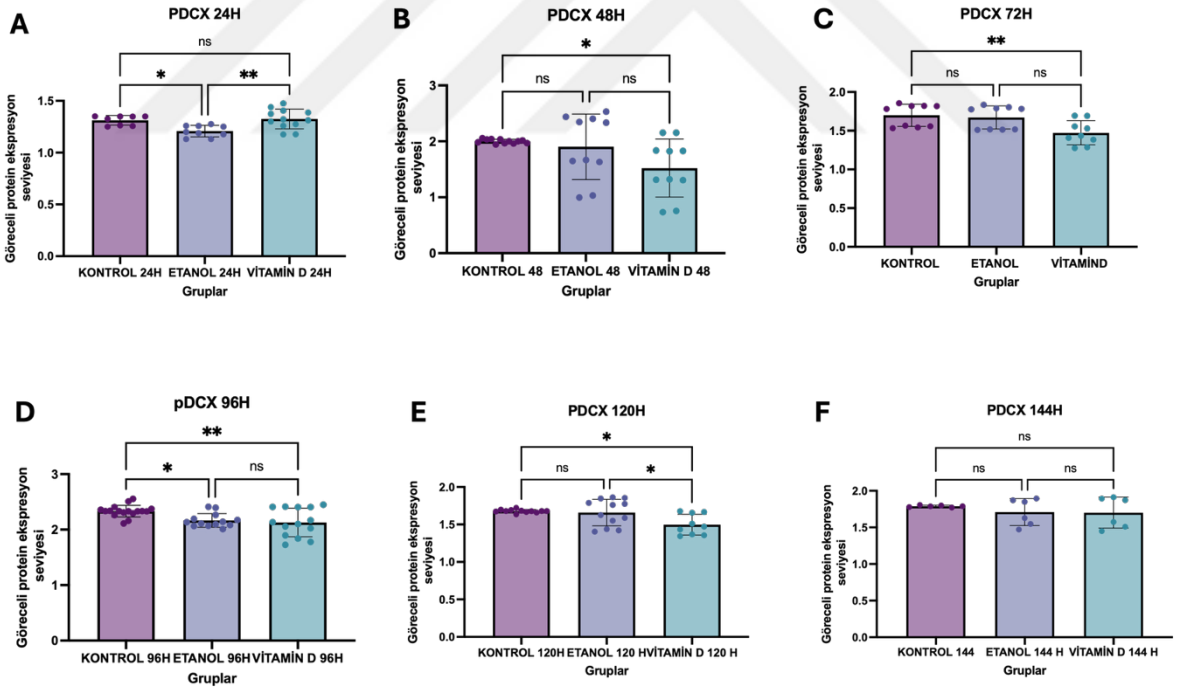
4.4.1.3. Ser 334 fosforile Doublecortin (pDCX) protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde ve 5. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat sonra pDCX protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-12 ve Şekil 4-13'te gösterilmektedir.



Şekil 4-12. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında pDCX protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.

ACTB (Beta Aktin) antikoru referans protein olarak kullanılmıştır.



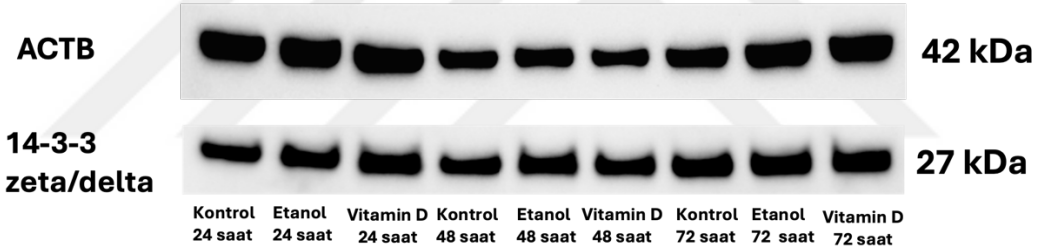
Şekil 4-13. Vitamin D uygulamaları sonucu pDCX protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

A. Uygulamalardan 24 saat sonra pDCX protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). **B**. Uygulamalardan 48 saat sonra pDCX protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra ise pDCX protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel

olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). **D**. pDCX protein ekspresyon seviyesi uygulamaların 96. saatinde vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). **E.** pDCX protein ekspresyon seviyesi uygulamaların 120. saatinde vitamin D grubunda hem kontrol grubuna hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.05$). **F**. Uygulamaların 144. saatinde ise pDCX protein seviyesi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

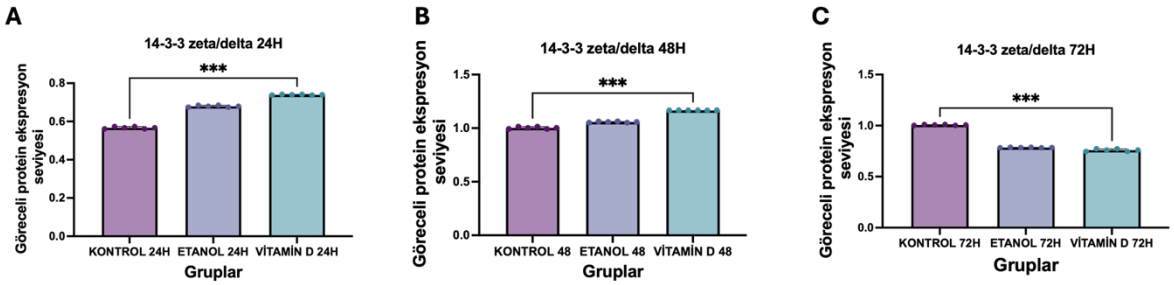
4.4.1.4. 14-3-3 zeta/delta protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72 saat sonra 14-3-3 zeta/delta protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-14 ve Şekil 4-15'4e gösterilmektedir.



Şekil 4-14. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında 14-3-3 zeta/delta protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.

ACTB (Beta Aktin) antikoru referans protein olarak kullanılmıştır.

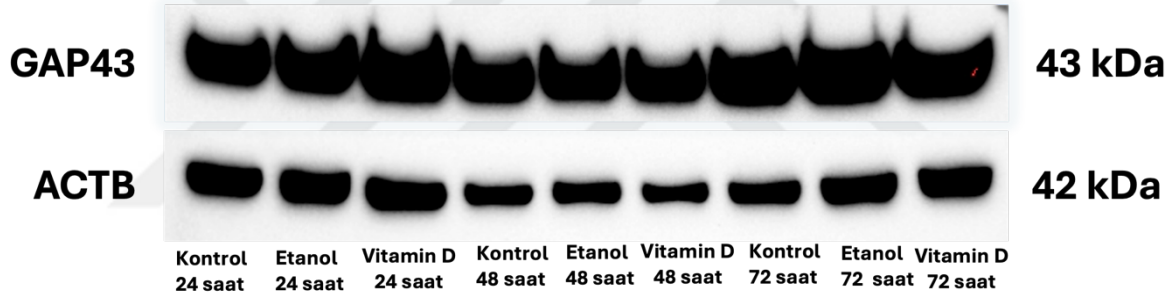


Şekil 4-15. Vitamin D uygulamaları sonucu 14-3-3 zeta/delta protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

A-B. Uygulamalardan 24 ve 48 saat sonra 14-3-3 zeta/delta protein ekspresyon seviyesi, vitamin D grubunda kontrol kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.001$). **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra ise 14-3-3 zeta/delta protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.001$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

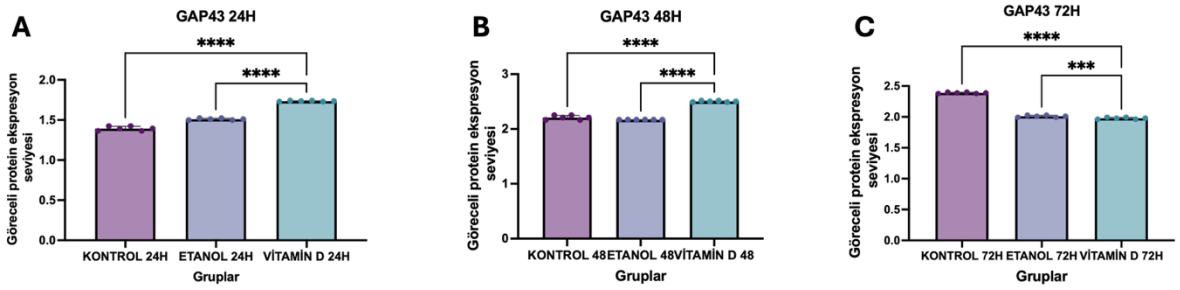
4.4.1.5. Büyüme ile İlişkili Protein 43(GAP-43) protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72 saat sonra GAP43 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-16 ve Şekil 4-17'de gösterilmektedir.



Şekil 4-16. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında GAP43 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.

ACTB (Beta Aktin) antikoru referans protein olarak kullanılmıştır.



Şekil 4-17. Vitamin D uygulamaları sonucu GAP-43 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

A-B. Uygulamalardan 24 ve 48 saat sonra GAP-43 protein ekspresyon seviyesi, vitamin D grubunda hem kontrol hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; p<0.0001, p<0.0001, p<0.0001, p<0.0001). **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra ise GAP-43 protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda hem kontrol grubuna hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla; p<0.0001, p<0.001). * p<0.05, ** p<0.01,*** p<0.001, **** p<0.0001.

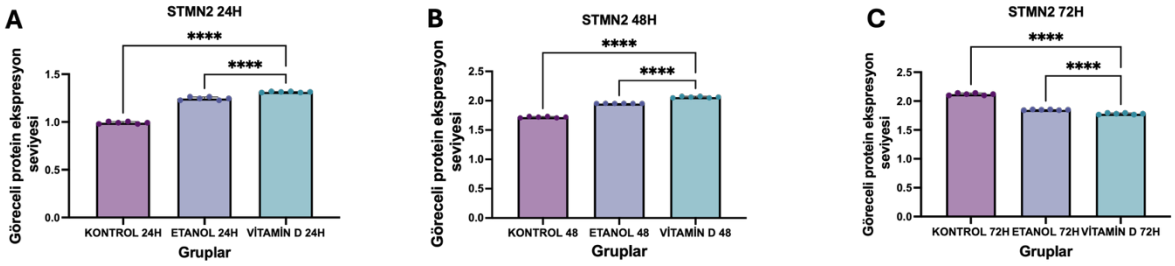
4.4.1.6. STMN2 protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72 saat sonra STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-18 ve Şekil 4-19'da gösterilmektedir.



Şekil 4-18. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında STMN2 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.

ACTB (Beta Aktin) antikoru referans protein olarak kullanılmıştır.



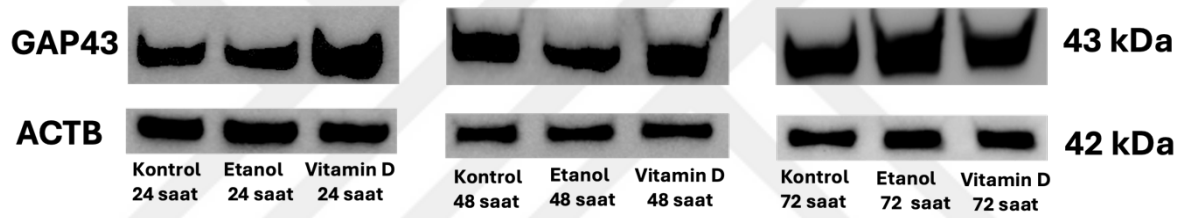
Şekil 4-19. Vitamin D uygulamaları sonucu STMN2 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

A-B. Uygulamalardan 24 ve 48 saat sonra STMN2 protein ekspresyon seviyesi, vitamin D grubunda hem kontrol hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; p<0.0001, p<0.0001, p<0.0001, p<0.0001). **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra ise STMN2 protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda hem kontrol grubuna hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla; p<0.0001, p<0.0001). * p<0.05, ** p<0.01,*** p<0.001, **** p<0.0001.

4.4.2. Olgun bir nöronda akson hasarı sonrasında vitamin D uygulamalarına bağlı olarak protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

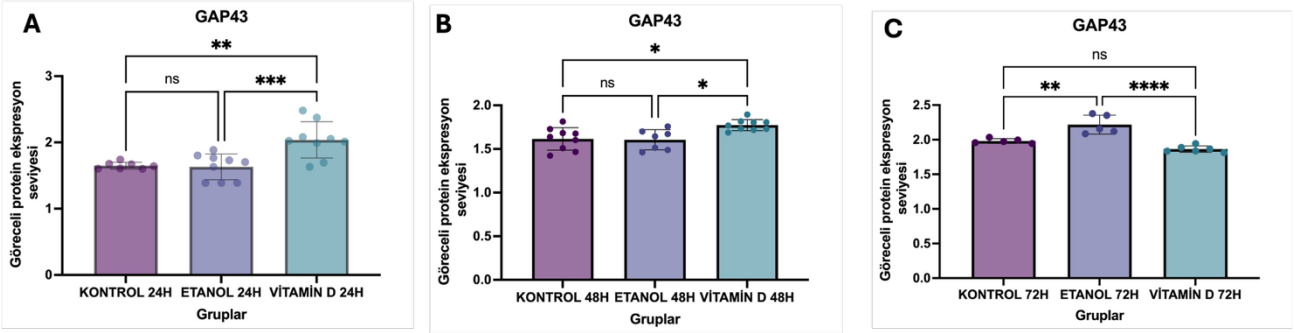
4.4.2.1. Büyüme ile İlişkili Protein 43(GAP-43) protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

In vitro kültür koşullarında 7. gün (DIV7) itibari ile nöronlar, olgun nöronal fenotip özelliklerini kazanmış kabul edilmektedir. Olgun nöronlara akson hasarı sonrasında vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72 saat sonra rejenerasyon ile ilişkili bir protein olan GAP43 ekspresyon seviyesindeki değişiklikler Şekil 4-20 ve Şekil 4-21'de gösterilmektedir.



Şekil 4-20. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında GAP43 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.

ACTB (Beta Aktin) antikoru referans protein olarak kullanılmıştır.



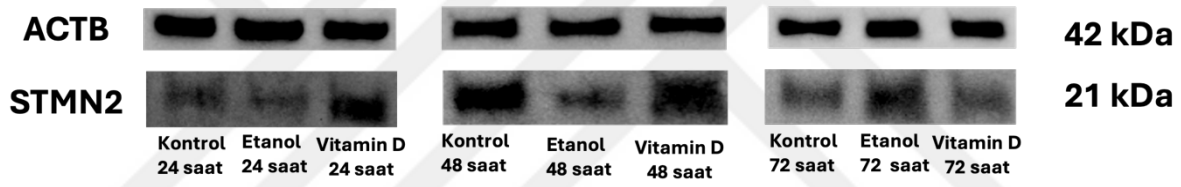
Şekil 4-21. Vitamin D uygulamaları sonucu GAP43 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler.

A. Uygulamalardan 24 saat sonra GAP-43 protein ekspresyon seviyesi, vitamin D grubunda hem kontrol hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır

(sırasıyla; p<0.01, p<0.001). **B.** Uygulamalardan 48 saat sonra GAP-43 protein ekspresyon seviyesi, vitamin D grubunda hem kontrol hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; p<0.05, p<0.05). **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra ise GAP-43 protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda hem kontrol grubuna hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır (sırasıyla; p<0.01, p<0.0001). * p<0.05, ** p<0.01,*** p<0.001, **** p<0.0001.

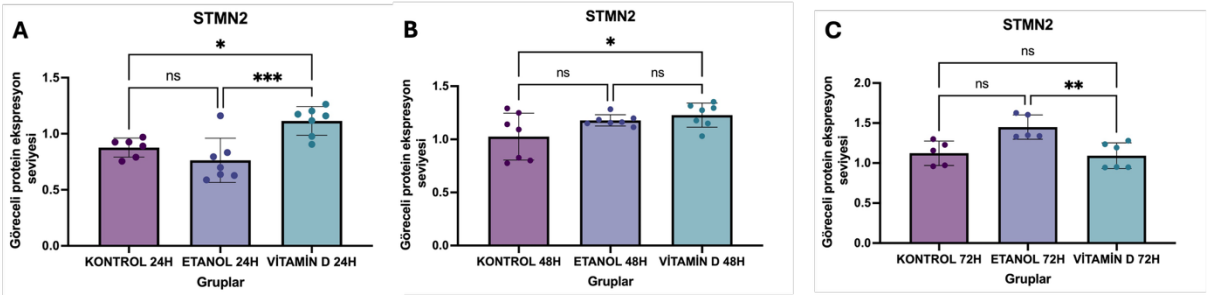
4.4.2.2. STMN2 protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

Olgun nöronlara akson hasarı sonrasında vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72 saat sonra rejenerasyon ile ilişkili bir protein olan STMN2 ekspresyon seviyesindeki değişiklikler Şekil 4-22 ve Şekil 4-23 'de gösterilmektedir.



Şekil 4-22. Uygulamalardan sonra belirtilen zaman aralıklarındaki hücre gruplarında GAP43 protein ekspresyon seviyelerini gösteren Western blot görüntüsü.

ACTB (Beta Aktin) antikoru referans protein olarak kullanılmıştır.



Şekil 4-23. Vitamin D uygulamaları sonucu STMN2 protein ekspresyon seviyesinde görülen değişimler

A. Uygulamalardan 24 saat sonra STMN2 protein ekspresyon seviyesi, vitamin D grubunda hem kontrol grubuna hem de etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; p<0.05, p<0.001). **B.** Uygulamalardan 48 saat sonra STMN2 protein

ekspresyon seviyesi, vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra ise STMN2 protein ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.01$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

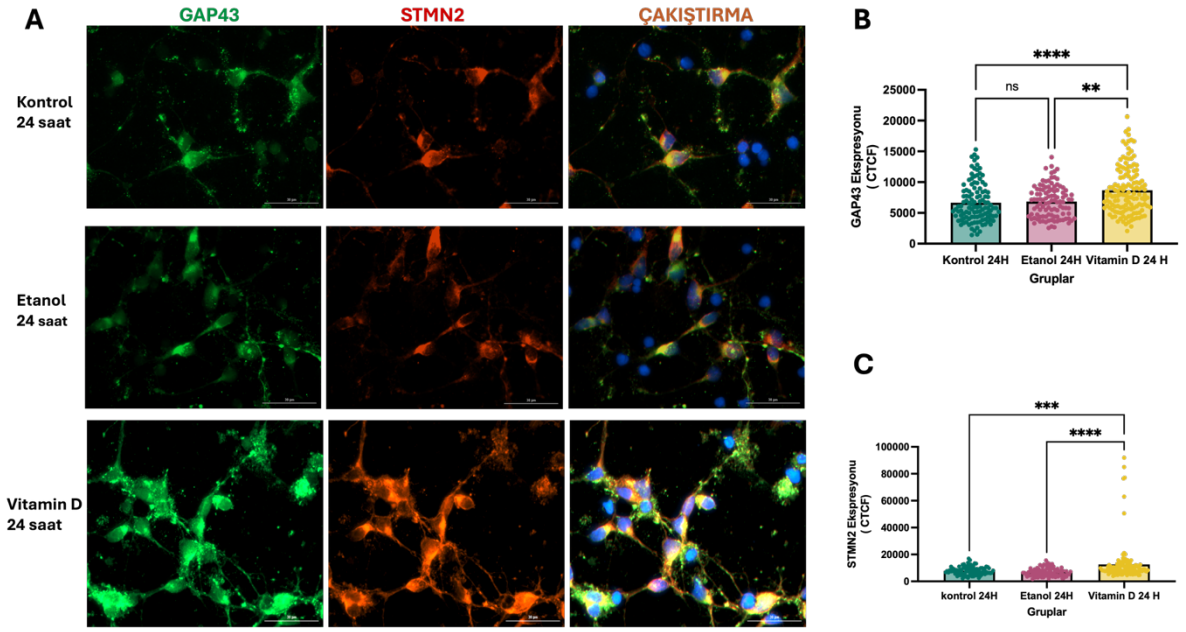
4.5. İmmunfloresan işaretleme sonuçları

4.5.1. Gelişim aşamasındaki bir nöronda vitamin D uygulamalarına bağlı olarak GAP 43 ve STMN2 proteinlerinin immun floresan işaretleme ile gösterilmesi

Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde ve 5. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48, 72 ve 120 saat sonra GAP43 ve STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler immunfloresan işaretleme ile gösterildi.

4.5.1.1. GAP43 ve STMN2 protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

- Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24 saat sonra GAP43 ve STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-24'te gösterilmektedir.

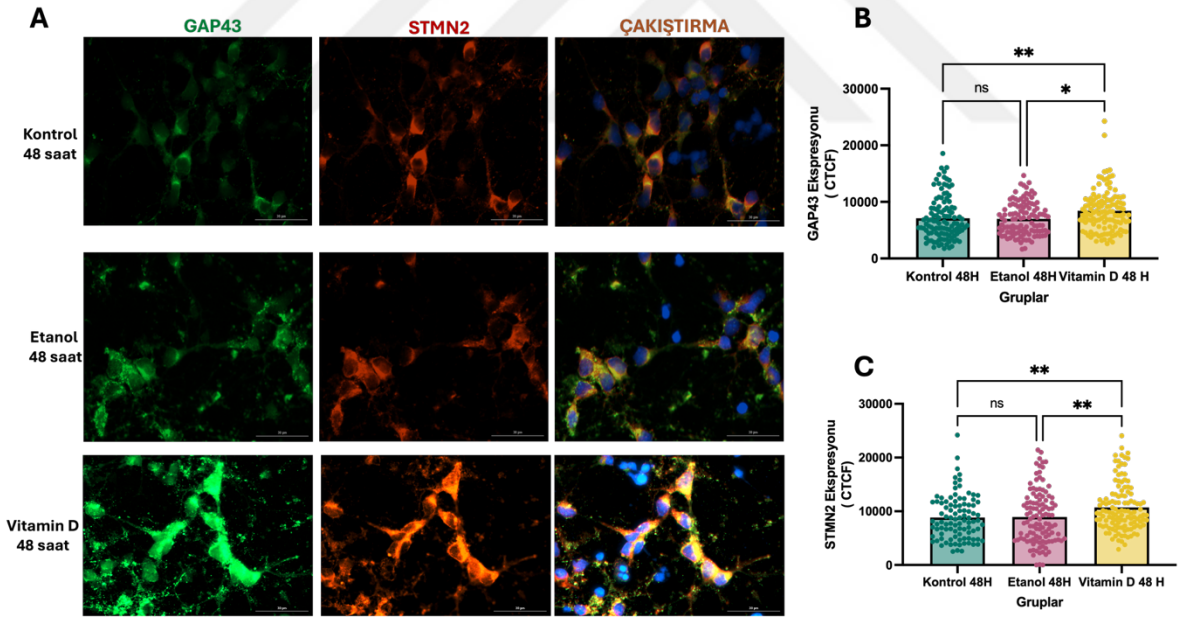


Şekil 4-24. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 24 saat sonra GAP43 ve STMN2 proteinlerinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A.** GAP43 yeşil, STMN2 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **B.** Uygulamalardan 24 saat sonra gruplar arasında GAP43 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir. **C.** Uygulamalardan 24 saat sonra gruplar arasında STMN2 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 24 saat sonra GAP43 ekspresyonu vitamin D grubunda hem etanol grubuna hem de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla p<0,01; p<0,0001). Uygulamalardan 24 saat sonra STMN2 ekspresyon seviyesi de vitamin D grubunda hem etanol hem de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; p<0,0001; p<0,001). * p<0.05, ** p<0.01,*** p<0.001, **** p<0.0001.

- Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 48 saat sonra GAP43 ve STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-25'te gösterilmektedir.



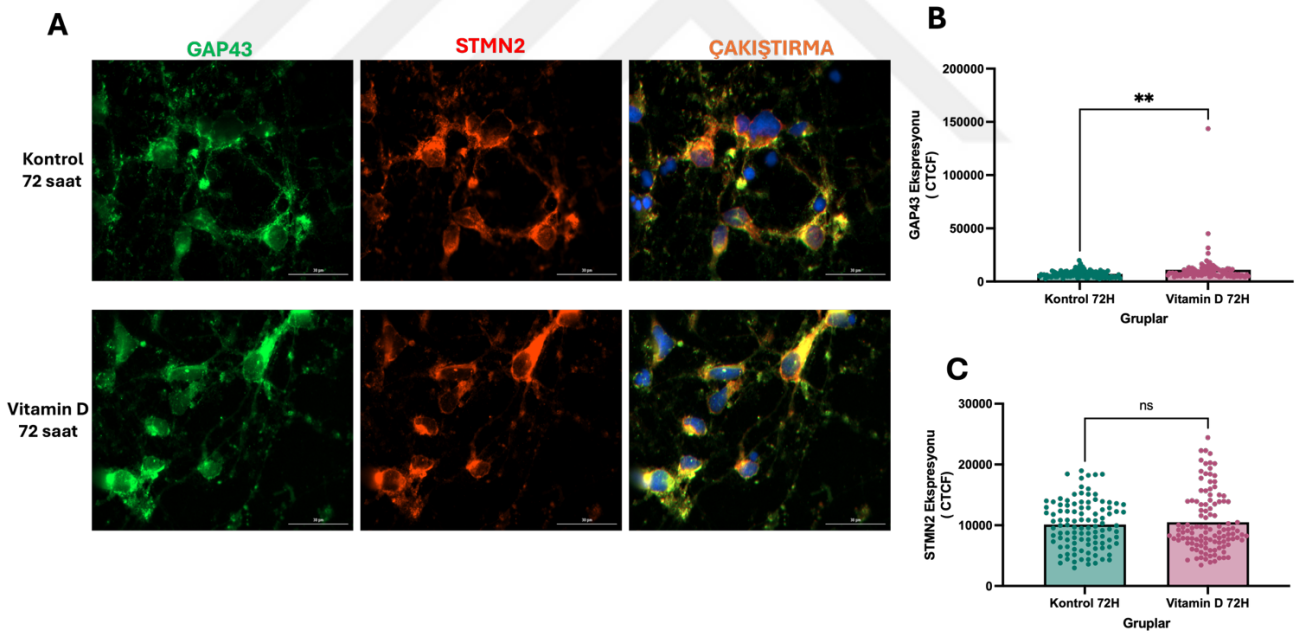
Şekil 4-25. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 48 saat sonra GAP43 ve STMN2 proteinlerinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A.** GAP43 yeşil, STMN2 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **B.** Uygulamalardan 48 saat sonra gruplar arasında GAP43 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

C. Uygulamalardan 48 saat sonra gruplar arasında STMN2 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 48 saat sonra GAP43 ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda hem etanol grubuna hem de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla<0,01; p<0,0001). Uygulamalardan 48 saat sonra da STMN2 ekspresyon seviyesi de vitamin D grubunda hem etanol hem de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; p<0,0001; p<0,001). * p<0.05, ** p<0.01,*** p<0.001, **** p<0.0001.

- Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 72 saat sonra GAP43 ve STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-26'da gösterilmektedir.

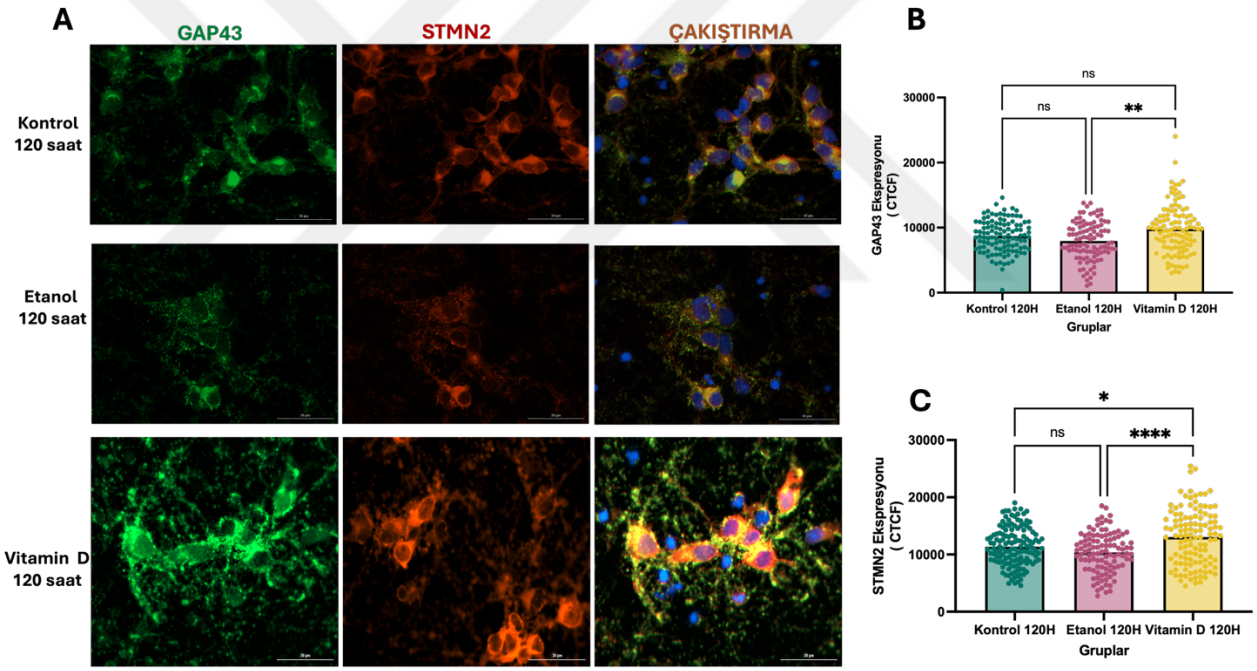


Şekil 4-26. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 72 saat sonra GAP43 ve STMN2 proteinlerinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A.**GAP43 yeşil, STMN2 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **B.** Uygulamalardan 72 saat sonra gruplar arasında GAP43 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir. **C.** Uygulamalardan 72 saat sonra gruplar arasında STMN2 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 72 saat sonra GAP43 ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,01$). Uygulamalardan 72 saat sonra ise STMN2 ekspresyon seviyesi gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark göstermemektedir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Gelişim aşamasındaki kortikal nöronlara kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamadan 72 saat ise doz tekrarları gerçekleştirildi. 7 günlük kortikal nöronların uygulamaların 120. saatinde gerçekleştirilen GAP43 ve STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-27'de gösterilmektedir.



Şekil 4-27. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 120 saat sonra GAP43 ve STMN2 proteinlerinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi

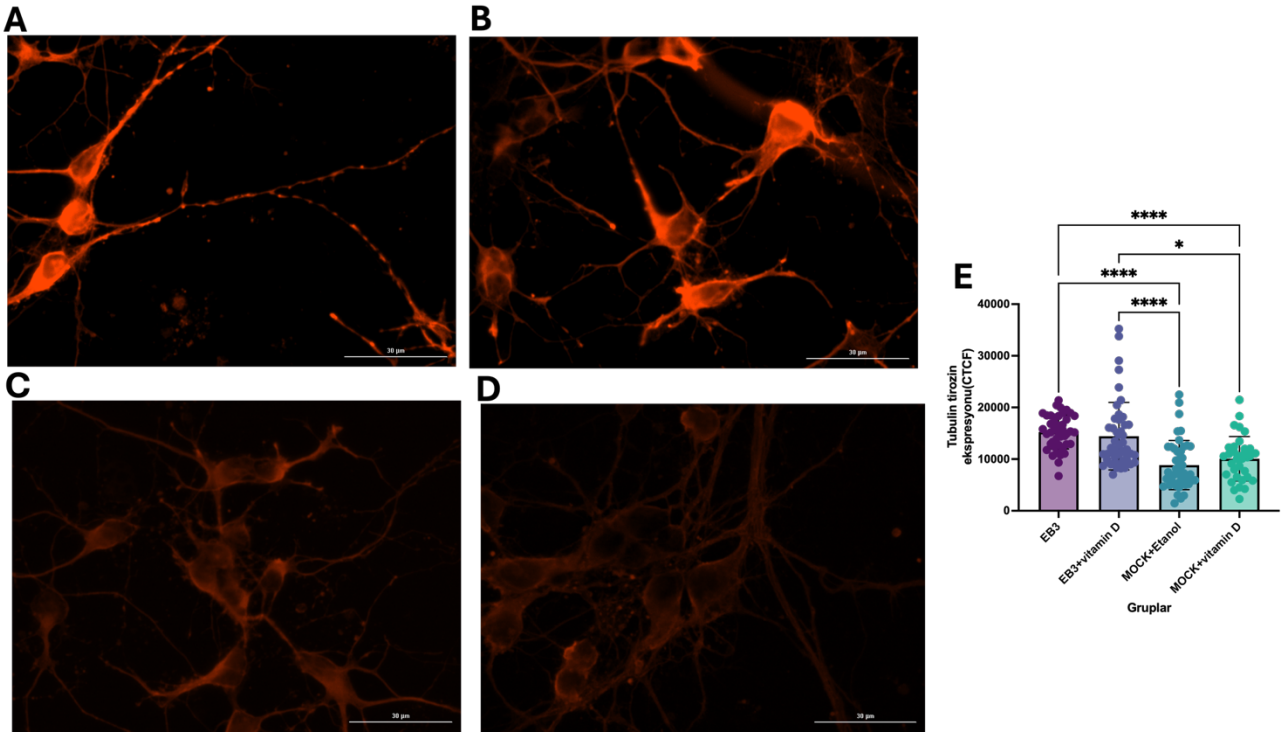
Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A.**GAP43 yeşil, STMN2 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **B.** Uygulamalardan 120 saat sonra gruplar arasında GAP43 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir. **C.** Uygulamalardan 120 saat sonra gruplar arasında STMN2 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 120 saat sonra GAP43 ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,01$). STMN2 ekspresyon seviyesi ise vitamin D grubunda hem kontrol grubuna hem de vitamin D grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.05$, <0.0001). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

4.5.2. Gelişim aşamasındaki bir nöronda dinamik mikrotübül yoğunluğunun gösterilmesi

Gelişim aşamasında dinamik mikrotübül yoğunluğunu göstermek için EB3-GFP ekspresyonu ile mikrotübülün büyüme sürecini regüle edilen ve nöritogenezi indüklenen nöronlarda uygulamalardan 30 dakika, 1, 2, 12, 24, 48, 72 saat sonra dinamik mikrotübül belirteci olan tubulin tirozin ile immunfloresan işaretleme deneyleri yapıldı. Uygulamalara EB3-GFP etkinliği GFP ışıması takip edilerek ve ışımanın en yüksek olduğu saat aralığı olan 72 saat olarak belirlendikten sonra başlandı (Şekil 3-2).

- Vitamin D ve etanol uygulamalarından 30 dakika sonra tirozinlenmiş tubulin protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-28'de gösterilmektedir.

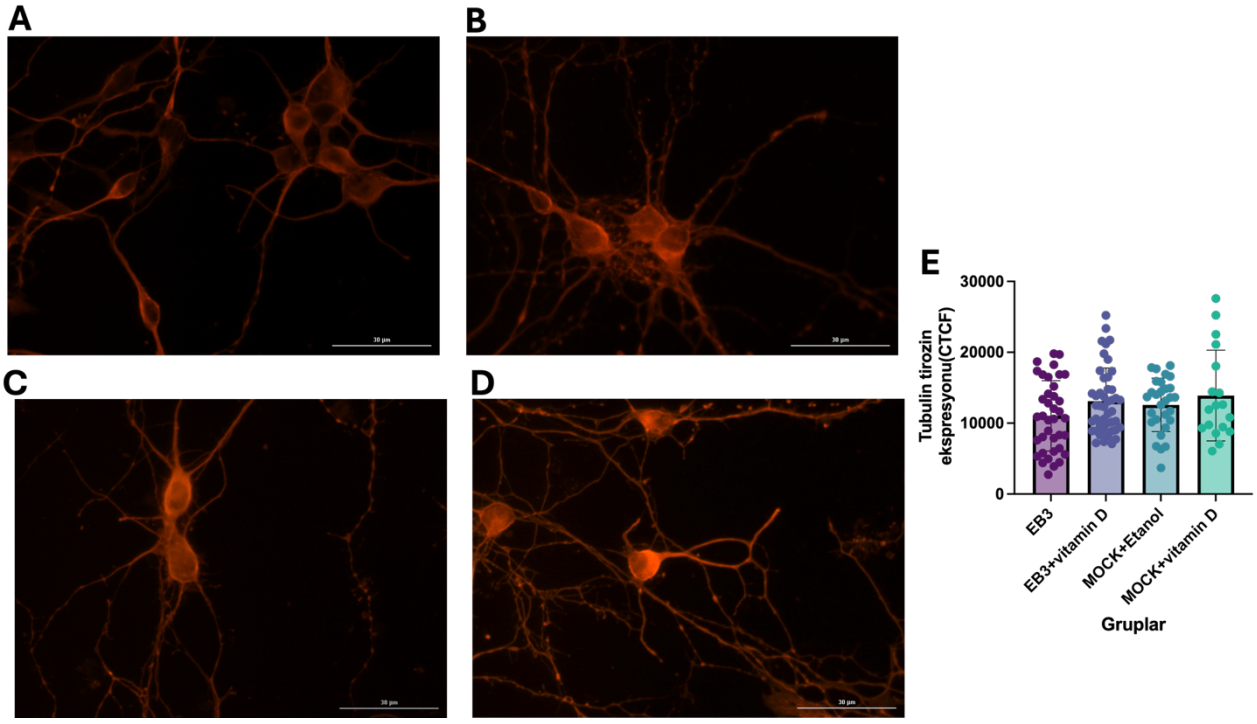


Şekil 4-28. Uygulamalardan 30 dakika sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

A. EB3-GFP transdüksiyonu yapılan kontrol grubu. B. EB3-GFP transdüksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup. C. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) ve etanol uygulanan grup. D. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) transfeksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan kontrol grubu. Büyütme 60X. Tirozinlenmiş tubulin kırmızı renkte gösterilmektedir. E. Uygulamalardan 30 dakika sonra gruplar arasındaki tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 30 dakika sonra EB3+vitamin D grubunda tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi hem MOCK+etanol hem de MOCK+vitaminD grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.05$). EB3 grubunda da hem MOCK+etanol hem de MOCK+vitamin D grubuna kıyasla tirozinlenmiş tubulin seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$). ($p<0,001$) * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Vitamin D ve etanol uygulamalarından 1 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-29'da gösterilmektedir.

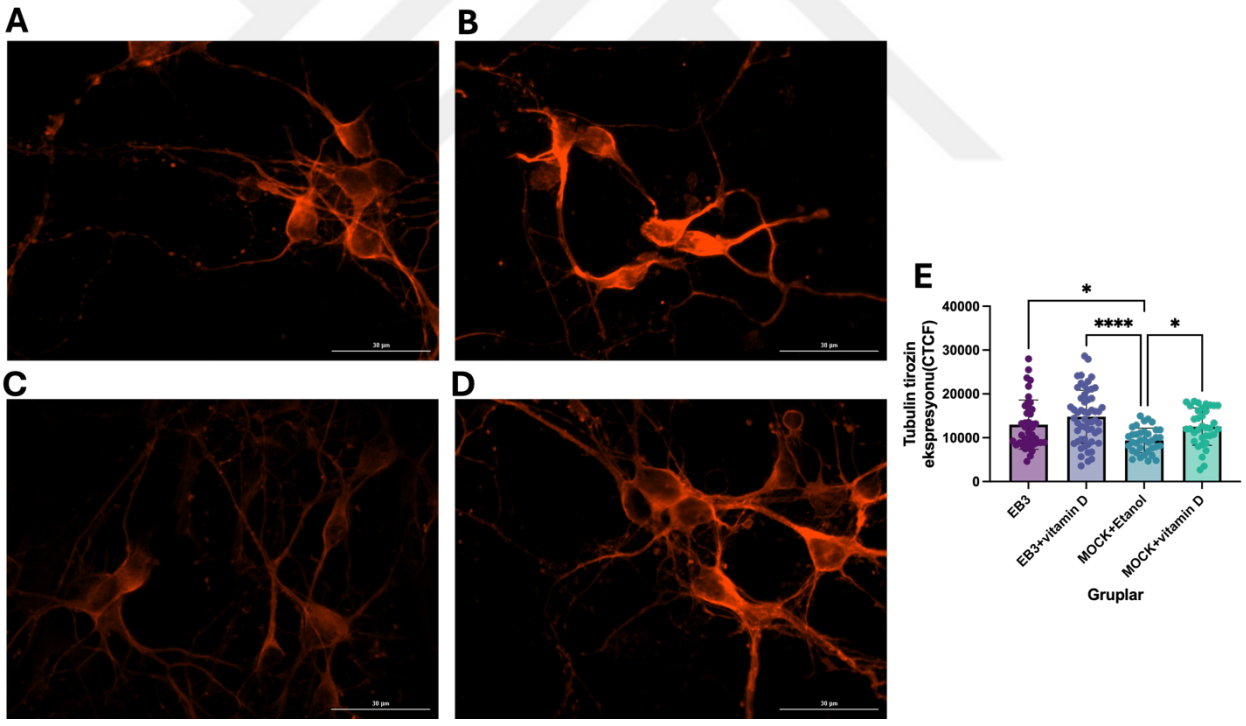


Şekil 4-29. Uygulamalardan 1 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

A. EB3-GFP transdüksiyonu yapılan kontrol grubu. B. EB3-GFP transdüksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup. C. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) ve etanol uygulanan grup. D. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) transfeksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan kontrol grubu. Büyütme 60X. Tirozinlenmiş tubulin kırmızı renkte gösterilmektedir. E. Uygulamalardan 1 saat sonra gruplar arasındaki tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 1 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir.

- Vitamin D ve etanol uygulamalarından 2 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-30'da gösterilmektedir.



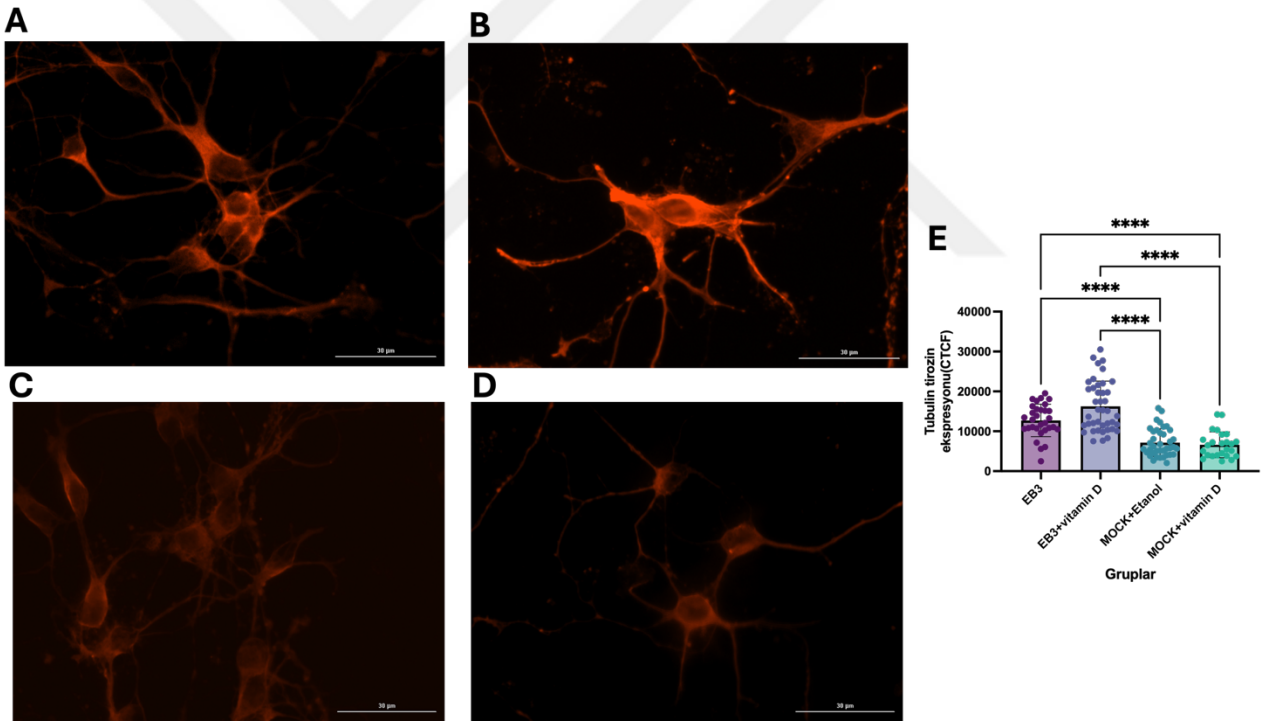
Şekil 4-30. Uygulamalardan 2 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

A. EB3-GFP transdüksiyonu yapılan kontrol grubu. B. EB3-GFP transdüksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup. C. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) ve etanol uygulanan grup. D. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) transfeksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması

yapılan kontrol grubu. Büyütme 60X. Tirozinlenmiş tubulin kırmızı renkte gösterilmektedir. E. Uygulamalardan 2 saat sonra gruplar arasındaki tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 2 saat sonra EB3+vitamin D grubunda tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi MOCK+etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.0001$). EB3 grubunda ise MOCK+etanol grubuna kıyasla tirozinlenmiş tubulin seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). (* $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Vitamin D ve etanol uygulamalarından 12 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-31'de gösterilmektedir.

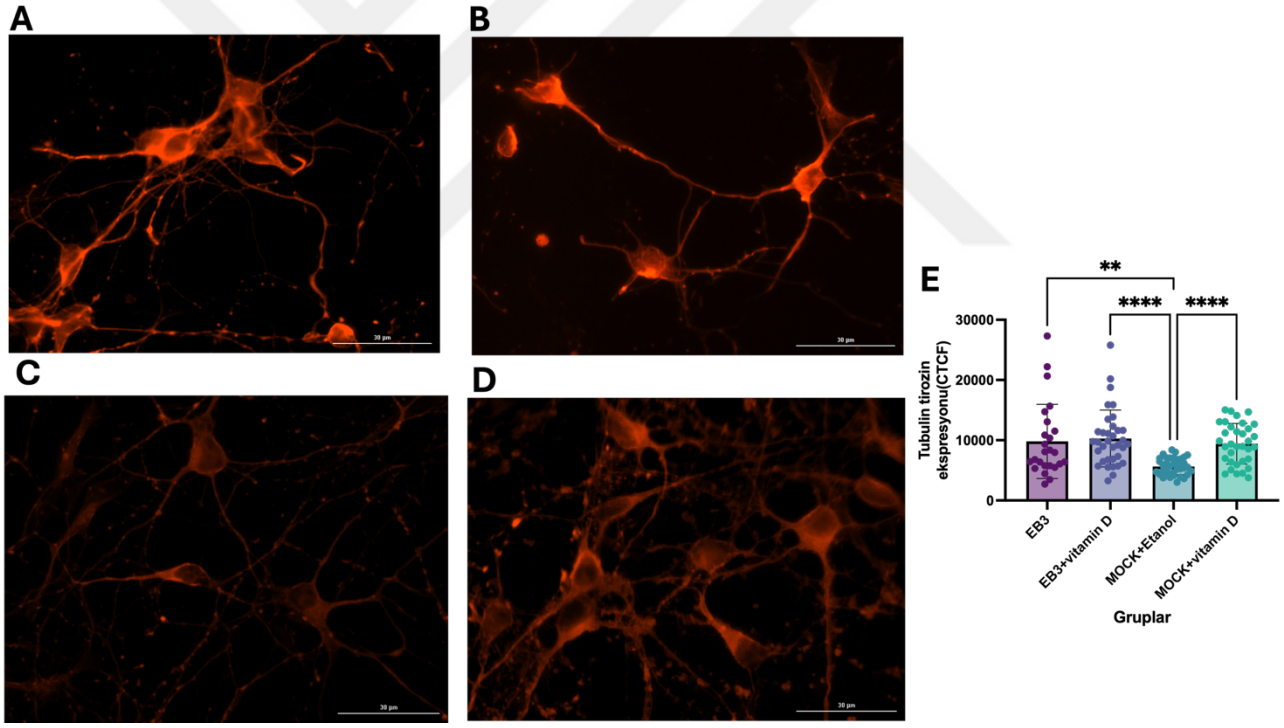


Şekil 4-31. Uygulamalardan 12 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

A. EB3-GFP transdüksiyonu yapılan kontrol grubu. B. EB3-GFP transdüksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup. C. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) ve etanol uygulanan grup. D. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) transfeksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan kontrol grubu. Büyütme 60X. Tirozinlenmiş tubulin kırmızı renkte gösterilmektedir. E. Uygulamalardan 12 saat sonra gruplar arasındaki tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 12 saat sonra EB3+vitamin D grubunda tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi hem MOCK+etanol hem de MOCK+vitaminD grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$). EB3 grubunda da hem MOCK+etanol hem de MOCK+vitamin D grubuna kıyasla tirozinlenmiş tubulin seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Vitamin D ve etanol uygulamalarından 24 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-32'de gösterilmektedir.



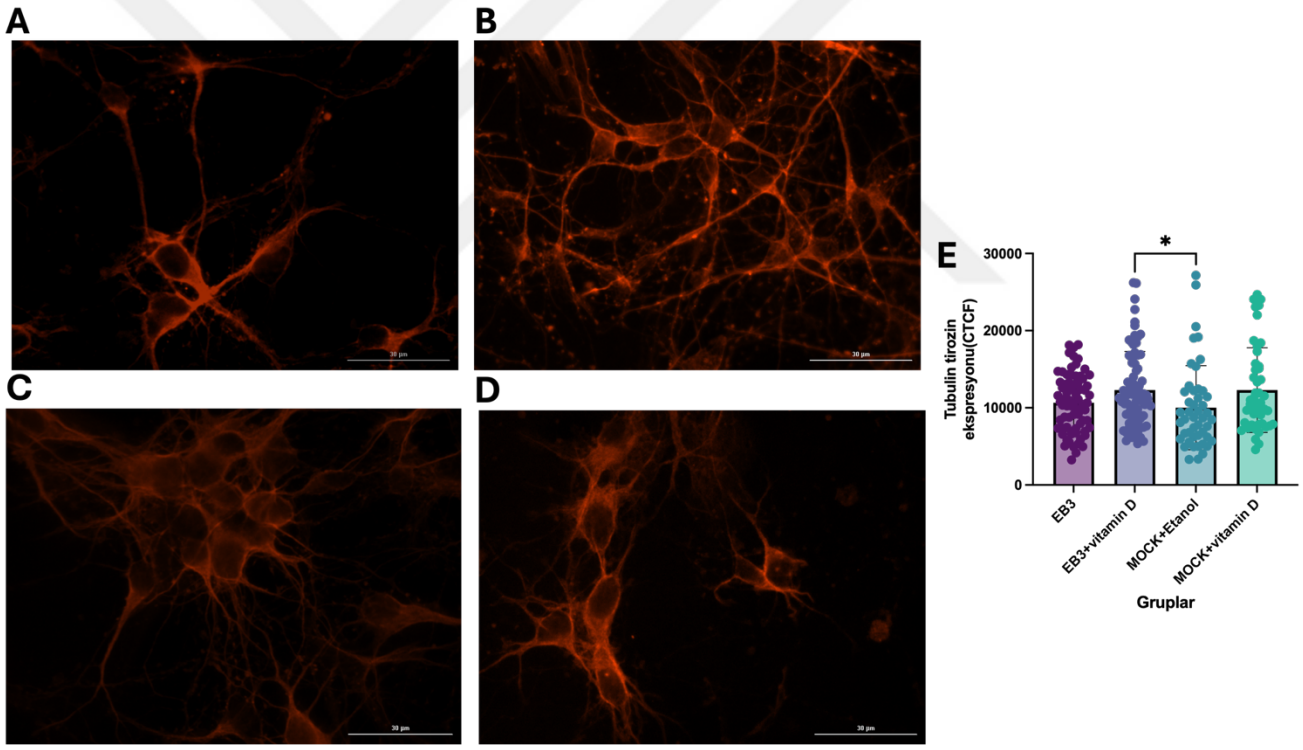
Şekil 4-32. Uygulamalardan 24 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

A. EB3-GFP transdüksiyonu yapılan kontrol grubu. B. EB3-GFP transdüksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup. C. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) ve etanol uygulanan grup. D. Myc-GFP etiketi içeren boş plazmid (MOCK plazmid) transfeksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan kontrol grubu. Büyütme 60X. Tirozinlenmiş tubulin kırmızı renkte gösterilmektedir. E.

Uygulamalardan 24 saat sonra gruplar arasındaki tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 24 saat sonra EB3+vitamin D grubunda tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi MOCK+etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.0001$). EB3 grubunda da MOCK+etanol grubuna kıyasla tirozinlenmiş tubulin seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.01$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Vitamin D ve etanol uygulamalarından 48 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-33'te gösterilmektedir.

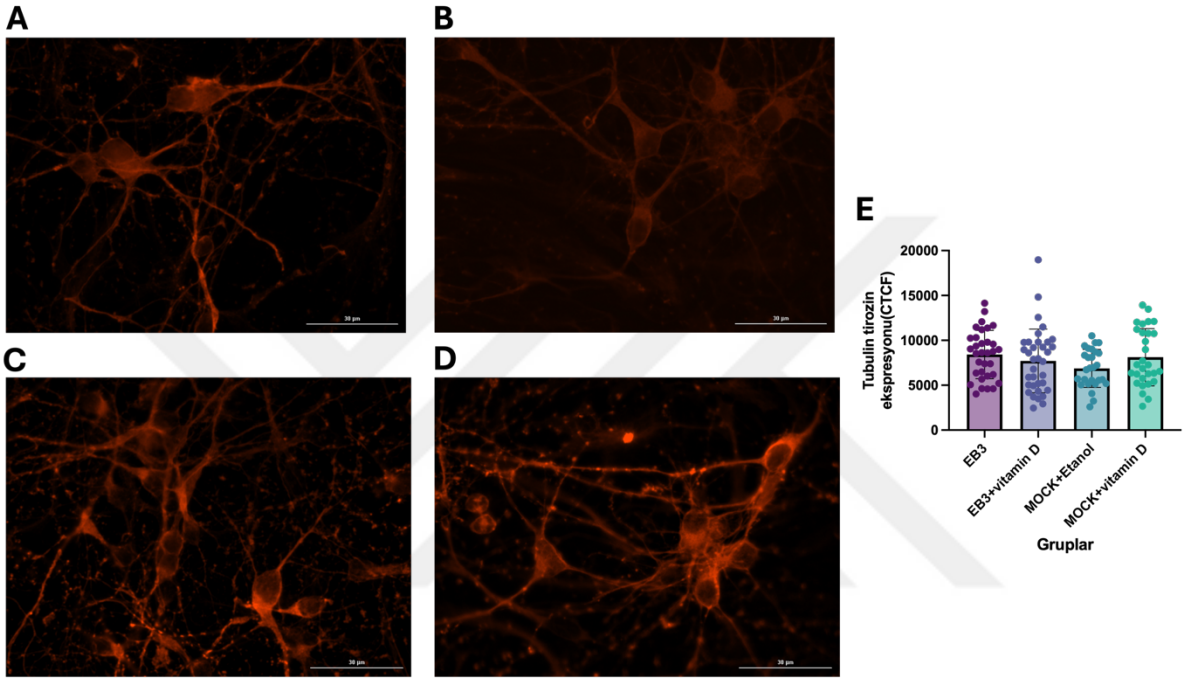


Şekil 4-33. Uygulamalardan 48 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

A. EB3-GFP transdüksiyonu yapılan kontrol grubu. B. EB3-GFP transdüksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup. C. Myc-GFP etiketi içeren boş plasmid (MOCK plazmid) ve etanol uygulanan grup. D. Myc-GFP etiketi içeren boş plasmid (MOCK plazmid) transfeksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan kontrol grubu. Büyütme 60X. Tirozinlenmiş tubulin kırmızı renkte gösterilmektedir. E. Uygulamalardan 48 saat sonra gruplar arasındaki tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 48 saat sonra tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi EB3+vitamin D grubunda MOCK+etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Vitamin D ve etanol uygulamalarından 72 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-34'te gösterilmektedir.



Şekil 4-34. Uygulamalardan 72 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

A. EB3-GFP transdüksiyonu yapılan kontrol grubu. B. EB3-GFP transdüksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan grup. C. Myc-GFP etiketi içeren boş plasmid (MOCK plazmid) ve etanol uygulanan grup. D. Myc-GFP etiketi içeren boş plasmid (MOCK plazmid) transfeksiyonu sonrasında 10^{-8} M 1,25 dihidroksivitamin D3 uygulaması yapılan kontrol grubu. Büyütme 60X. Tirozinlenmiş tubulin kırmızı renkte gösterilmektedir. E. Uygulamalardan 72 saat sonra gruplar arasındaki tirozinlenmiş tubulin ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

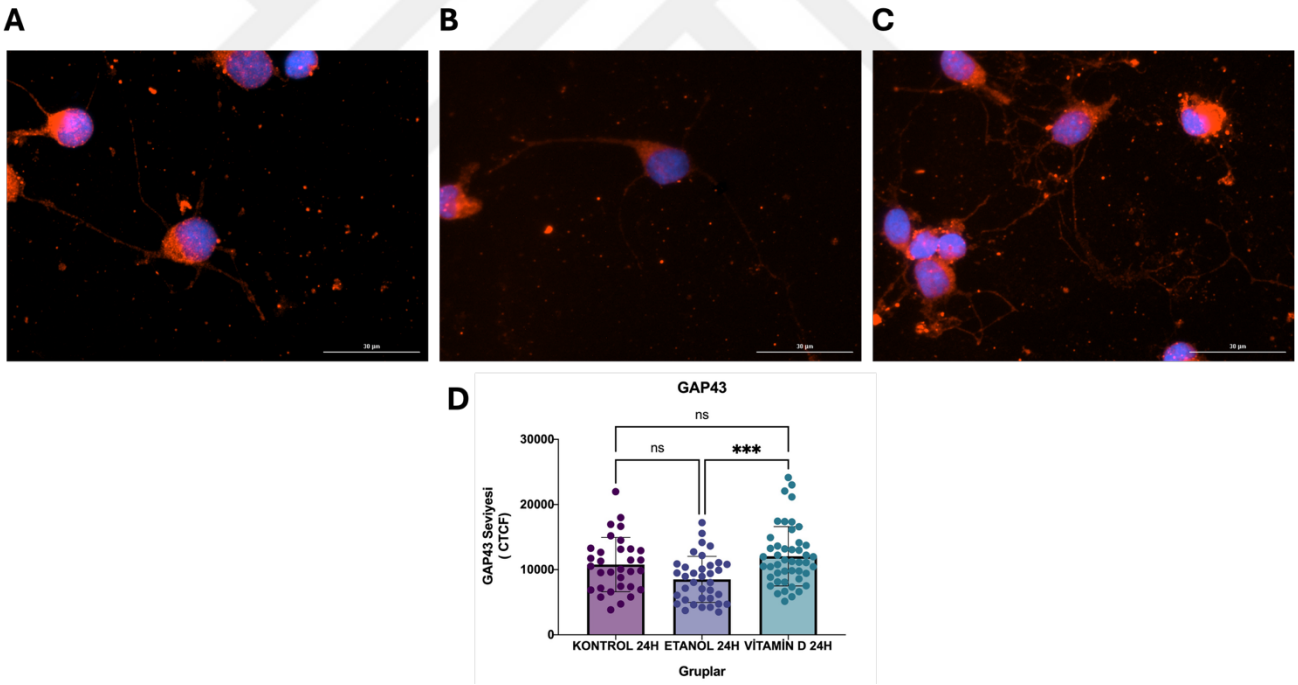
Uygulamalardan 72 saat sonra tirozinlenmiş tubulin protein seviyesi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir.

4.5.3. Akson hasarı sonrasında rejenerasyon ile ilişkili proteinlerin seviyesinin gösterilmesi.

Olgun nöronlar olarak kabul edilen 7 günlük kortikal nöronlarda aksonal hasar modeli gerçekleştirildi. Aksonal dejenerasyondan hemen sonra vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24, 48 ve 72 saat sonra ise GAP43 ve STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler immunfloresan işaretleme ile gösterildi.

4.5.3.1. GAP43 protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

- Aksonal dejenerasyon sonrasında yeniden ekilen kortikal nöronlara vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24 saat sonra GAP43 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-35'te gösterilmektedir.

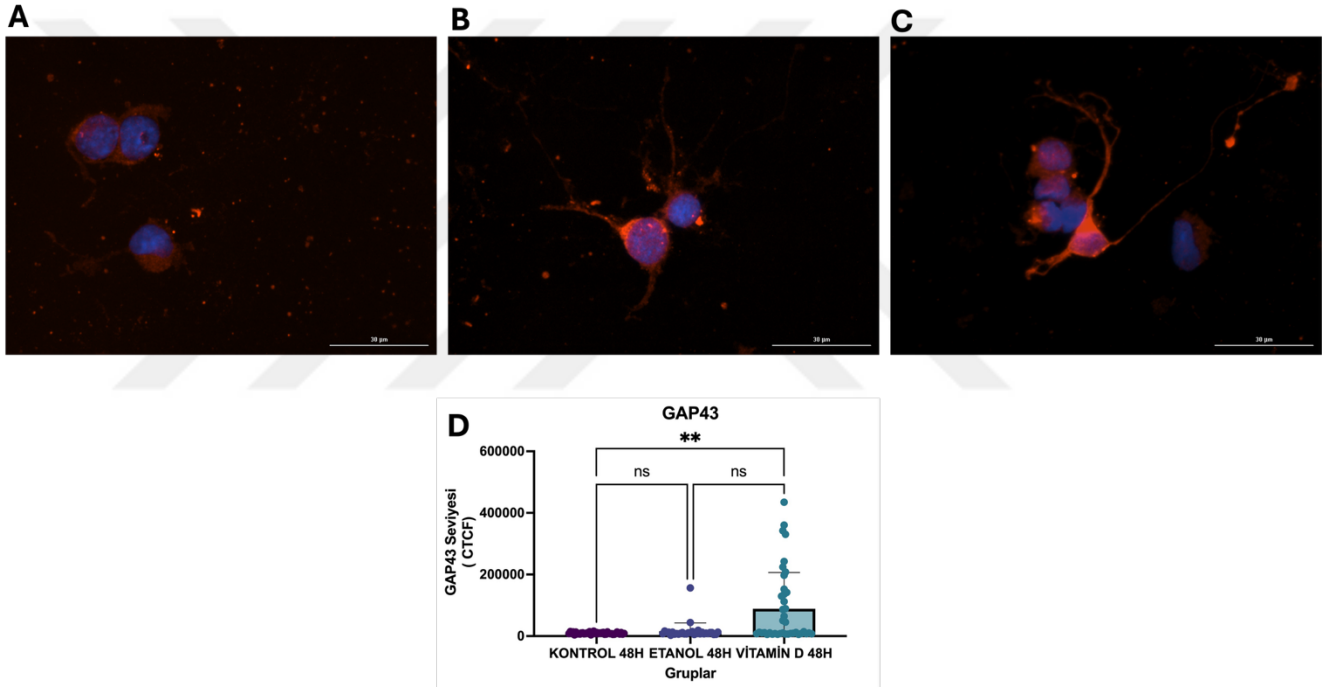


Şekil 4-35. Akson hasarından 24 saat sonra GAP43 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi

Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X **A**. Kontrol grubu, **B**. Etanol uygulaması yapılan grup. **C.** Vitamin D uygulaması yapılan grup. GAP43 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **D**. Uygulamalardan 24 saat sonra gruplar arasındaki GAP43 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 24 saat sonra GAP43 ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,001$) * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Aksonal dejenerasyon sonrasında yeniden ekilen kortikal nöronlara vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 48 saat sonra GAP43 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-36'da gösterilmektedir.

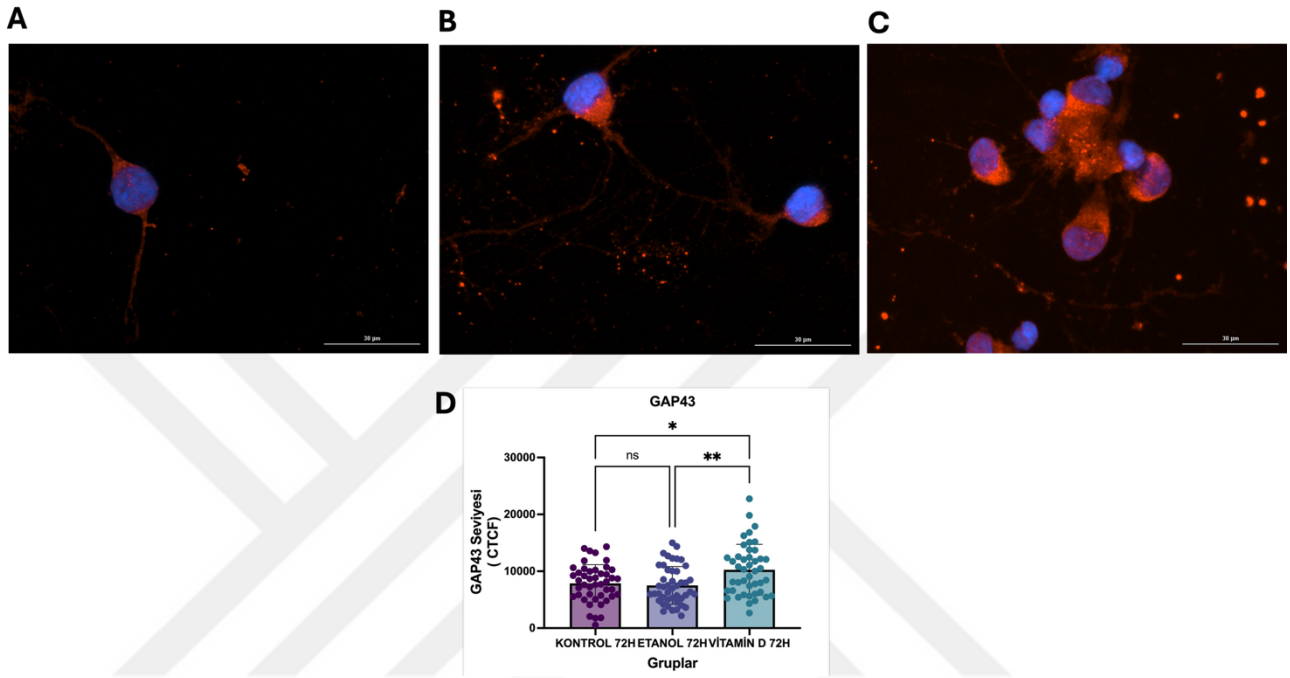


Şekil 4-36. Akson hasarından 48 saat sonra GAP43 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi

Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A**. Kontrol grubu, **B**. Etanol uygulaması yapılan grup. **C.** Vitamin D uygulaması yapılan grup. GAP43 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **D**. Uygulamalardan 48 saat sonra gruplar arasında GAP43 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 48 saat sonra GAP43 ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,01$) * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Aksonal dejenerasyon sonrasında yeniden ekilen kortikal nöronlara vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 72 saat sonra GAP43 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-37'de gösterilmektedir.



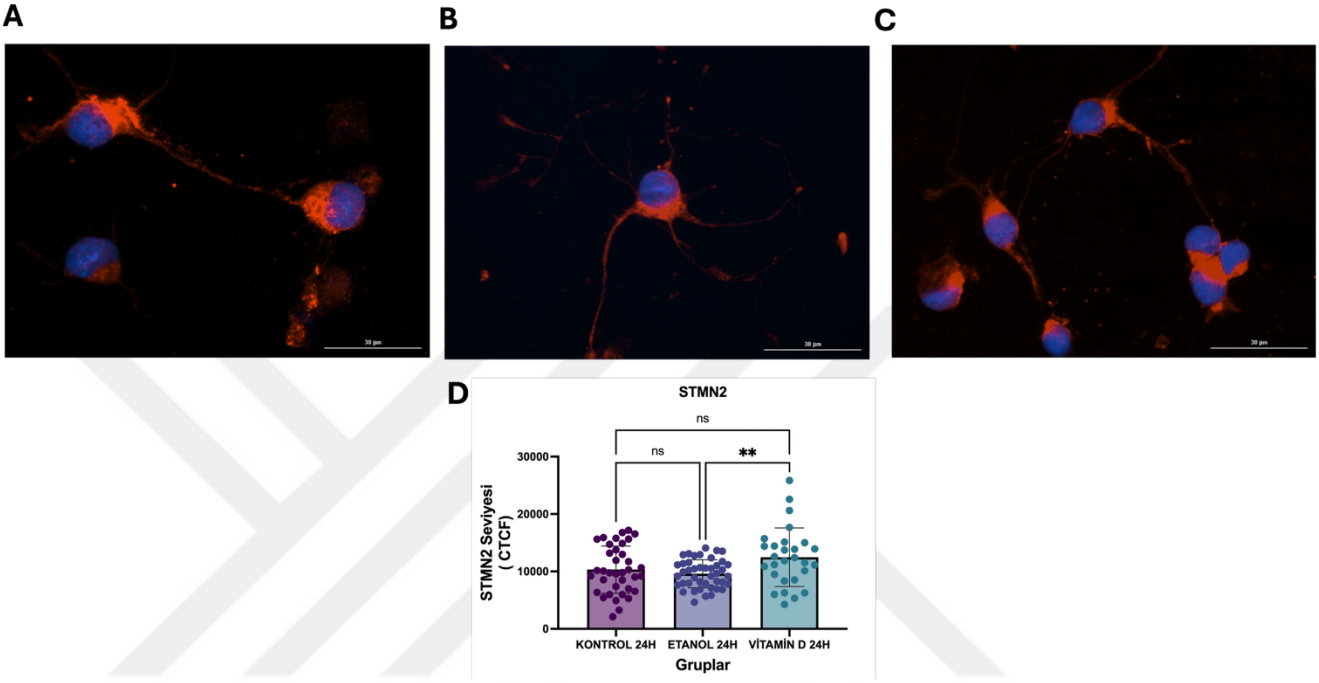
Şekil 4-37. Akson hasarından 72 saat sonra GAP43 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A**. Kontrol grubu, **B**. Etanol uygulaması yapılan grup. **C.** Vitamin D uygulaması yapılan grup. GAP43 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **D**. Uygulamalardan 72 saat sonra gruplar arasında GAP43 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 72 saat sonra GAP43 ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda hem etanol hem de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (sırasıyla; $p<0,01$, $p<0,05$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

4.5.3.2. STMN2 protein ekspresyon seviyesindeki değişimler

Aksonal dejenerasyon sonrasında yeniden ekilen kortikal nöronlara vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 24 saat sonra STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-38'de gösterilmektedir.

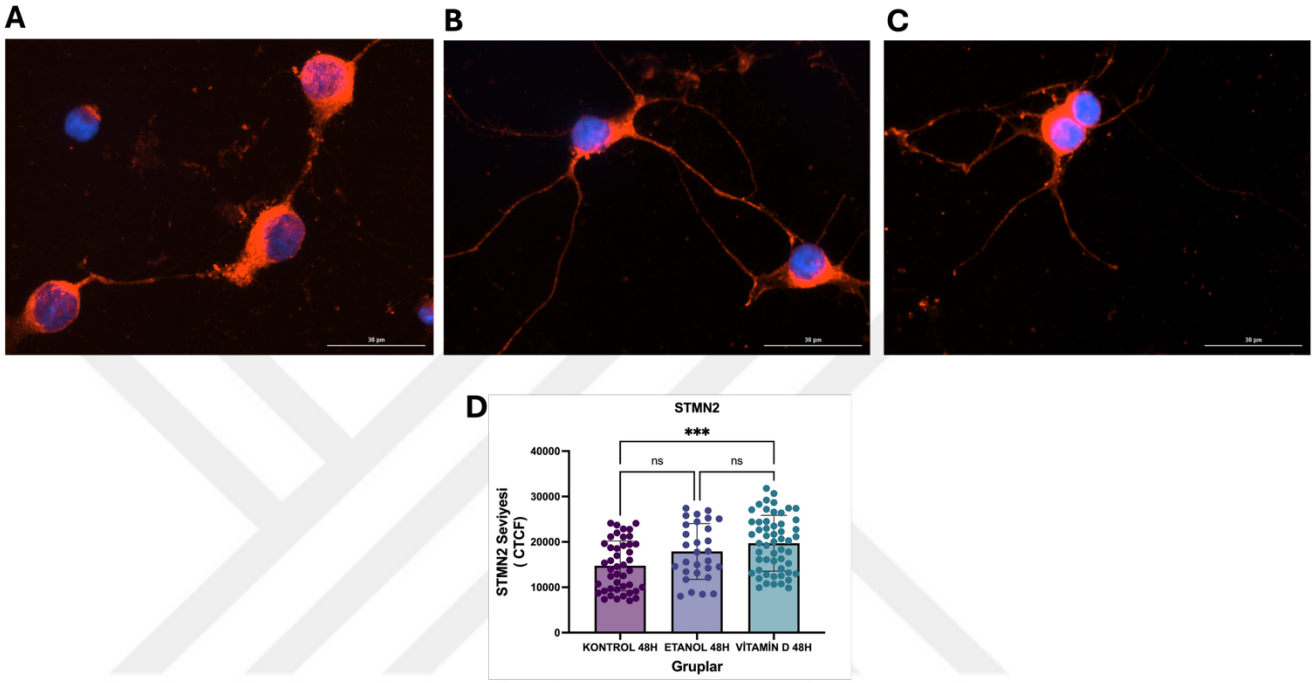


Şekil 4-38. Akson hasarından 24 saat sonra STMN2 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A**. Kontrol grubu, **B**. Etanol uygulaması yapılan grup. **C.** Vitamin D uygulaması yapılan grup. STMN2 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **D**. Uygulamalardan 24 saat sonra gruplar arasında STMN2 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 24 saat sonra STMN2 ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda etanol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,01$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Aksonal dejenerasyon sonrasında yeniden ekilen kortikal nöronlara vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 48 saat sonra STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-39'da gösterilmektedir.

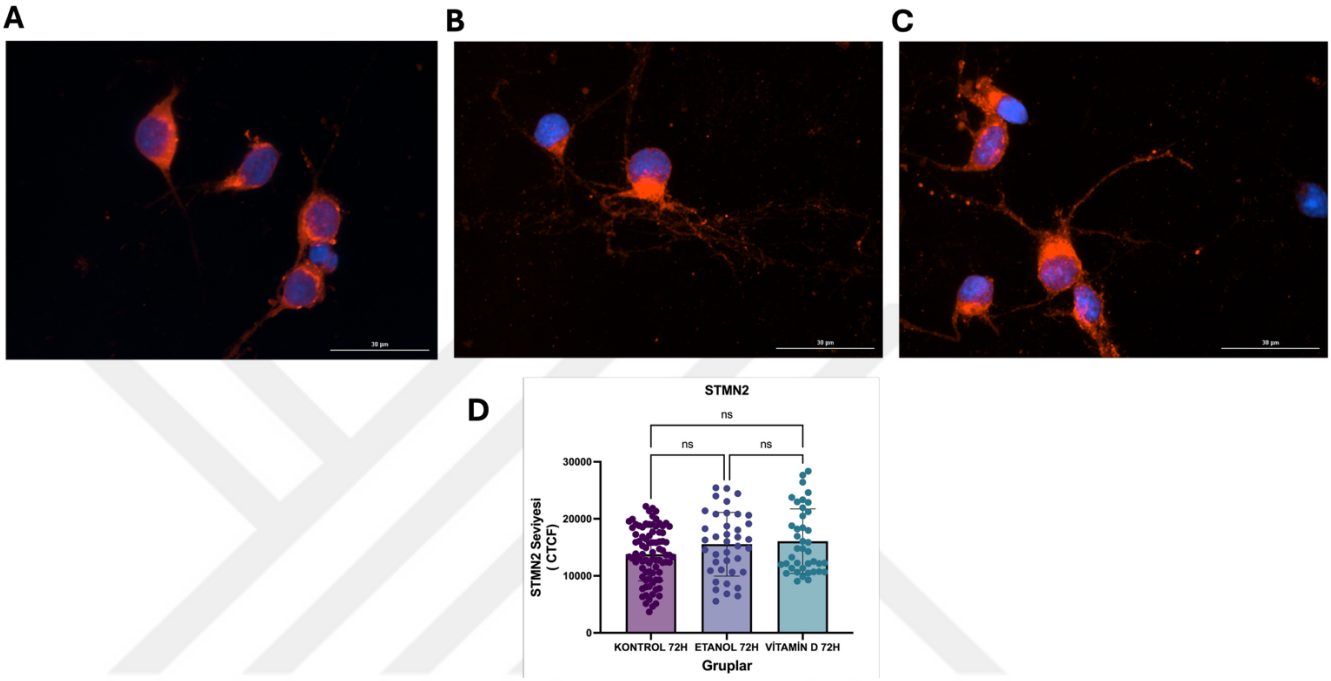


Şekil 4-39. Akson hasarından 48 saat sonra STMN2 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi.

Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A**. Kontrol grubu, **B**. Etanol uygulaması yapılan grup. **C.** Vitamin D uygulaması yapılan grup. STMN2 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **D**. Uygulamalardan 48 saat sonra gruplar arasında STMN2 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 48 saat sonra STMN2 ekspresyon seviyesi vitamin D grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır ($p<0,001$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

- Aksonal dejenerasyon sonrasında yeniden ekilen kortikal nöronlara vitamin D ve etanol uygulamaları yapıldı. Uygulamalardan 72 saat sonra STMN2 protein ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4-40'ta gösterilmektedir.



Şekil 4-40. Akson hasarından 72 saat sonra STMN2 protein seviyesinin immunfloresan işaretleme ile gösterilmesi

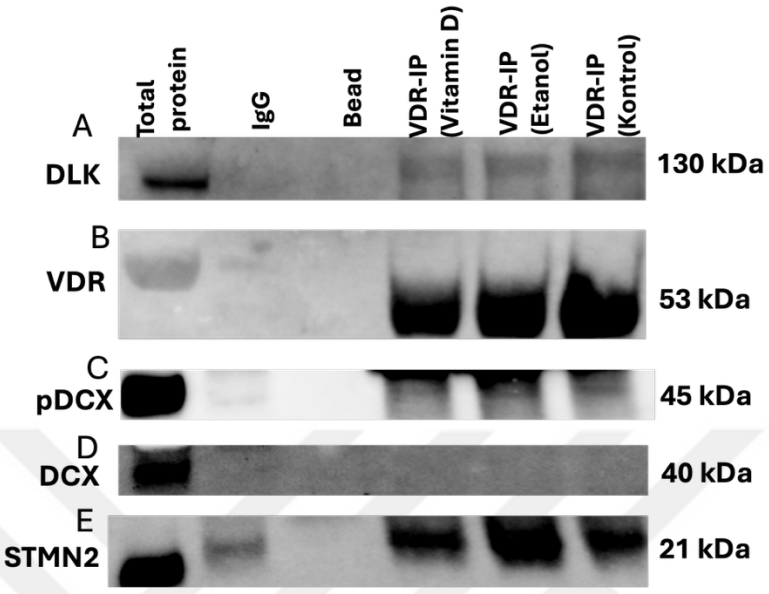
Lionheart FX Otomatik Floresan Mikroskobu (Biotek) kullanılmıştır. Büyütme 60X. **A**. Kontrol grubu, **B**. Etanol uygulaması yapılan grup. **C.** Vitamin D uygulaması yapılan grup. STMN2 kırmızı, nükleus boyası olan DAPI ise mavi renk ile gösterilmektedir. **D**. Uygulamalardan 72 saat sonra gruplar arasında STMN2 ekspresyon seviyesi gösterilmektedir.

Uygulamalardan 72 saat sonra STMN2 ekspresyon seviyesi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemektedir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$,*** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

4.6. VDR Immunpresipitasyon (VDR-IP) deneylerinin sonuçları

Gelişim aşamasındaki nöronlarda vitamin D ile birlikte bulunabilecek proteinlerin belirlenmesi amacıyla, kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamalarını takiben 30. dakika ve 12. saatte VDR immünopresipitasyon (VDR-IP) deneyleri gerçekleştirilmiştir.

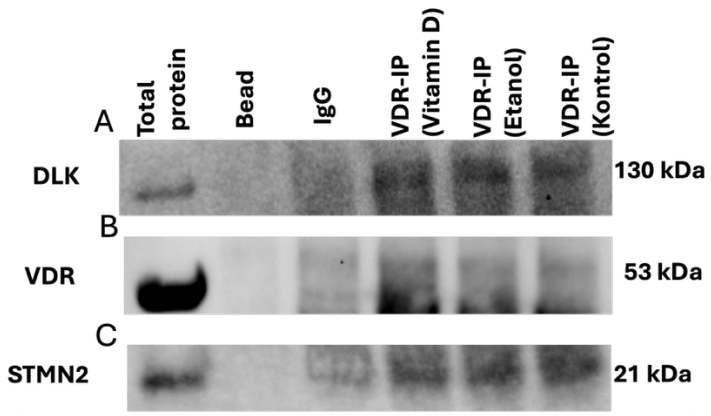
4.6.1. Uygulamalardan 30 dk sonra gerçekleştirilen VDR-IP deneyinin sonuçları



Şekil 4-41. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 30 dk sonra gerçekleştirilen VDR Co-IP Deneyleri

Kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamalarından 30 dk sonra gerçekleştirilen VDR-IP deneyleri gösterilmektedir. Gruplar sağdan sola sırasıyla; Kontrol grubunu, Etanol uygulaması yapılan grubu, Vitamin D uygulaması yapılan grubu, Bead (negatif kontrol) IgG(negatif kontrol) ve total protein grubunu göstermektedir. A.VDR-Ip sonrası örneklerde DLK proteini tespit edilmiştir. B. VDR antikoru ile çöktürme sonrası, çökelmenin doğruluğunu göstermek üzere VDR antikoru ile işaretlenmiş membran. Kontrol, etanol, vitamin D ve total protein örneklerinde VDR antikoru ile çöktürme sonrasında VDR proteinleri tespit edilmiştir. C.VDR-Ip sonrası örneklerde fosforile DCX (pDCX) proteini tespit edilmemiştir. D.VDR-Ip sonrası örneklerde DCX proteini tespit edilmemiştir. E.VDR-Ip sonrası örneklerde STMN2 proteini tespit edilmiştir.

4.6.2. Uygulamalardan 12 saat sonra gerçekleştirilen VDR-IP deneyinin sonuçları



Şekil 4-42. Vitamin D ve etanol uygulamalarından 12 saat sonra gerçekleştirilen VDR Co-IP Deneyleri.

Kültürün 2. gününde vitamin D ve etanol uygulamalarından 12 saat sonra gerçekleştirilen VDR-IP deneyleri gösterilmektedir. Gruplar sağdan sola sırasıyla; Kontrol grubunu, Etanol uygulaması yapılan grubu, Vitamin D uygulaması yapılan grubu, IgG (negatif kontrol), Bead (negatif kontrol) ve total protein grubunu göstermektedir. A.VDR-Ip sonrası örneklerde DLK proteini tespit edilmiştir. B. VDR antikoru ile çöktürme sonrası, çökelmenin doğruluğunu göstermek üzere VDR antikoru ile işaretlenmiş membran. Kontrol, etanol, vitamin D ve total protein örneklerinde VDR antikoru ile çöktürme sonrasında VDR proteinleri tespit edilmiştir. C.VDR-Ip sonrası örneklerde STMN2 proteini tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Merkezi sinir sisteminde akson rejenerasyonunun kontrolü nörobiyolojide çözülmemiş bir sorun olarak kalmıştır. Primer nöron kültürü, nöronal polarizasyon, nörit büyümesi, akson rehberliği (yol bulma), sinaptogenez ve nöronal ağ oluşumu gibi MSS gelişiminin yanı sıra nöronal olgunlaşma ve fonksiyonel aktiviteyi incelemek için altın standart olarak kabul edilmektedir [321, 322]. Çalışmamızda primer nöron kültüründe nöronların olgunlaşma sürecini temsil eden kültürün 1. ile 7. günleri arasında vitamin D'nin nöronal gelişim üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Buna karşılık, vitamin D'nin rejeneratif süreçler üzerindeki etkisi ise, 7. günden itibaren olgun nöron fenotipi kazanan ve yetişkin nöronlarla benzer özellikler sergileyen hücreler üzerinde incelenmiştir.

Bu doğrultuda elde ettiğimiz sonuçlar; nöronal gelişim sürecinde uygulanan vitamin D'nin nörit uzunluğunu,nörit uzama hızını ve dinamik mikrotübül yoğunluğunu artırdığını; DLK-MAPK sinyal yolağında görev alan DLK proteininin seviyesini yükselttiğini, buna karşılık DCX ve fosforile DCX (pDCX) protein seviyelerini ise azalttığını gösterdik. Bununla birlikte nöronal gelişim, aksonal yol bulma ve sinaptik plastisite gibi süreçlerde işlev gördüğü bilinen GAP43, STMN2 ve 14-3-3 zeta/delta protein seviyelerinde de vitamin D uygulamasına bağlı bir artış gözlemledik. Ayrıca, vitamin D uygulamasını takiben vitamin D reseptörü (VDR) ile DLK ve STMN2 proteinlerinin bir arada bulunabileceğini gösterdik. Aksonal hasar sonrasında uygulanan rejenerasyon modellerinde ise, vitamin D'nin, rejeneratif süreçler ile ilişkili GAP43 ve STMN2 proteinlerinin ekspresyon düzeylerini arttırdığını belirledik. Bulgularımız, vitamin D'nin yalnızca gelişimsel süreçlerde değil, aynı zamanda rejeneratif yanıtların düzenlenmesinde de etkin bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Vitamin D, çok sayıda hücre tipinde güçlü bir mitoz inhibitörü ve farklılaşmanın destekleyicisidir. Uzun yıllardır esas fonksiyonunun kalsiyum ve fosfat dengesini düzenlemek ve kemik yapısını korumak olduğu düşünülen vitamin D'nin, beyinde de önemli rollerinin olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bir kolesterol omurgası taşıyan ve tüm vücutta steroid benzeri etkileri olan vitamin D'nin biyolojik olarak aktif formu, 1,25 dihidroksi vitamin D3 veya 1,25-dihidroksikolekalsiferoldür. Bu hormon etkilerini farklı hücre tiplerinde ve farklı gelişim aşamalarında nükleer hormon reseptör süper ailesi üyesi vitamin D reseptörü (VDR)

aracılığıyla göstermektedir. VDR genellikle retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturarak gen transkripsiyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev gösterir [3]. RXR'den bağımsız olarak, VDR'nin hücre içi sinyal yolaklarını da uyardığı ileriye sürülmektedir [4]. Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda kortikal nöronlarda vitamin D'nin, Aβ1−42 ile indüklenen ve kalsiyum artışı ile NGF üretimini hedef alan toksisiteyi ortadan kaldırmada etkili olduğu; aynı zamanda Aβ1−42'nin VDR ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı ve vitamin D katabolizmasını hızlandıran enzim olan 25-hidroksivitamin D3 24-hidroksilaz (24OHaz)'ı indüklediği, VDR susturulmasının ise Aβ 1−42 üretimini arttırarak nörodejenerasyona yol açabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, AH'nin patolojik özelliklerinden birinin VDR ve vitamin D metabolizmasına doğrudan etkisini gösteren ilk çalışmalardır [5, 6, 312]. Daha önce yürüttüğümüz başka çalışmalarda da vitamin D eksikliğinin yaşlı bireylerde ajitasyon, saldırganlık ve disinhibisyon alt puanlarının artışıyla ilişkili olduğu, ayrıca bilişsel gerileme ve demans riskini artırarak klinik tabloyu olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir [7-9]. Ayrıca, vitamin D eksikliğinin ApoEε4 alelini taşımayan Alzheimer hastalarında, ε4 taşıyıcılarına kıyasla daha yüksek riskle ilişkili olduğu da araştırma grubumuz tarafından ortaya konmuştur [313]. 1,25-dihidroksivitamin D3 ve reseptörlerinin, nöronlardaki amiloid işlenme yolaklarının önemli bileşenleri olduğu, vitamin D reseptörünün (VDR) nöronal plazma membranına lokalize olduğu ve APP işlenme sürecini düzenleyebileceği öne sürülmüştür [10, 11]. Ayrıca, VDR'nin mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) bağlanabildiği, mtDNA transkripsiyonunu düzenleyebildiği ve transkripsiyon faktörü A mitokondriyal (TFAM) ile etkileşime girdiği gösterilmiş; bu işlevlerin insan beyninde de gerçekleştiği ilk kez ortaya konmuştur [12]. Vitamin D ve reseptörlerinin Alzheimer hastalığı ve merkezi sinir sistemi (MSS) üzerindeki rolleri, Gezen-Ak ve Dursun (2023) tarafından kapsamlı şekilde özetlenmiştir [13].

Literatürde vitamin D'nin MSS'de akson rejenerasyonu üzerine etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Uygun nörotrofik faktörler ile akson ve nöronların uyarılması yoluyla MSS aksonlarının rejenerasyonunun bir dereceye kadar teşvik edilebildiği gösterilmiştir [335, 336]. Yapılan bir sinir travması hayvan modelinde; vitamin D2 'nin aksogenezi, akson çapını ve fizyolojik olgunlaşmayı artıran güçlü bir nöromodülatör bileşik olduğu gösterilmektedir. Ek olarak, bu molekül Wallerian dejenerasyonunu, yani distal kısmın dejenerasyonunu sınırlayarak koruyucu bir rol oynayabilmektedir. Vitamin D'nin nörotrofinlerin ekspresyonunu uyardığı ve hipokampal kültür hücrelerine eklendiğinde nörit büyümesini arttırdığı; aksine hamile sıçanların diyetinden vitamin D çıkarıldığında, yeni

doğanların ve yetişkinlerin beyinlerinde NGF (Sinir Büyüme Faktörü) ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Son zamanlarda, vitamin D' nin sıçan kortikal nöronlarında mikrotübül ile ilişkili protein-2 (MAP2), aksonal büyüme ile ilişkili protein-43 (GAP43) ve sinapsin-1 ekspresyonunu arttırdığı ; buna paralel olarak, bir sıçan modelinde maternal hipovitaminoz D'nin hücre iskeleti onarımında (nörofilament, tubulin, aktin), organellerin taşınmasında (kinesin, RhoA, dynactin) ve sinaptik plastisitede (drebrin, konneksin 43) yer alan transkriptlerin ve proteinlerin ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir [14]. Vitamin D uygulamasından sonra aksogenezde gözlenen artışın, akson çapındaki artışla paralel olduğu ve vitamin D'nin miyelinasyon ile ilişkili birkaç genin aktivasyonu yolu ile miyelinasyon üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, vitamin D uygulamasına bağlı olarak yeni oluşan aksonların miyelinli olması da olasıdır. Başka bir sinir travması hayvan modeli çalışmasında yüksek dozda verilen kolekalsiferolün, proksimal uçta korunan veya yeni oluşan aksonların sayısını, distal uçtaki akson çapını ve hem distal hem de proksimal uçlarda nörit miyelinasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [314]. Birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirdiğimiz 3 ayrı deneyden elde ettiğimiz bulgular, nöronal gelişim sürecinde uygulanan vitamin D'nin, nörit uzunluğu ve nörit uzama hızında belirgin artışlara yol açtığını ve bu etkinin özellikle uygulamayı takip eden ilk 30 dakika ile 12 saat içerisinde ortaya çıktığını göstermektedir. Bu sonuçlar, vitamin D'nin nöron gelişiminin erken evrelerinde nöronal farklılaşma ve hücre iskeletinin yeniden yapılanma süreçlerinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

Nöronlar, akson ve dendritlerinin morfolojik organizasyonunu şekillendirmek üzere mikrotübül (MT) dizilerini yapısal iskelet elemanları olarak kullanırlar. Bu nedenle mikrotübüller, nöronal polaritenin oluşmasında ve korunmasında temel bir rol oynar. Nöronal gelişimin erken evrelerinde, tübülinin post-translasyonel modifikasyonları (PTM'ler), simetrinin bozulması ve hücresel polaritenin kurulmasında belirleyici bir basamak olan akson oluşumunun başlatılmasında önemli işlevler üstlenmektedir [101] . Yapılan bir çalışmada tirozinlenmiş mikrotübüllerin hücre gövdesinde bol miktarda bulunduğu gösterilmiştir [101]. Yeni oluşan tirozinlenmiş mikrotübüller, tipik olarak daha stabil olan detirozinlenmiş mikrotübüllerin aksine oldukça dinamiktir [337-339]. Beyinde, gelişim süreci boyunca tirozinasyon/detirozinasyon döngüsünde meydana gelen belirgin değişikliklerin, tirozinli, detirozinli ve Δ2 tübülin izoformlarının göreceli seviyelerini değiştirerek farelerde ciddi nörogelişimsel fenotiplere yol açtığı gösterilmektedir [118, 340]. Mevcut literatürde, vitamin D ile tirozinlenmiş tübülin arasındaki ilişkiyi doğrudan inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, vitamin D uygulamasını takiben 30. dakikadan itibaren başlayarak 48. saate kadar tirozinlenmiş tübülin ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, vitamin D'nin mikrotübül dinamiklerini post-translasyonel düzeyde etkileyebileceğine işaret etmekte ve bu yönüyle literatüre özgün bir katkı sunmaktadır. Bu veriler, vitamin D'nin nöronal mikrotübül organizasyonu üzerinde düzenleyici bir rol oynayabileceğini ve nöronal polaritenin moleküler temellerine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

İkili lösin fermuar kinaz (DLK) sinyal yolağı, farklı model organizmalarda akson büyümesi ve nöronal göçten apoptoz ve akson dejenerasyonuna kadar değişen nöral gelişimin çeşitli yönlerini düzenlemektedir. Bu nedenle, gelişim sırasında ve akson hasarı sonrasında çelişkili cevaplar başlatan bir ana sensör görevi görebilmektedir. Moleküler düzeyde gerçekleştirilen, son araştırmalar, akson rejenerasyonunun düzenlenmesinde ve büyüme konisinin oluşmasında DLK- Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağının, korunmuş bir sinyal yolağı olduğunu göstermektedir. DLK hem JNK'leri hem de p38α - δ MAPK yollarını aktive eden bir MAP3K olarak işlev görmektedir. MAPK yolları, üç ardışık modüler kademede düzenlenmiştir: MAP3K, MAP2K ve MAPK. Bu tür modüler yapı, sayısız uyarana yanıt olarak DLK aracılı sinyallemenin çeşitli hücre dışı ve hücre içi uyarılara karşı hassas şekilde düzenlenmesine olanak tanır. MAP3K ailesine ait olan DLK (MAP3K12), memelilerde MAP2K üyeleri MKK7 ve MKK4'ü fosforile ederek aktive eder; bu da sırasıyla stresle aktive olan kinazlar JNK (c-Jun N-terminal kinaz) ve p38'in aktivasyonunu tetiklemektedir. Bu doğrultuda DLK, MAPK sinyal iletim yolağının başlatıcı kinazı olarak işlev göstermektedir [235]. DLK, in vitro olarak JNK aktivitesini indüklemektedir. Memelilerde, aktif JNK, nükleer substratlar (transkripsiyon faktörleri ve hormon reseptörleri), apoptoz (Bcl2 aile üyeleri Bax ve Bad), sinyal iletimi (JIP1, Shc) ve hücre hareketi (DCX, MAP1B ve MAP2B, tau, SCG10, kinezin, paxillin) gibi hedef proteinleri fosforillemektedir [22]. Hücre iskeleti bileşenleri, büyüyen aksonlar için yapısal destek sağlamaktadır. Aktinin sürekli yeniden modellenmesi, mikrotübül stabilitesindeki değişikliklerle birlikte, nöronal polarizasyonu etkilemektedir [246, 247]. SCG10, MAP2, tau, MAP1B, CLIP'ler ve DCX dahil olmak üzere çeşitli mikrotübül düzenleyicileri hem in vitroda hem de in vivoda akson oluşumunu etkiler. Bu mikrotübül modülatörlerinin susturulması ise in vitroda çok kutuplu fare kortikal nöronlarının birikmesine neden olmaktadır. JNK'lerin, DCX (doublecortin) ve MAP2'yi fosforile ettiği ve bu fosforilasyonun aksonun büyümesinde ve mikrotübüllere bağlanabilmesinde gerekli olduğu görülmektedir [19].

DLK proteini, aksonlarda lokalizedir ve gelişmekte olan memeli sinir sisteminde beyin, omurilik ve duyu gangliyonları gibi çeşitli anatomik bölgelerde eksprese edilmektedir [238, 239]. DLK proteini aynı zamanda büyüme konisinde de bulunmakta ve nukleustaki stres yolaklarını aktive etmek için retrograde olarak taşınabilmektedir [237, 240]. DLK null farelerde nöronal göç kusurları ve ön komissür ve korpus kallozum dahil olmak üzere birçok aksonal yolun hipoplazisi görülmektedir [238]. Çoğu DLK mutant fare ise perinatal dönemde ölmektedir. DLK proteini aynı zamanda büyüme konisinde de bulunmaktadır. Bu nedenle, nukleustaki stres yolaklarını aktive etmek için DLK retrograde olarak taşınabilmektedir [235]. DLK sinyali ile vitamin D ilişkisini araştıran sınırlı sayıda çalışmada çelişkili bulgular yer almaktadır. Bu sonuçlar, vitamin D ve MAPK yolağı arasındaki karşılıklı etkileşimin doğasının hücre tipine, belirli bir koşula ve hasara özgü olduğunu göstermektedir. Yapılan bir transkriptom çalışmasında vitamin D eksikliği olan 100 kadına 3 ay süre ile haftalık oral doz olarak 50.000 IU vitamin D3 verilmiş ve kanda PCR-Temelli Transcriptomic Fingerprint Assay (TFA) yapılmış bunun sonucunda da MAPK yolağında ve JNK/p38 kaskadında yer alan MAP3K12'nin azaldığı görülmüştür [341]. Yapılan başka bir çalışmada primer sıçan kortikal nöron kültüründe vitamin D'nin endotoksin kaynaklı inflamatuvar mediyatör protein üretimini MAPK yolağı aktivasyonunu inhibe ederek azalttığı gösterilmiştir [20]. 16 günlük embriyonik hipokampal progenitör hücre hattında (HIB5) yapılan bir çalışmada ise vitamin D uygulaması p42/p44 MAPK seviyelerinin artmasına neden olurken JNK aktivasyonunda anlamlı bir fark göstermemiştir [21]. Elde ettiğimiz bulgular vitamin D uygulamasına bağlı olarak uygulamanın 24, 48, 96 ve 120. saatinde DLK seviyesinin arttığını gösterirken; uygulamanın 72. ve 144. saatinde ise DLK protein seviyesinin azaldığını göstermektedir. Vitamin D uygulamasından 30 dakika sonra gerçekleştirdiğimiz VDR-IP deneyleri sonucunda ise VDR ile DLK proteinin bir arada bulunabileceğini gösterdik. Bu sonuçlar vitamin D uygulaması sonrasında gözlenen zamana bağımlı değişimlerin, bu sinyal yolağının oldukça dinamik bir düzenlemeye tabi olabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle 72. saat sonrasında uygulanan ikinci bir vitamin D dozu ile birlikte DLK seviyelerinde tekrar gözlenen artışın ise hücrelerin bu uygulamaya yeniden yanıt verdiğini ve sinyal yolağını yeniden aktive edebildiğini düşündürmektedir.

Lissensefaliye yol açabilen mutasyonlardan biri, X'e bağlı doublecortin (DCX) geninde meydana gelen mutasyonlardır [342, 343]. DCX, 40 kDa ağırlığında göç eden ya da farklılaşmakta olan nöronlarda eksprese edilen mikrotübül ile ilişkili bir proteindir [344, 345]. DCX proteini, N-terminalinde yer alan 30 kDa'lık mikrotübül bağlama bölgesi ve iki adet

homolog 11 kDa'lık DC (doublecortin) domaini içeren iki işlevsel bölgeden oluşmaktadır [259, 346]. Lissensefaliye neden olan mutasyonların DC tekrar bölgelerinde yoğunlaşması, bu bölgelerin DCX'in nöronal işlevi açısından kritik olduğunu göstermektedir [259, 346]. Bu mutasyonlar insanlarda çift korteks sendromuna neden olmaktadır [343]. DCX, post-mitotik olgunlaşmamış nöronlar için bir belirteç olarak kullanılmaktadır ve yalnızca yeni farklılaşmış nöronlarda eksprese edilmektedir. DCX gelişim sırasında nöronal göç ve akson büyümesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Aksonda yer alan DCX ailesi üyeleri; nöronal hayatta kalma, büyüme konisi oluşumu ve aksonal uzama üzerindeki çeşitli fonksiyonları ile, nöronal hasar yanıtlarının kritik düzenleyicileri olarak görülebilir. Hasar görmüş olgun nöronlardaki işlevleri henüz karakterize edilmemiştir. DCX'ler büyüme konisi oluşumu ve belki de uzama için gerekli olan hücre iskeleti yeniden düzenlemelerinin koordine edilmesinde hem mikrotübül hem de aktin üzerinde ikili rol almaktadırlar [347]. Doublecortin, mikrotübülün protofilamentleri arasındaki oluğa bağlanarak depolimerizasyona karşı mikrotübülü stabilize etmek için ideal bir konumda yer alsa da, mevcut veriler doublecortin'in asıl rollerinin mikrotübül sertliğini düzenleyerek büyüme konisinin yönlendirilmesini sağlamak [134], mikrotübülün protofilament sayısını 13 ile sınırlamak [135] ve mikrotübüllerin aktin iskeleti ile entegrasyonunu düzenleyerek aksonal dallanma gibi olayları kontrol etmek olduğunu göstermektedir [136].

Protein fosforilasyonuna bağlı olarak hücre iskeletinde meydana gelen değişiklikler, akson kimliğinin kazanımı için gereklidir; dolayısıyla akson oluşumu, hücre iskelet proteinlerinin farklı fosforilasyon durumlarını tanıyan belirteçler aracılığıyla değerlendirilebilmektedir [348, 349]. Aksonlardaki stabil mikrotübüller, organizasyon biçimlerine bağlı olarak aksonlara özgü yapısal ve fonksiyonel özellikler kazandırmaktadır [111, 350]. Tau ve DCX gibi mikrotübül ile ilişkili proteinlerin kinazlar tarafından fosforilasyon durumları değiştirilerek aksonogenez tetiklenebilmektedir [351-353]. DCX'in C-terminal bölgesi, JNK fosforilasyon bölgelerine uyan çok sayıda Serin/Treonin-Prolin (S/T-P) amino asidini içermektedir. DCX'in T331, T321 ve S334 bölgelerinin JNK tarafından fosforile edildiği gösterilmiştir [354]. Yapılan bir çalışmada JNK tarafından fosforile edilen DCX'in, nörit uzamasını ve nöronal hareketliliği etkilediği gösterilmiştir [256]. Literatürde vitamin D ve DCX arasındaki ilişkiyi inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. 5xFAD model farelerde yapılan bir çalışmada vitamin D uygulaması sonrasında hipokampal bölgede DCX pozitif hücre sayısında anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir. Bu artış, progenitör hücre proliferasyonunun ve yeni nöronal oluşumun

teşvik edildiğini göstermektedir. Vitamin D uygulaması yapılan hayvan çalışmalarına paralel olarak murin nöral progenitör hücrelerinin primer kültürlerinde de vitamin D uygulaması sonrasında DCX eksprese eden hücrelerin sayısının arttığı gösterilmiştir [24]. Birbirinden bağımsız olarak gerçekleştirdiğimiz üç ayrı deneyden elde ettiğimiz veriler; vitamin D uygulamasının yalnızca 24. saatinde DCX ve fosforile DCX (pDCX) protein ekspresyon seviyelerinin arttığını, 72., 96. ve 120. saatlerde ise DCX ve pDCX seviyelerinin azaldığını göstermektedir. Vitamin D uygulamasından 30 dakika sonra gerçekleştirdiğimiz VDR-IP deneyleri sonucunda ise VDR ile DCX ve pDCX proteinlerinin bir arada bulunmadığını saptadık. Bu sonuçlar, literatür ile uyumlu olarak vitamin D uygulamasının DCX ve pDCX ekspresyonunu erken evrede arttırarak nöronal farklılaşmayı desteklediğini; ancak zamanla olgunlaşma süreçleri ile uyumlu olarak bu etkinin azaldığını ve daha karmaşık düzenleyici mekanizmaların devreye girdiğini düşündürmektedir.

Stathmin benzeri bir aile üyesi olan SCG10, nöronların büyüme konilerinde zenginleştirilmiş nöronal büyüme ile ilişkili mikrotübül destabilizasyonundan sorumlu bir proteindir. JNK tarafından fosforillenmesi ile mikrotübül destabilizasyon aktivitesi azaltılır ve nöronların strese maruz kalmasını takiben büyüme konisi mikrotübül oluşumunun kontrolü için bir araç sağlar. Aynı zamanda fizyolojik koşullar altında JNK1 tarafından SCG10 fosforilasyonunun nöronal mikrotübül stabilitesini ve verimli nörit uzamasını sürdürmek için kritik olduğu öne sürülmektedir [19]. SCG10 aynı zamanda gelişmekte olan ve rejenerasyon sürecindeki aksonlarda yüksek düzeyde eksprese edilen büyüme ile ilişkili nöronal protein olarak bilinmektedir [255]. Literatürde vitamin D ve STMN2 ilişkisini araştıran bir çalışma bulunmamakla birlikte bizim bulgularımız vitamin D uygulamasından 30 dakika sonra gerçekleştirdiğimiz VDR-IP deneyleri sonucunda VDR ile STMN2 proteininin bir arada bulunabileceğini göstermektedir. Nöral gelişimin erken evrelerinde elde ettiğimiz veriler vitamin D uygulamasının 24. ve 48. saatinde STMN2 protein seviyesinin arttığını gösterirken uygulamanın 72. saatinde ise bu proteinin seviyesinin azaldığını göstermektedir. Benzer şekilde, olgun nöronlarda oluşturulan akson hasarı sonrasında gerçekleştirilen rejenerasyon deneylerinde de vitamin D uygulamasını takiben STMN2 ekspresyonunda 24. ve 48. saatlerde artış gözlenirken, 72. saatte bu seviyede azalma saptanmıştır. Bu zamana bağlı dalgalanmalar, vitamin D'nin nöron gelişimi ve rejenerasyon sürecinde önemli rolleri olan mikrotübül dinamiğini erken dönemde desteklediğini, ancak etkinin zamanla sınırlanabileceğini göstermektedir.

JNK'ler aynı zamanda 14-3-3 proteinlerini de fosforillemektedir [22]. 14-3-3 protein ailesi, memelilerde, her biri bir Yunan harfi ile (β, γ, ε, ζ, η, τ ve σ) gösterilen yedi ayrı gen tarafından kodlanan yedi izoformdan oluşmaktadır. Bu proteinler MSS'de yüksek seviyede ifade edilmektedir [355]. 14-3-3 ismini bu proteinlerin DEAE (Dietilaminoetil)-selüloz kromatografisi ve jel elektroforezinde kendine özgü elüsyon ve hareket paternlerinden almıştır. 14-3-3 proteinleri, sığır beyni homojenatının DEAE-selüloz üzerindeki 14. fraksiyonunda elüe olurken, jelde 3.3 pozisyonunda yer almaktadır [356, 357]. 14-3-3 proteinleri, dimer halinde yaklaşık 35 Å çapında ve 20 Å derinliğinde, negatif yüklü merkezi kanala sahip bir yapı oluşturmaktadır. Bu yapı içinde iki adet ligand bağlanma oluğu bulunmaktadır [358]. 200'den fazla bağlanma partneri bulunmakla birlikte; hücre döngüsünün düzenlenmesi, sinyal iletimi, protein trafiği, apoptoz, sinaptik fonksiyon, nörogelişim ve akson rehberliğinin düzenlenmesi, öğrenme ve hafıza gibi birçok nöral süreçte rol almaktadır [263, 359, 360]. 14-3-3 proteinleri, çok sayıda farklı hedef proteine bağlanabilmelerinin yanı sıra bu hedeflere bağlandıktan sonra çeşitli işlevleri de kolaylaştırabilmektedir [361]. Fosforilasyon, proteinlerin en yaygın post-translasyonel modifikasyonlarından biridir ve proteinlerin aktivitesi, lokalizasyonu ve diğer işlevleri üzerinde çok çeşitli etkiler yaratmaktadır. 14-3-3 proteinleri de bağlandıkları hedef proteinlerin fosforile bölgelerini fiziksel olarak örter ve fosfatazların bu bölgeleri tanımasını engelleyerek hedef proteinlerin defosforilasyonu önlemektedir [263, 362]. 14-3-3 proteinlerinin protein-protein veya protein-DNA etkileşim bölgelerini maskeleyebildiği ve bağlandıkları proteinlerin hücre içindeki lokalizasyonlarını da değiştirebildikleri bilinmektedir [363-366]. 14-3-3ζ izoformu, insanlarda 8. kromozom üzerinde yer alan YWHAZ geni tarafından kodlanmaktadır [367]. 14-3-3ε (14-3-3 epsilon) ve 14-3-3ζ (14-3-3zeta) izoformlarının; şizofreni, Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi çeşitli nörolojik bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir [368-370]. Yapılan son çalışmalarda, in vitro ve in vivo teknikler kullanılarak farelerde yürütülen deneyler sonucunda, 14-3-3ε ve 14-3-3ζ izoformlarının, kortikal gelişim sırasında nörogenezin düzenlenmesinde temel bir rol oynadığı gösterilmiştir. 14-3-3ε ve 14-3-3ζ tekil knockout (KO) ve çift knockout (dKO) farelerinin kullanıldığı çalışmada, bu izoformların radial glia hücreleri (RGC) ve intermediyer progenitör hücrelerin (IPCs) bölünme süreçlerinin düzenlenmesindeki rollerine dair önemli bulgular elde edilmiştir [371]. Grubumuzun yapmış olduğu bir ön çalışmada Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre (LC/MS) sonuçlarına göre insan beyni kökenli Lund Human Mesencephalic (LUHMES) hücrelerinde VDR'nin 14-3-3 izoformları ile bir arada bulunduğu gösterilmiştir. Literatürde kortikal nöronlarda vitamin D ve 14-3-3 zeta/delta ilişkisini gösteren

bir çalışma bulunmamaktadır. 14-3-3 izoformları β (beta), γ (gama) veya ζ'nin knockdown edildiği bir çalışmada hasar sonrasında akson rejenerasyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [23]. Yapılan bir diğer çalışmada ise VDR- knockout bir farenin ince bağırsağında yabanıl tip farelere kıyasla 14-3-3ζ/δ (14-3-3 zeta/delta) ekspresyonun azaldığı gösterilmiştir [372]. Elde ettiğimiz veriler nöral gelişimin erken evrelerinde vitamin D uygulamasının 24. ve 48. saatinde 14-3-3 zeta/delta protein seviyesinin arttığını gösterirken uygulamanın 72. saatinde ise protein seviyesinin azaldığını göstermektedir. Bu sonuçlar, vitamin D'nin 14-3-3ζ/δ izoformlarının ekspresyonunu nöronal gelişimin erken evrelerinde geçici olarak artırarak nörogenezi destekleyebileceğini, ancak ilerleyen evrelerde bu etkinin azalarak dinamik ve aşamalı bir düzenleyici mekanizmanın devreye girdiğini göstermektedir.

Nöronal büyüme ile ilişkili 43-kDa protein (GAP-43, diğer adıyla nöromodülin) insanda 238 amino asitten oluşan presinaptik bir proteindir ve presinaptik membranın sitoplazmik yüzeyinde lokalizedir [373]. Kültüre edilmiş hipokampal nöronlarda GAP-43, aksonal belirteç olan tau proteiniyle kolokalize olmaktadır [374]. GAP-43; aksonal uzama, nöroplastisite ve bellek oluşumu süreçlerinde görev almaktadır [375-378]. GAP43, aksonal membran proteini ve sinaptik disfonksiyonun bir biyobelirteci olarak, nöral büyüme, aksonal rejenerasyon ve sinaptik işlevlerin stabilizasyonu için kritik öneme sahiptir. GAP43 ekspresyonunun Alzheimer hastalarının beyin dokularında azaldığı bildirilmiştir [379]. Merkezi sinir sisteminde GAP-43 protein düzeyleri; serebellum, neokorteks, entorhinal korteks, hipokampus, olfaktör bulb ve retinal hücrelerde yüksektir [380]. Gelişimsel ve rejeneratif süreçlerde akson uzaması sıklıkla GAP-43 proteinin sentezinin artmasıyla birlikte görülmektedir. GAP-43, gelişmekte olan sıçan beyninde büyüme konisi membranlarının temel bileşenlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Toplam proteine oranla GAP-43, büyüme konisi membranlarında, erişkin beyinlerden elde edilen sinaptik membranlara göre yaklaşık 12 kat daha fazla bulunmaktadır [377]. GAP-43 gibi omurgalılara özgü substratlar aracılığıyla gerçekleşen JNK sinyallemesi, memelilerin büyüme konilerinde kritik roller üstlenmektedir [381]. Yapılan bir çalışmada vitamin D'nin sinir büyüme faktörü (NGF), glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) ve büyüme ile ilişkili protein 43 (GAP-43) gibi büyüme faktörlerini indükleyebileceği ve bu sayede sinapsların ve nöronların büyüme ve gelişimini destekleyebileceği gösterilmiştir [309, 315, 317]. Sıçan kortikal nöronlarında yapılan bir çalışmada da vitamin D'nin, GAP43 ve sinapsin-1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [14]. Literatür ile uyumlu olarak bulgularımız vitamin

D ve GAP43 arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir. Elde ettiğimiz veriler nöral gelişimin erken evrelerinde vitamin D uygulamasının 24. ve 48. saatinde GAP-43 protein seviyesinin arttığını gösterirken; uygulamanın 72. saatinde ise protein seviyesinin azaldığını göstermektedir. Benzer şekilde, olgun nöronlarda oluşturulan akson hasarı sonrasında gerçekleştirilen rejenerasyon deneylerinde de vitamin D uygulamasını takiben GAP-43 ekspresyonunda 24. ve 48. saatlerde artış gözlenirken, 72. saatte bu seviyede azalma saptanmıştır. Bu sonuçlar, vitamin D'nin GAP-43 aracılığı ile hem nöral gelişim hem de aksonal rejenerasyon ile ilgili süreçlerde aktif rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, kısa süreli vitamin D uygulamasının nöronal gelişim sürecinde nörit uzunluğunu ve uzama hızını artırdığını gösterdik. Bu bulgular, vitamin D'nin nöronlarda hızlı yanıt mekanizmalarını aktive edebileceğini ortaya koymaktadır.

Vitamin D uygulaması, kültürün 7. gününe kadar DLK-MAPK sinyal yolunun merkezi bileşenlerinden DLK protein seviyesini artırırken, bu yolun hedef proteinlerinden olan DCX ve fosforile DCX (pDCX) seviyelerinde bir azalma ile sonuçlanmıştır. Bu durum, vitamin D uygulamasına bağlı olarak sinyal yolunun zamana duyarlı ve dinamik biçimde düzenlendiğini göstermektedir.Ayrıca, nöronal gelişim, aksonal yol bulma ve sinaptik plastisite gibi süreçlerde önemli işlevleri bulunan GAP43, STMN2 ve 14-3-3ζ/δ protein düzeylerinde vitamin D uygulamasıyla birlikte anlamlı artışlar gözlenmiştir. Bu sonuçlar, vitamin D'nin erken dönemde mikrotübül dinamiklerini GAP-43 ve STMN2 aracılığıyla desteklediğini, ancak bu etkinin zamana bağlı olarak azaldığını göstermektedir. 14-3-3ζ/δ seviyelerindeki artış ise, vitamin D'nin nörogenezi destekleyici etkiler gösterebileceğini; ancak bu etkinin ilerleyen evrelerde azalarak aşamalı ve geri bildirimle düzenlenen bir mekanizma tarafından kontrol edildiğini düşündürmektedir.Ek olarak, vitamin D uygulamasını takiben VDR ile DLK ve STMN2 proteinlerinin birlikte bulunduğu gösterilmiştir. Aksonal hasar sonrası gerçekleştirilen rejenerasyon modellerinde ise vitamin D'nin, rejeneratif süreçlerle ilişkili GAP43 ve STMN2 protein ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir. Bu bulgular, vitamin D'nin yalnızca gelişimsel

süreçlerde değil, aynı zamanda rejeneratif yanıtların düzenlenmesinde de önemli roller üstlenebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, DLK-MAPK sinyal yolu ve ilişkili hedef proteinler, hem gelişimsel akson büyümesi ve nöronal göçte hem de hasar sonrası rejeneratif süreçlerde umut vadeden hedefler olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, DLK'nın apoptoz ve aksonal dejenerasyon gibi süreçlerle de ilişkili olması, bu yolun nörodejenerasyon ve kanser gibi farklı durumlar için farklı terapötik potansiyeller taşıyabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle, DLK'nın farklı hücresel stres türlerine yanıt olarak gösterdiği uzamsal ve zamansal aktivasyonunun altında yatan mekanizmaların daha ayrıntılı şekilde aydınlatılması, sinir sistemi hastalıklarında hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Fawcett, J.W., *The Struggle to Make CNS Axons Regenerate: Why Has It Been so Difficult?* Neurochem Res, 2020. **45**(1): p. 144-158.
2. Galjart, N., *Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends.* Curr Biol, 2010. **20**(12): p. R528-37.
3. Issa, L.L., G.M. Leong, and J.A. Eisman, *Molecular mechanism of vitamin D receptor action.* Inflamm Res, 1998. **47**(12): p. 451-75.
4. Franken, D., et al., *Assisted reproductive technologies may obviate apparent immunologic infertility.* Andrologia, 1991. **23**(4): p. 291-5.
5. Dursun, E., D. Gezen-Ak, and S. Yilmazer, *A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid-beta and preventing the amyloid-beta induced alterations by vitamin D in cortical neurons.* J Alzheimers Dis, 2011. **23**(2): p. 207-19.
6. Gezen-Ak, D., E. Dursun, and S. Yilmazer, *Vitamin D inquiry in hippocampal neurons: consequences of vitamin D-VDR pathway disruption on calcium channel and the vitamin D requirement.* Neurol Sci, 2013. **34**(8): p. 1453-8.
7. Gilbert, L., et al., *Vitamin D and behavioral disorders in older adults: results from the CLIP study.* J Nutr Health Aging, 2024. **28**(4): p. 100205.
8. Annweiler, C., et al., *Vitamin D and cognition in older adults: international consensus guidelines.* Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil, 2016. **14**(3): p. 265-73.
9. Annweiler, C., et al., *'Vitamin D and cognition in older adults': updated international recommendations.* J Intern Med, 2015. **277**(1): p. 45-57.
10. Gezen-Ak, D., et al., *Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1-42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3.* ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(10): p. 2335-2346.
11. Dursun, E. and D. Gezen-Ak, *Vitamin D receptor is present on the neuronal plasma membrane and is co-localized with amyloid precursor protein, ADAM10 or Nicastrin.* PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188605.
12. Gezen-Ak, D., et al., *Vitamin D receptor regulates transcription of mitochondrial DNA and directly interacts with mitochondrial DNA and TFAM.* J Nutr Biochem, 2023. **116**: p. 109322.
13. Gezen-Ak, D. and E. Dursun, *Vitamin D, a Secosteroid Hormone and Its Multifunctional Receptor, Vitamin D Receptor, in Alzheimer's Type Neurodegeneration.* J Alzheimers Dis, 2023. **95**(4): p. 1273-1299.
14. Chabas, J.F., et al., *Vitamin D2 potentiates axon regeneration.* J Neurotrauma, 2008. **25**(10): p. 1247-56.
15. Karras, S.N., et al., *Adiponectin and vitamin D-binding protein are independently associated at birth in both mothers and neonates.* Endocrine, 2018. **59**(1): p. 164-174.
16. Karras, S.N., et al., *Diverse Effects of Combinations of Maternal-Neonatal VDR Polymorphisms and 25-Hydroxyvitamin D Concentrations on Neonatal Birth Anthropometry: Functional Phenocopy Variability Dependence, Highlights the Need for Targeted Maternal 25-Hydroxyvitamin D Cut-Offs during Pregnancy.* Nutrients, 2021. **13**(2).

17. Karras, S.N., et al., *Investigating the Role of Functional Polymorphism of Maternal and Neonatal Vitamin D Binding Protein in the Context of 25-Hydroxyvitamin D Cutoffs as Determinants of Maternal-Neonatal Vitamin D Status Profiles in a Sunny Mediterranean Region.* Nutrients, 2021. **13**(9).
18. Karras, S.N., et al., *Upregulation of Irisin and Vitamin D-Binding Protein Concentrations by Increasing Maternal 25-Hydrovitamin D Concentrations in Combination with Specific Genotypes of Vitamin D-Binding Protein Polymorphisms.* Nutrients, 2021. **14**(1).
19. Hirai, S., et al., *Axon formation in neocortical neurons depends on stage-specific regulation of microtubule stability by the dual leucine zipper kinase-c-Jun N-terminal kinase pathway.* J Neurosci, 2011. **31**(17): p. 6468-80.
20. Huang, Y.N., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures.* J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 147.
21. Obradovic, D., et al., *Cross-talk of vitamin D and glucocorticoids in hippocampal cells.* J Neurochem, 2006. **96**(2): p. 500-9.
22. Bogoyevitch, M.A. and B. Kobe, *Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases.* Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(4): p. 1061-95.
23. Kaplan, A., et al., *Small-Molecule Stabilization of 14-3-3 Protein-Protein Interactions Stimulates Axon Regeneration.* Neuron, 2017. **93**(5): p. 1082-1093 e5.
24. Morello, M., et al., *Vitamin D Improves Neurogenesis and Cognition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.* Mol Neurobiol, 2018. **55**(8): p. 6463-6479.
25. Kneynsberg, A., et al., *Quantitative and semi-quantitative measurements of axonal degeneration in tissue and primary neuron cultures.* J Neurosci Methods, 2016. **266**: p. 32-41.
26. Baas, P.W., et al., *Stability properties of neuronal microtubules.* Cytoskeleton (Hoboken), 2016. **73**(9): p. 442-60.
27. Valiente, M. and O. Marin, *Neuronal migration mechanisms in development and disease.* Curr Opin Neurobiol, 2010. **20**(1): p. 68-78.
28. Barnes, A.P. and F. Polleux, *Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons.* Annu Rev Neurosci, 2009. **32**: p. 347-81.
29. Yogev, S. and K. Shen, *Establishing Neuronal Polarity with Environmental and Intrinsic Mechanisms.* Neuron, 2017. **96**(3): p. 638-650.
30. Namba, T., et al., *Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity.* Physiol Rev, 2015. **95**(3): p. 995-1024.
31. Bentley, M. and G. Banker, *The cellular mechanisms that maintain neuronal polarity.* Nature Reviews Neuroscience, 2016. **17**(10): p. 611-622.
32. Horton, A.C. and M.D. Ehlers, *Neuronal polarity and trafficking.* Neuron, 2003. **40**(2): p. 277-95.
33. Rodriguez-Boulan, E. and I.G. Macara, *Organization and execution of the epithelial polarity programme.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(4): p. 225-42.
34. St Johnston, D. and J. Ahringer, *Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity.* Cell, 2010. **141**(5): p. 757-74.
35. Hinds, J.W. and P.L. Hinds, *Early development of amacrine cells in the mouse retina: an electron microscopic, serial section analysis.* J Comp Neurol, 1978. **179**(2): p. 277-300.
36. Morgan, J.L., et al., *Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells.* Nat Neurosci, 2006. **9**(1): p. 85-92.

37. Zolessi, F.R., et al., *Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo.* Neural Dev, 2006. **1**: p. 2.
38. Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker, *The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture.* J Neurosci, 1988. **8**(4): p. 1454-68.
39. Goslin, K. and G. Banker, *Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture.* J Cell Biol, 1989. **108**(4): p. 1507-16.
40. Noctor, S.C., et al., *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases.* Nat Neurosci, 2004. **7**(2): p. 136-44.
41. Shoukimas, G.M. and J.W. Hinds, *The development of the cerebral cortex in the embryonic mouse: an electron microscopic serial section analysis.* J Comp Neurol, 1978. **179**(4): p. 795-830.
42. Yi, J.J., et al., *TGF-beta signaling specifies axons during brain development.* Cell, 2010. **142**(1): p. 144-57.
43. Cheng, P.L., et al., *Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(45): p. 18430-5.
44. Nakamuta, S., et al., *Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases.* Sci Signal, 2011. **4**(199): p. ra76.
45. Coles, C.H. and F. Bradke, *Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics.* Curr Biol, 2015. **25**(15): p. R677-91.
46. Lowery, L.A. and D. Van Vactor, *The trip of the tip: understanding the growth cone machinery.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 332-43.
47. Menon, S. and S.L. Gupton, *Building Blocks of Functioning Brain: Cytoskeletal Dynamics in Neuronal Development.* Int Rev Cell Mol Biol, 2016. **322**: p. 183-245.
48. Baas, P.W., M.M. Black, and G.A. Banker, *Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture.* J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 3085-94.
49. Baas, P.W., et al., *Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 8335-9.
50. Baas, P.W. and S. Lin, *Hooks and comets: The story of microtubule polarity orientation in the neuron.* Dev Neurobiol, 2011. **71**(6): p. 403-18.
51. Akhmanova, A. and M.O. Steinmetz, *Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(4): p. 309-22.
52. Nogales, E., S.G. Wolf, and K.H. Downing, *Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography.* Nature, 1998. **391**(6663): p. 199-203.
53. Mitchison, T.J., *Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules.* Science, 1993. **261**(5124): p. 1044-7.
54. Nogales, E., *Structural insights into microtubule function.* Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 277-302.
55. Nogales, E., et al., *High-resolution model of the microtubule.* Cell, 1999. **96**(1): p. 79-88.
56. Desai, A. and T.J. Mitchison, *Microtubule polymerization dynamics.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 83-117.
57. Mitchison, T. and M. Kirschner, *Dynamic instability of microtubule growth.* Nature, 1984. **312**(5991): p. 237-42.
58. Zwetsloot, A.J., G. Tut, and A. Straube, *Measuring microtubule dynamics.* Essays Biochem, 2018. **62**(6): p. 725-735.

59. Inoue, S. and E.D. Salmon, *Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements.* Mol Biol Cell, 1995. **6**(12): p. 1619-40.
60. Howard, J. and A.A. Hyman, *Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 569-74.
61. Ferreira, A. and A. Caceres, *The expression of acetylated microtubules during axonal and dendritic growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro.* Brain Res Dev Brain Res, 1989. **49**(2): p. 205-13.
62. Lim, S.S., P.J. Sammak, and G.G. Borisy, *Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells.* J Cell Biol, 1989. **109**(1): p. 253-63.
63. Cassimeris, L., N.K. Pryer, and E.D. Salmon, *Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells.* J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 1): p. 2223-31.
64. Salmon, E.D., *VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin.* Trends Cell Biol, 1995. **5**(4): p. 154-8.
65. Keith, C.H., J.R. Feramisco, and M. Shelanski, *Direct visualization of fluorescein-labeled microtubules in vitro and in microinjected fibroblasts.* J Cell Biol, 1981. **88**(1): p. 234-40.
66. Saxton, W.M., et al., *Tubulin dynamics in cultured mammalian cells.* J Cell Biol, 1984. **99**(6): p. 2175-86.
67. Lukinavicius, G., et al., *Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton.* Nat Methods, 2014. **11**(7): p. 731-3.
68. Perez, F., et al., *CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo.* Cell, 1999. **96**(4): p. 517-27.
69. Stepanova, T., et al., *Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein).* J Neurosci, 2003. **23**(7): p. 2655-64.
70. Kapitein, L.C., K.W. Yau, and C.C. Hoogenraad, *Microtubule dynamics in dendritic spines.* Methods Cell Biol, 2010. **97**: p. 111-32.
71. Srayko, M., et al., *Identification and characterization of factors required for microtubule growth and nucleation in the early C. elegans embryo.* Dev Cell, 2005. **9**(2): p. 223-36.
72. Efimov, A., et al., *Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network.* Dev Cell, 2007. **12**(6): p. 917-30.
73. Yamashita, N., et al., *Three-dimensional tracking of plus-tips by lattice light-sheet microscopy permits the quantification of microtubule growth trajectories within the mitotic apparatus.* J Biomed Opt, 2015. **20**(10): p. 101206.
74. Fees, C.P., C. Estrem, and J.K. Moore, *High-resolution Imaging and Analysis of Individual Astral Microtubule Dynamics in Budding Yeast.* J Vis Exp, 2017(122).
75. Serikbaeva, A., et al., *Analysis of Microtubule Dynamics Heterogeneity in Cell Culture.* Methods Mol Biol, 2018. **1745**: p. 181-204.
76. Drummond, D.R. and R.A. Cross, *Dynamics of interphase microtubules in Schizosaccharomyces pombe.* Curr Biol, 2000. **10**(13): p. 766-75.
77. Baas, P.W. and M.M. Black, *Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability.* J Cell Biol, 1990. **111**(2): p. 495-509.
78. Stone, M.C., F. Roegiers, and M.M. Rolls, *Microtubules have opposite orientation in axons and dendrites of Drosophila neurons.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4122-9.
79. Yan, J., et al., *Kinesin-1 regulates dendrite microtubule polarity in Caenorhabditis elegans.* Elife, 2013. **2**: p. e00133.

80. Ahmad, F.J. and P.W. Baas, *Microtubules released from the neuronal centrosome are transported into the axon.* J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 8)**: p. 2761-9.
81. Ahmad, F.J., et al., *Inhibition of microtubule nucleation at the neuronal centrosome compromises axon growth.* Neuron, 1994. **12**(2): p. 271-80.
82. Ahmad, F.J., et al., *An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron.* J Cell Biol, 1999. **145**(2): p. 305-15.
83. Yu, W., et al., *Microtubule nucleation and release from the neuronal centrosome.* J Cell Biol, 1993. **122**(2): p. 349-59.
84. Ahmad, F.J., et al., *Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon.* J Cell Biol, 1998. **140**(2): p. 391-401.
85. Baas, P.W. and F.J. Ahmad, *The transport properties of axonal microtubules establish their polarity orientation.* J Cell Biol, 1993. **120**(6): p. 1427-37.
86. Lin, S., et al., *Mitotic motors coregulate microtubule patterns in axons and dendrites.* J Neurosci, 2012. **32**(40): p. 14033-49.
87. Sharp, D.J., et al., *Expression of a minus-end-directed motor protein induces Sf9 cells to form axon-like processes with uniform microtubule polarity orientation.* J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 19)**: p. 2373-80.
88. Yu, W., et al., *Inhibition of a mitotic motor compromises the formation of dendrite-like processes from neuroblastoma cells.* J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 659-68.
89. Stiess, M., et al., *Axon extension occurs independently of centrosomal microtubule nucleation.* Science, 2010. **327**(5966): p. 704-7.
90. Falnikar, A., S. Tole, and P.W. Baas, *Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration.* Mol Biol Cell, 2011. **22**(9): p. 1561-74.
91. Kuijpers, M. and C.C. Hoogenraad, *Centrosomes, microtubules and neuronal development.* Mol Cell Neurosci, 2011. **48**(4): p. 349-58.
92. Nguyen, M.M., et al., *Gamma-tubulin controls neuronal microtubule polarity independently of Golgi outposts.* Mol Biol Cell, 2014. **25**(13): p. 2039-50.
93. Ori-McKenney, K.M., L.Y. Jan, and Y.N. Jan, *Golgi outposts shape dendrite morphology by functioning as sites of acentrosomal microtubule nucleation in neurons.* Neuron, 2012. **76**(5): p. 921-30.
94. Yau, K.W., et al., *Microtubule minus-end binding protein CAMSAP2 controls axon specification and dendrite development.* Neuron, 2014. **82**(5): p. 1058-73.
95. Bray, D. and M.B. Bunge, *Serial analysis of microtubules in cultured rat sensory axons.* J Neurocytol, 1981. **10**(4): p. 589-605.
96. Letourneau, P.C., *Analysis of microtubule number and length in cytoskeletons of cultured chick sensory neurons.* J Neurosci, 1982. **2**(6): p. 806-14.
97. Tsukita, S., et al., *The cytoskeleton in myelinated axons: a freeze-etch replica study.* Neuroscience, 1982. **7**(9): p. 2135-47.
98. Yu, W. and P.W. Baas, *Changes in microtubule number and length during axon differentiation.* J Neurosci, 1994. **14**(5 Pt 1): p. 2818-29.
99. Dent, E.W. and P.W. Baas, *Microtubules in neurons as information carriers.* J Neurochem, 2014. **129**(2): p. 235-9.
100. Gadadhar, S., et al., *The tubulin code at a glance.* J Cell Sci, 2017. **130**(8): p. 1347-1353.
101. Moutin, M.J., et al., *Tubulin post-translational modifications control neuronal development and functions.* Dev Neurobiol, 2021. **81**(3): p. 253-272.
102. Caron, J.M., et al., *Single site alpha-tubulin mutation affects astral microtubules and nuclear positioning during anaphase in Saccharomyces cerevisiae: possible role for palmitoylation of alpha-tubulin.* Mol Biol Cell, 2001. **12**(9): p. 2672-87.

103. Jaffrey, S.R., et al., *Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(2): p. 193-7.
104. Peters, J.D., et al., *Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates alpha-tubulin on tyrosine.* J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 4755-62.
105. Rosas-Acosta, G., et al., *A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers.* Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(1): p. 56-72.
106. Arce, C.A., et al., *Tentative identification of the amino acid that binds tyrosine as a single unit into a soluble brain protein.* FEBS Lett, 1975. **50**(1): p. 5-7.
107. Hallak, M.E., et al., *Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin.* FEBS Lett, 1977. **73**(2): p. 147-50.
108. Argarana, C.E., H.S. Barra, and R. Caputto, *Release of [14C]tyrosine from tubulinyl-[14C]tyrosine by brain extract. Separation of a carboxypeptidase from tubulin-tyrosine ligase.* Mol Cell Biochem, 1978. **19**(1): p. 17-21.
109. Arregui, C., et al., *Tyrosinated and detyrosinated microtubules in axonal processes of cerebellar macroneurons grown in culture.* J Neurosci Res, 1991. **28**(2): p. 171-81.
110. Mansfield, S.G. and P.R. Gordon-Weeks, *Dynamic post-translational modification of tubulin in rat cerebral cortical neurons extending neurites in culture: effects of taxol.* J Neurocytol, 1991. **20**(8): p. 654-66.
111. Witte, H., D. Neukirchen, and F. Bradke, *Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization.* J Cell Biol, 2008. **180**(3): p. 619-32.
112. Brown, A., et al., *Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules.* J Cell Sci, 1993. **104 (Pt 2)**: p. 339-52.
113. Bulinski, J.C. and G.G. Gundersen, *Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis.* Bioessays, 1991. **13**(6): p. 285-93.
114. Paturle-Lafanechere, L., et al., *Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies.* J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 6)**: p. 1529-43.
115. Ahmad, F.J., T.P. Pienkowski, and P.W. Baas, *Regional differences in microtubule dynamics in the axon.* J Neurosci, 1993. **13**(2): p. 856-66.
116. Aillaud, C., et al., *Evidence for new C-terminally truncated variants of alpha- and beta-tubulins.* Mol Biol Cell, 2016. **27**(4): p. 640-53.
117. Tas, R.P., et al., *Differentiation between Oppositely Oriented Microtubules Controls Polarized Neuronal Transport.* Neuron, 2017. **96**(6): p. 1264-1271 e5.
118. Erck, C., et al., *A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(22): p. 7853-8.
119. Erturk, A., et al., *Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration.* J Neurosci, 2007. **27**(34): p. 9169-80.
120. Hur, E.M., Saijilafu, and F.Q. Zhou, *Growing the growth cone: remodeling the cytoskeleton to promote axon regeneration.* Trends Neurosci, 2012. **35**(3): p. 164-74.
121. Song, W., et al., *Tubulin-tyrosine Ligase (TTL)-mediated Increase in Tyrosinated alpha-Tubulin in Injured Axons Is Required for Retrograde Injury Signaling and Axon Regeneration.* J Biol Chem, 2015. **290**(23): p. 14765-75.
122. Akhmanova, A. and C.C. Hoogenraad, *Microtubule minus-end-targeting proteins.* Curr Biol, 2015. **25**(4): p. R162-71.
123. Dehmelt, L. and S. Halpain, *The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins.* Genome Biol, 2005. **6**(1): p. 204.

124. Subramanian, R. and T.M. Kapoor, *Building complexity: insights into self-organized assembly of microtubule-based architectures.* Dev Cell, 2012. **23**(5): p. 874-85.
125. Kollman, J.M., et al., *Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(11): p. 709-21.
126. Roll-Mecak, A. and F.J. McNally, *Microtubule-severing enzymes.* Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(1): p. 96-103.
127. Sharp, D.J. and J.L. Ross, *Microtubule-severing enzymes at the cutting edge.* J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 11): p. 2561-9.
128. Hirokawa, N., S. Niwa, and Y. Tanaka, *Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease.* Neuron, 2010. **68**(4): p. 610-38.
129. Hammond, J.W., D. Cai, and K.J. Verhey, *Tubulin modifications and their cellular functions.* Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(1): p. 71-6.
130. Janke, C. and M. Kneussel, *Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton.* Trends Neurosci, 2010. **33**(8): p. 362-72.
131. Szolajska, E. and J. Chroboczek, *Faithful chaperones.* Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(20): p. 3307-22.
132. Mandelkow, E. and E.M. Mandelkow, *Microtubules and microtubule-associated proteins.* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(1): p. 72-81.
133. Tucker, R.P., *The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review.* Brain Res Brain Res Rev, 1990. **15**(2): p. 101-20.
134. Jean, D.C., P.W. Baas, and M.M. Black, *A novel role for doublecortin and doublecortin-like kinase in regulating growth cone microtubules.* Hum Mol Genet, 2012. **21**(26): p. 5511-27.
135. Bechstedt, S. and G.J. Brouhard, *Doublecortin recognizes the 13-protofilament microtubule cooperatively and tracks microtubule ends.* Dev Cell, 2012. **23**(1): p. 181-92.
136. Tint, I., et al., *Doublecortin associates with microtubules preferentially in regions of the axon displaying actin-rich protrusive structures.* J Neurosci, 2009. **29**(35): p. 10995-1010.
137. Chauvin, S. and A. Sobel, *Neuronal stathmins: a family of phosphoproteins cooperating for neuronal development, plasticity and regeneration.* Prog Neurobiol, 2015. **126**: p. 1-18.
138. Akhmanova, A. and C.C. Hoogenraad, *Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions.* Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(1): p. 47-54.
139. Rogers, G.C., et al., *A multicomponent assembly pathway contributes to the formation of acentrosomal microtubule arrays in interphase Drosophila cells.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(7): p. 3163-78.
140. Bearce, E.A., B. Erdogan, and L.A. Lowery, *TIPsy tour guides: how microtubule plus-end tracking proteins (+TIPs) facilitate axon guidance.* Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 241.
141. Neukirchen, D. and F. Bradke, *Neuronal polarization and the cytoskeleton.* Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(8): p. 825-33.
142. Maurer, S.P., et al., *GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(10): p. 3988-93.
143. Duellberg, C., et al., *The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability.* Elife, 2016. **5**.

144. Su, L.K. and Y. Qi, *Characterization of human MAPRE genes and their proteins.* Genomics, 2001. **71**(2): p. 142-9.
145. Su, L.K., et al., *APC binds to the novel protein EB1.* Cancer Res, 1995. **55**(14): p. 2972-7.
146. Hayashi, I. and M. Ikura, *Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1).* J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36430-4.
147. Komarova, Y., et al., *Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth.* J Cell Biol, 2009. **184**(5): p. 691-706.
148. De Groot, C.O., et al., *Molecular insights into mammalian end-binding protein heterodimerization.* J Biol Chem, 2010. **285**(8): p. 5802-14.
149. Honnappa, S., et al., *An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal.* Cell, 2009. **138**(2): p. 366-76.
150. Hayashi, I., et al., *Structural basis for the activation of microtubule assembly by the EB1 and p150Glued complex.* Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 449-60.
151. Nakamura, S., et al., *Dissecting the nanoscale distributions and functions of microtubule-end-binding proteins EB1 and ch-TOG in interphase HeLa cells.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51442.
152. Maurer, S.P., et al., *EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics.* Curr Biol, 2014. **24**(4): p. 372-84.
153. Roth, D., et al., *Spatial positioning of EB family proteins at microtubule tips involves distinct nucleotide-dependent binding properties.* J Cell Sci, 2018. **132**(4).
154. Bieling, P., et al., *CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites.* J Cell Biol, 2008. **183**(7): p. 1223-33.
155. Seetapun, D., et al., *Estimating the microtubule GTP cap size in vivo.* Curr Biol, 2012. **22**(18): p. 1681-7.
156. Montenegro Gouveia, S., et al., *In vitro reconstitution of the functional interplay between MCAK and EB3 at microtubule plus ends.* Curr Biol, 2010. **20**(19): p. 1717-22.
157. Jaworski, J., et al., *Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity.* Neuron, 2009. **61**(1): p. 85-100.
158. Kleele, T., et al., *An assay to image neuronal microtubule dynamics in mice.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 4827.
159. Sakakibara, A., et al., *Microtubule dynamics in neuronal morphogenesis.* Open Biol, 2013. **3**(7): p. 130061.
160. Parato, J. and F. Bartolini, *The microtubule cytoskeleton at the synapse.* Neurosci Lett, 2021. **753**: p. 135850.
161. Waites, C., X. Qu, and F. Bartolini, *The synaptic life of microtubules.* Curr Opin Neurobiol, 2021. **69**: p. 113-123.
162. Schuldiner, O. and A. Yaron, *Mechanisms of developmental neurite pruning.* Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(1): p. 101-19.
163. Neukomm, L.J. and M.R. Freeman, *Diverse cellular and molecular modes of axon degeneration.* Trends Cell Biol, 2014. **24**(9): p. 515-23.
164. Deckwerth, T.L. and E.M. Johnson, Jr., *Neurites can remain viable after destruction of the neuronal soma by programmed cell death (apoptosis).* Dev Biol, 1994. **165**(1): p. 63-72.
165. Adalbert, R. and M.P. Coleman, *Review: Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2013. **39**(2): p. 90-108.
166. Dadon-Nachum, M., E. Melamed, and D. Offen, *The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS.* J Mol Neurosci, 2011. **43**(3): p. 470-7.

167. Lindwall, C. and M. Kanje, *Retrograde axonal transport of JNK signaling molecules influence injury induced nuclear changes in p-c-Jun and ATF3 in adult rat sensory neurons.* Mol Cell Neurosci, 2005. **29**(2): p. 269-82.
168. Court, F.A. and M.P. Coleman, *Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli.* Trends Neurosci, 2012. **35**(6): p. 364-72.
169. Moldovan, M., S. Alvarez, and C. Krarup, *Motor axon excitability during Wallerian degeneration.* Brain, 2009. **132**(Pt 2): p. 511-23.
170. Coleman, M., *Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity.* Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(11): p. 889-98.
171. Bradke, F., J.W. Fawcett, and M.E. Spira, *Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration.* Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(3): p. 183-93.
172. Rishal, I. and M. Fainzilber, *Axon-soma communication in neuronal injury.* Nat Rev Neurosci, 2014. **15**(1): p. 32-42.
173. Sheng, Z.H., *The Interplay of Axonal Energy Homeostasis and Mitochondrial Trafficking and Anchoring.* Trends Cell Biol, 2017. **27**(6): p. 403-416.
174. Liu, K., et al., *Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration.* Annual review of neuroscience, 2011. **34**(1): p. 131-152.
175. Hussain, G., et al., *Current Status of Therapeutic Approaches against Peripheral Nerve Injuries: A Detailed Story from Injury to Recovery.* Int J Biol Sci, 2020. **16**(1): p. 116-134.
176. Zafar, S., et al., *Calotropis procera (leaves) supplementation exerts curative effects on promoting functional recovery in a mouse model of peripheral nerve injury.* Food Sci Nutr, 2021. **9**(9): p. 5016-5027.
177. Nagappan, P.G., H. Chen, and D.Y. Wang, *Neuroregeneration and plasticity: a review of the physiological mechanisms for achieving functional recovery postinjury.* Mil Med Res, 2020. **7**(1): p. 30.
178. He, Z. and Y. Jin, *Intrinsic Control of Axon Regeneration.* Neuron, 2016. **90**(3): p. 437-51.
179. Feltrin, D., et al., *Growth cone MKK7 mRNA targeting regulates MAP1b-dependent microtubule bundling to control neurite elongation.* PLoS Biol, 2012. **10**(12): p. e1001439.
180. Curcio, M. and F. Bradke, *Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2018. **34**: p. 495-521.
181. Belen, D., A. Aciduman, and U. Er, *History of peripheral nerve repair: may the procedure have been practiced in Hippocratic School?* Surg Neurol, 2009. **72**(2): p. 190-3; discussion 193-4.
182. Love, S., *DEGENERATION AND REGENERATION IN THE NERVOUS SYSTEM.* Brain, 2003. **126**(4): p. 1009-1011.
183. David, S. and A.J. Aguayo, *Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats.* Science, 1981. **214**(4523): p. 931-3.
184. Fawcett, J.W., *The Paper that Restarted Modern Central Nervous System Axon Regeneration Research.* Trends Neurosci, 2018. **41**(5): p. 239-242.
185. Reier, P.J., B.S. Bregman, and J.R. Wujek, *Intraspinal transplantation of embryonic spinal cord tissue in neonatal and adult rats.* J Comp Neurol, 1986. **247**(3): p. 275-96.
186. Stenevi, U., A. Bjorklund, and N.A. Svendgaard, *Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival.* Brain Res, 1976. **114**(1): p. 1-20.

187. Zhou, C.F., G. Raisman, and R.J. Morris, *Specific patterns of fibre outgrowth from transplants to host mice hippocampi, shown immunohistochemically by the use of allelic forms of Thy-1.* Neuroscience, 1985. **16**(4): p. 819-33.
188. Wictorin, K., et al., *Reformation of long axon pathways in adult rat central nervous system by human forebrain neuroblasts.* Nature, 1990. **347**(6293): p. 556-8.
189. Davies, S.J., et al., *Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system.* Nature, 1997. **390**(6661): p. 680-3.
190. Goldberg, J.L., et al., *Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells.* Science, 2002. **296**(5574): p. 1860-4.
191. Koseki, H., et al., *Selective rab11 transport and the intrinsic regenerative ability of CNS axons.* Elife, 2017. **6**.
192. Geoffroy, C.G., et al., *Evidence for an Age-Dependent Decline in Axon Regeneration in the Adult Mammalian Central Nervous System.* Cell Rep, 2016. **15**(2): p. 238-46.
193. Raivich, G. and M. Makwana, *The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways.* Brain Res Rev, 2007. **53**(2): p. 287-311.
194. Lasiecka, Z.M. and B. Winckler, *Mechanisms of polarized membrane trafficking in neurons -- focusing in on endosomes.* Mol Cell Neurosci, 2011. **48**(4): p. 278-87.
195. Hawkins, P.T., et al., *Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells.* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 647-62.
196. Ghosh-Roy, A., et al., *Kinesin-13 and tubulin posttranslational modifications regulate microtubule growth in axon regeneration.* Dev Cell, 2012. **23**(4): p. 716-28.
197. Yan, D., et al., *The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in C. elegans synapses and axon regeneration.* Cell, 2009. **138**(5): p. 1005-18.
198. Shigeoka, T., et al., *Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits.* Cell, 2016. **166**(1): p. 181-92.
199. Donnelly, C.J., et al., *Axonally synthesized beta-actin and GAP-43 proteins support distinct modes of axonal growth.* J Neurosci, 2013. **33**(8): p. 3311-22.
200. Twiss, J.L., et al., *Intra-axonal protein synthesis - a new target for neural repair?* Neural Regen Res, 2016. **11**(9): p. 1365-1367.
201. Kamber, D., H. Erez, and M.E. Spira, *Local calcium-dependent mechanisms determine whether a cut axonal end assembles a retarded endbulb or competent growth cone.* Exp Neurol, 2009. **219**(1): p. 112-25.
202. Chisholm, A.D., *Cytoskeletal dynamics in Caenorhabditis elegans axon regeneration.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2013. **29**: p. 271-97.
203. Erez, H., et al., *Formation of microtubule-based traps controls the sorting and concentration of vesicles to restricted sites of regenerating neurons after axotomy.* J Cell Biol, 2007. **176**(4): p. 497-507.
204. Tom, V.J., et al., *Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury.* J Neurosci, 2004. **24**(29): p. 6531-9.
205. Verma, P., et al., *Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration.* J Neurosci, 2005. **25**(2): p. 331-42.
206. Baas, P.W., et al., *Microtubule dynamics in axons and dendrites.* J Neurosci Res, 1991. **30**(1): p. 134-53.
207. Gobrecht, P., et al., *Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination.* J Neurosci, 2016. **36**(14): p. 3890-902.
208. Gumy, L.F., et al., *The kinesin-2 family member KIF3C regulates microtubule dynamics and is required for axon growth and regeneration.* J Neurosci, 2013. **33**(28): p. 11329-45.

209. Mahar, M. and V. Cavalli, *Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration.* Nat Rev Neurosci, 2018. **19**(6): p. 323-337.
210. Chandran, V., et al., *A Systems-Level Analysis of the Peripheral Nerve Intrinsic Axonal Growth Program.* Neuron, 2016. **89**(5): p. 956-70.
211. Ziv, N.E. and M.E. Spira, *Axotomy induces a transient and localized elevation of the free intracellular calcium concentration to the millimolar range.* J Neurophysiol, 1995. **74**(6): p. 2625-37.
212. Ghosh-Roy, A., et al., *Calcium and cyclic AMP promote axonal regeneration in Caenorhabditis elegans and require DLK-1 kinase.* J Neurosci, 2010. **30**(9): p. 3175-83.
213. Hao, Y., et al., *An evolutionarily conserved mechanism for cAMP elicited axonal regeneration involves direct activation of the dual leucine zipper kinase DLK.* Elife, 2016. **5**.
214. Hammarlund, M., et al., *Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway.* Science, 2009. **323**(5915): p. 802-6.
215. Cho, Y., et al., *Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration.* Cell, 2013. **155**(4): p. 894-908.
216. Venkatesh, I., et al., *Developmental Chromatin Restriction of Pro-Growth Gene Networks Acts as an Epigenetic Barrier to Axon Regeneration in Cortical Neurons.* Dev Neurobiol, 2018. **78**(10): p. 960-977.
217. Cavalli, V., et al., *Sunday Driver links axonal transport to damage signaling.* J Cell Biol, 2005. **168**(5): p. 775-87.
218. Drerup, C.M. and A.V. Nechiporuk, *JNK-interacting protein 3 mediates the retrograde transport of activated c-Jun N-terminal kinase and lysosomes.* PLoS Genet, 2013. **9**(2): p. e1003303.
219. Xiong, X., et al., *Protein turnover of the Wallenda/DLK kinase regulates a retrograde response to axonal injury.* J Cell Biol, 2010. **191**(1): p. 211-23.
220. Ben-Yaakov, K., et al., *Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve.* EMBO J, 2012. **31**(6): p. 1350-63.
221. Perlson, E., et al., *Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve.* Neuron, 2005. **45**(5): p. 715-26.
222. O'Donovan, K.J., et al., *B-RAF kinase drives developmental axon growth and promotes axon regeneration in the injured mature CNS.* J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 801-14.
223. Schwab, M.E. and S.M. Strittmatter, *Nogo limits neural plasticity and recovery from injury.* Curr Opin Neurobiol, 2014. **27**: p. 53-60.
224. Dickendesher, T.L., et al., *NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans.* Nat Neurosci, 2012. **15**(5): p. 703-12.
225. Shen, Y., et al., *PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration.* Science, 2009. **326**(5952): p. 592-6.
226. Snow, D.M., et al., *Neurite elongation on chondroitin sulfate proteoglycans is characterized by axonal fasciculation.* Exp Neurol, 2003. **182**(2): p. 310-21.
227. Polleux, F. and W. Snider, *Initiating and growing an axon.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(4): p. a001925.
228. Tahirovic, S., et al., *Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex.* J Neurosci, 2010. **30**(20): p. 6930-43.
229. Sakuma, H., et al., *Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase from human brain.* J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28622-9.

230. Holzman, L.B., S.E. Merritt, and G. Fan, *Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases.* J Biol Chem, 1994. **269**(49): p. 30808-17.
231. Waetzig, V., Y. Zhao, and T. Herdegen, *The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration.* Prog Neurobiol, 2006. **80**(2): p. 84-97.
232. Miller, B.R., et al., *A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration.* Nat Neurosci, 2009. **12**(4): p. 387-9.
233. Herdegen, T. and V. Waetzig, *The JNK and p38 signal transduction following axotomy.* Restor Neurol Neurosci, 2001. **19**(1-2): p. 29-39.
234. Gocek, E. and G.P. Studzinski, *The Potential of Vitamin D-Regulated Intracellular Signaling Pathways as Targets for Myeloid Leukemia Therapy.* J Clin Med, 2015. **4**(4): p. 504-34.
235. Tedeschi, A. and F. Bradke, *The DLK signalling pathway--a double-edged sword in neural development and regeneration.* EMBO Rep, 2013. **14**(7): p. 605-14.
236. Gallo, K.A. and G.L. Johnson, *Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 663-72.
237. Lewcock, J.W., et al., *The ubiquitin ligase Phr1 regulates axon outgrowth through modulation of microtubule dynamics.* Neuron, 2007. **56**(4): p. 604-20.
238. Hirai, S., et al., *The c-Jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex.* J Neurosci, 2006. **26**(46): p. 11992-2002.
239. Hirai, S., et al., *Expression of MUK/DLK/ZPK, an activator of the JNK pathway, in the nervous systems of the developing mouse embryo.* Gene Expr Patterns, 2005. **5**(4): p. 517-23.
240. Ghosh, A.S., et al., *DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity.* J Cell Biol, 2011. **194**(5): p. 751-64.
241. Asghari Adib, E., L.J. Smithson, and C.A. Collins, *An axonal stress response pathway: degenerative and regenerative signaling by DLK.* Curr Opin Neurobiol, 2018. **53**: p. 110-119.
242. Wang, X., et al., *Bimodal control of dendritic and axonal growth by the dual leucine zipper kinase pathway.* PLoS Biol, 2013. **11**(6): p. e1001572.
243. Bloom, A.J., et al., *The requirement for Phr1 in CNS axon tract formation reveals the corticostriatal boundary as a choice point for cortical axons.* Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2593-606.
244. Eto, K., et al., *Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth.* Neurosci Res, 2010. **66**(1): p. 37-45.
245. Watkins, T.A., et al., *DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(10): p. 4039-44.
246. Bradke, F. and C.G. Dotti, *The role of local actin instability in axon formation.* Science, 1999. **283**(5409): p. 1931-4.
247. Zhou, F.Q., et al., *NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC.* Neuron, 2004. **42**(6): p. 897-912.
248. Teng, J., et al., *Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization.* J Cell Biol, 2001. **155**(1): p. 65-76.

249. Litman, P., et al., *Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity.* Neuron, 1993. **10**(4): p. 627-38.
250. Bilimoria, P.M., et al., *A JIP3-regulated GSK3beta/DCX signaling pathway restricts axon branching.* J Neurosci, 2010. **30**(50): p. 16766-76.
251. Hirai, S., et al., *MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo.* Development, 2002. **129**(19): p. 4483-95.
252. Kawauchi, T., et al., *The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration.* EMBO J, 2003. **22**(16): p. 4190-201.
253. Hatanaka, Y. and F. Murakami, *In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells.* J Comp Neurol, 2002. **454**(1): p. 1-14.
254. Neidhart, S., et al., *c-Jun N-terminal kinase-3 (JNK3)/stress-activated protein kinase-beta (SAPKbeta) binds and phosphorylates the neuronal microtubule regulator SCG10.* FEBS Lett, 2001. **508**(2): p. 259-64.
255. Mason, M.R., et al., *Transcriptional upregulation of SCG10 and CAP-23 is correlated with regeneration of the axons of peripheral and central neurons in vivo.* Mol Cell Neurosci, 2002. **20**(4): p. 595-615.
256. Gdalyahu, A., et al., *DCX, a new mediator of the JNK pathway.* EMBO J, 2004. **23**(4): p. 823-32.
257. Groves, N.J., et al., *Behavioural Effects of Adult Vitamin D Deficiency in BALB/c Mice Are not Associated with Proliferation or Survival of Neurons in the Adult Hippocampus.* PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0152328.
258. Kim, M.H., et al., *The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase.* Nat Struct Biol, 2003. **10**(5): p. 324-33.
259. Taylor, K.R., et al., *Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain.* J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34442-50.
260. Darling, D.L., J. Yingling, and A. Wynshaw-Boris, *Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development.* Curr Top Dev Biol, 2005. **68**: p. 281-315.
261. Muslin, A.J., et al., *Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine.* Cell, 1996. **84**(6): p. 889-97.
262. Muslin, A.J. and H. Xing, *14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference.* Cell Signal, 2000. **12**(11-12): p. 703-9.
263. Tzivion, G. and J. Avruch, *14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation.* J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3061-4.
264. Fernandes de Abreu, D.A., D. Eyles, and F. Feron, *Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases.* Psychoneuroendocrinology, 2009. **34 Suppl 1**: p. S265-77.
265. Christakos, S., et al., *Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects.* Physiol Rev, 2016. **96**(1): p. 365-408.
266. Heaney, R.P., et al., *Vitamin D3 distribution and status in the body.* J Am Coll Nutr, 2009. **28**(3): p. 252-6.
267. Cheng, J.B., et al., *De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxilase.* J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 38084-93.
268. Chun, R.F., et al., *Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **144 Pt A**: p. 132-7.
269. Nykjaer, A., et al., *Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13895-900.
270. Jones, G., D.E. Prosser, and M. Kaufmann, *Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D.* J Lipid Res, 2014. **55**(1): p. 13-31.

271. Sundaresan, P.R., *Vitamin A and the sulfate-activating enzymes.* Biochim Biophys Acta, 1966. **113**(1): p. 95-109.
272. Shinki, T., et al., *Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in rat kidney but not in intestine.* J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13757-62.
273. Jones, G., D.E. Prosser, and M. Kaufmann, *25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D.* Arch Biochem Biophys, 2012. **523**(1): p. 9-18.
274. Gezen-Ak, D. and E. Dursun, *Molecular basis of vitamin D action in neurodegeneration: the story of a team perspective.* Hormones (Athens), 2019. **18**(1): p. 17-21.
275. Dursun, E. and D. Gezen-Ak, *Vitamin D basis of Alzheimer's disease: from genetics to biomarkers.* Hormones (Athens), 2019. **18**(1): p. 7-15.
276. Landel, V., et al., *Differential expression of vitamin D-associated enzymes and receptors in brain cell subtypes.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2018. **177**: p. 129-134.
277. Haussler, M.R., et al., *The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states.* J Endocrinol, 1997. **154 Suppl**: p. S57-73.
278. Prufer, K. and J. Barsony, *Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor.* Mol Endocrinol, 2002. **16**(8): p. 1738-51.
279. Langub, M.C., et al., *Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus.* Neuroscience, 2001. **104**(1): p. 49-56.
280. Stumpf, W.E., et al., *Brain target sites for 1,25-dihydroxyvitamin D3.* Science, 1982. **215**(4538): p. 1403-5.
281. Stumpf, W.E. and L.P. O'Brien, *1,25 (OH)2 vitamin D3 sites of action in the brain. An autoradiographic study.* Histochemistry, 1987. **87**(5): p. 393-406.
282. Veenstra, T.D., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo.* Brain Res, 1998. **804**(2): p. 193-205.
283. Walbert, T., G.F. Jirikowski, and K. Prufer, *Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the limbic system of the rat.* Horm Metab Res, 2001. **33**(9): p. 525-31.
284. Wang, T.T., et al., *Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(11): p. 2685-95.
285. Pike, J.W. and M.B. Meyer, *The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3).* Endocrinol Metab Clin North Am, 2010. **39**(2): p. 255-69, table of contents.
286. Baran, D.T., et al., *Binding characteristics of a membrane receptor that recognizes 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its epimer, 1 beta,25-dihydroxyvitamin D3.* J Cell Biochem, 1994. **56**(4): p. 510-7.
287. Buitrago, C., V.G. Pardo, and R. Boland, *Role of VDR in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2013. **136**: p. 125-30.
288. Cui, X., et al., *Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions.* Mol Cell Endocrinol, 2017. **453**: p. 131-143.
289. Haussler, M.R., et al., *Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1alpha,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011. **25**(4): p. 543-59.
290. Baran, D.T., et al., *1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 rapidly increases cytosolic calcium in clonal rat osteosarcoma cells lacking the vitamin D receptor.* J Bone Miner Res, 1991. **6**(12): p. 1269-75.

291. Nemere, I., et al., *Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia.* J Biol Chem, 1994. **269**(38): p. 23750-6.
292. Doroudi, M., et al., *Membrane actions of 1alpha,25(OH)2D3 are mediated by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in bone and cartilage cells.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2015. **145**: p. 65-74.
293. Buitrago, C. and R. Boland, *Caveolae and caveolin-1 are implicated in 1alpha,25(OH)2-vitamin D3-dependent modulation of Src, MAPK cascades and VDR localization in skeletal muscle cells.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **121**(1-2): p. 169-75.
294. Chen, J., et al., *Plasma membrane Pdia3 and VDR interact to elicit rapid responses to 1alpha,25(OH)(2)D(3).* Cell Signal, 2013. **25**(12): p. 2362-73.
295. Doroudi, M., et al., *New insights on membrane mediated effects of 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3 signaling in the musculoskeletal system.* Steroids, 2014. **81**: p. 81-7.
296. Doroudi, M., et al., *Signaling components of the 1alpha,25(OH)2D3-dependent Pdia3 receptor complex are required for Wnt5a calcium-dependent signaling.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2365-75.
297. Zanatta, L., et al., *1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) mechanism of action: modulation of L-type calcium channels leading to calcium uptake and intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of young rats.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(10): p. 1708-19.
298. Mizwicki, M.T., et al., *Identification of an alternative ligand-binding pocket in the nuclear vitamin D receptor and its functional importance in 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12876-81.
299. Mizwicki, M.T., et al., *A molecular description of ligand binding to the two overlapping binding pockets of the nuclear vitamin D receptor (VDR): structure-function implications.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **121**(1-2): p. 98-105.
300. Hii, C.S. and A. Ferrante, *The Non-Genomic Actions of Vitamin D.* Nutrients, 2016. **8**(3): p. 135.
301. Garcion, E., et al., *New clues about vitamin D functions in the nervous system.* Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(3): p. 100-5.
302. Burkert, R., J. McGrath, and D. Eyles, *Vitamin D receptor expression in the embryonic rat brain.* Neuroscience Research Communications, 2003. **33**(1): p. 63-71.
303. Cui, X., et al., *The vitamin D receptor in dopamine neurons; its presence in human substantia nigra and its ontogenesis in rat midbrain.* Neuroscience, 2013. **236**: p. 77-87.
304. Cornet, A., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of VDR and NGF gene in Schwann cells in vitro.* J Neurosci Res, 1998. **53**(6): p. 742-6.
305. Neveu, I., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells.* Brain Res Mol Brain Res, 1994. **24**(1-4): p. 70-6.
306. Saporito, M.S., et al., *Chronic 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated induction of nerve growth factor mRNA and protein in L929 fibroblasts and in adult rat brain.* Brain Res, 1994. **633**(1-2): p. 189-96.
307. Wion, D., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent inducer of nerve growth factor synthesis.* J Neurosci Res, 1991. **28**(1): p. 110-4.
308. de Viragh, P.A., K.G. Haglid, and M.R. Celio, *Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3887-90.

309. Feron, F., et al., *Developmental Vitamin D3 deficiency alters the adult rat brain.* Brain Res Bull, 2005. **65**(2): p. 141-8.
310. Zhu, Y., et al., *Abnormal neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice lacking 1,25-dihydroxy vitamin D3 (1,25-(OH)2 D3).* Hippocampus, 2012. **22**(3): p. 421-33.
311. Garcion, E., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3.* Glia, 1998. **22**(3): p. 282-94.
312. Gezen-Ak, D., E. Dursun, and S. Yilmazer, *The effects of vitamin D receptor silencing on the expression of LVSCC-A1C and LVSCC-A1D and the release of NGF in cortical neurons.* PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17553.
313. Dursun, E., et al., *Vitamin D deficiency might pose a greater risk for ApoEvarepsilon4 non-carrier Alzheimer's disease patients.* Neurol Sci, 2016. **37**(10): p. 1633-43.
314. Chabas, J.F., et al., *Cholecalciferol (vitamin D(3)) improves myelination and recovery after nerve injury.* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e65034.
315. Almeras, L., et al., *Developmental vitamin D deficiency alters brain protein expression in the adult rat: implications for neuropsychiatric disorders.* Proteomics, 2007. **7**(5): p. 769-80.
316. Eyles, D., et al., *Developmental vitamin D deficiency alters the expression of genes encoding mitochondrial, cytoskeletal and synaptic proteins in the adult rat brain.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **103**(3-5): p. 538-45.
317. Brown, J., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons.* Neurosci Lett, 2003. **343**(2): p. 139-43.
318. Eyles, D., et al., *Vitamin D3 and brain development.* Neuroscience, 2003. **118**(3): p. 641-53.
319. Humpel, C., *Organotypic brain slice cultures: A review.* Neuroscience, 2015. **305**: p. 86-98.
320. Beaudoin, G.M., 3rd, et al., *Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex.* Nat Protoc, 2012. **7**(9): p. 1741-54.
321. Caceres, A., B. Ye, and C.G. Dotti, *Neuronal polarity: demarcation, growth and commitment.* Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(4): p. 547-53.
322. Kaech, S., C.F. Huang, and G. Banker, *General considerations for live imaging of developing hippocampal neurons in culture.* Cold Spring Harb Protoc, 2012. **2012**(3): p. 312-8.
323. Banker, G.A. and W.M. Cowan, *Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture.* Brain Res, 1977. **126**(3): p. 397-42.
324. Kaech, S. and G. Banker, *Culturing hippocampal neurons.* Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2406-15.
325. Brewer, G.J., et al., *Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination.* J Neurosci Res, 1993. **35**(5): p. 567-76.
326. Pfrieger, F.W. and B.A. Barres, *Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro.* Science, 1997. **277**(5332): p. 1684-7.
327. Eroglu, C. and B.A. Barres, *Regulation of synaptic connectivity by glia.* Nature, 2010. **468**(7321): p. 223-31.
328. Banker, G.A., *Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture.* Science, 1980. **209**(4458): p. 809-10.
329. Gezen-Ak, D., et al., *The Transcriptional Regulatory Properties of Amyloid Beta 1-42 may Include Regulation of Genes Related to Neurodegeneration.* Neuromolecular Med, 2018. **20**(3): p. 363-375.

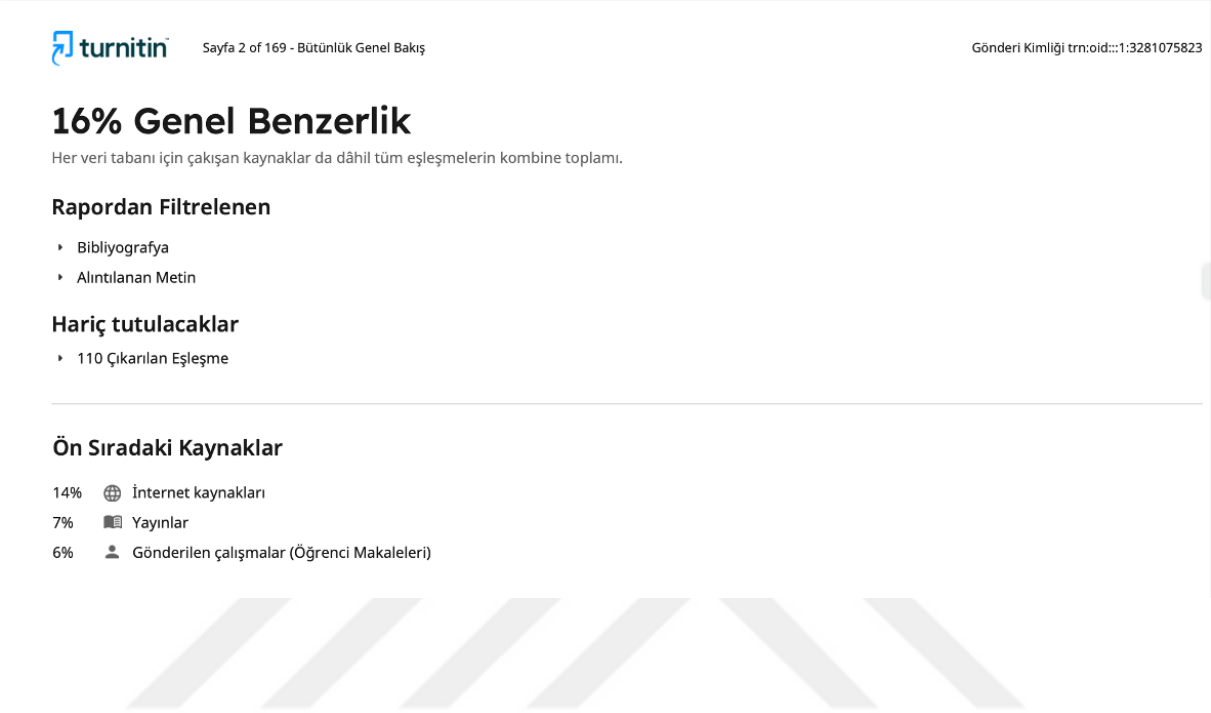
330. Dursun, E., D. Gezen-Ak, and S. Yilmazer, *A new mechanism for amyloid-beta induction of iNOS: vitamin D-VDR pathway disruption.* J Alzheimers Dis, 2013. **36**(3): p. 459-74.
331. Gezen-Ak, D., E. Dursun, and S. Yilmazer, *The Effect of Vitamin D Treatment On Nerve Growth Factor (NGF) Release From Hippocampal Neurons.* Noro Psikiyatr Ars, 2014. **51**(2): p. 157-162.
332. Dursun, E., D. Gezen-Ak, and S. Yilmazer, *The Influence of Vitamin D Treatment on the Inducible Nitric Oxide Synthase (INOS) Expression in Primary Hippocampal Neurons.* Noro Psikiyatr Ars, 2014. **51**(2): p. 163-168.
333. Goslin, K., H. Asmussen, and G. Banker, *Rat Hippocampal Neurons in Low-Density Culture*, in *Culturing Nerve Cells*, G. Banker and K. Goslin, Editors. 1998, The MIT Press. p. 0.
334. Parry, W.L. and G.P. Hemstreet, 3rd, *Cancer detection by quantitative fluorescence image analysis.* J Urol, 1988. **139**(2): p. 270-4.
335. Grill, R., et al., *Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury.* J Neurosci, 1997. **17**(14): p. 5560-72.
336. Tetzlaff, W., et al., *Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins.* Prog Brain Res, 1994. **103**: p. 271-86.
337. Kreis, T.E., *Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic.* EMBO J, 1987. **6**(9): p. 2597-606.
338. Webster, D.R., et al., *Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9040-4.
339. Webster, D.R., et al., *Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo.* J Cell Biol, 1987. **105**(1): p. 265-76.
340. Pagnamenta, A.T., et al., *Defective tubulin detyrosination causes structural brain abnormalities with cognitive deficiency in humans and mice.* Hum Mol Genet, 2019. **28**(20): p. 3391-3405.
341. Garand, M., et al., *Immunomodulatory Effects of Vitamin D Supplementation in a Deficient Population.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(9).
342. des Portes, V., et al., *A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome.* Cell, 1998. **92**(1): p. 51-61.
343. Gleeson, J.G., et al., *Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein.* Cell, 1998. **92**(1): p. 63-72.
344. Francis, F., et al., *Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons.* Neuron, 1999. **23**(2): p. 247-56.
345. Gleeson, J.G., et al., *Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons.* Neuron, 1999. **23**(2): p. 257-71.
346. Sapir, T., et al., *Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains.* Hum Mol Genet, 2000. **9**(5): p. 703-12.
347. Nawabi, H., et al., *Doublecortin-Like Kinases Promote Neuronal Survival and Induce Growth Cone Reformation via Distinct Mechanisms.* Neuron, 2015. **88**(4): p. 704-19.
348. Sternberger, L.A. and N.H. Sternberger, *Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(19): p. 6126-30.

349. Mandell, J.W. and G.A. Banker, *A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons.* J Neurosci, 1996. **16**(18): p. 5727-40.
350. Conde, C. and A. Caceres, *Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites.* Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(5): p. 319-32.
351. Kishi, M., et al., *Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization.* Science, 2005. **307**(5711): p. 929-32.
352. Barnes, A.P., et al., *LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons.* Cell, 2007. **129**(3): p. 549-63.
353. Shelly, M., et al., *LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization.* Cell, 2007. **129**(3): p. 565-77.
354. Otto, I.M., et al., *The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization.* Curr Biol, 2000. **10**(6): p. 345-8.
355. Bridges, D. and G.B. Moorhead, *14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein.* Sci STKE, 2005. **2005**(296): p. re10.
356. Moore, B., V. Perez, and F. Carlson, *Physiological and biochemical aspects of nervous integration.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1967: p. 343-359.
357. Aitken, A., *14-3-3 proteins: a historic overview.* Semin Cancer Biol, 2006. **16**(3): p. 162-72.
358. Xiao, B., et al., *Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways.* Nature, 1995. **376**(6536): p. 188-91.
359. Broadie, K., et al., *Leonardo, a Drosophila 14-3-3 protein involved in learning, regulates presynaptic function.* Neuron, 1997. **19**(2): p. 391-402.
360. Zhou, Y., et al., *A dynamically regulated 14-3-3, Slob, and Slowpoke potassium channel complex in Drosophila presynaptic nerve terminals.* Neuron, 1999. **22**(4): p. 809-18.
361. Pozuelo Rubio, M., et al., *14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking.* Biochem J, 2004. **379**(Pt 2): p. 395-408.
362. Toyo-oka, K., et al., *14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome.* Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 274-85.
363. Obsil, T. and V. Obsilova, *Structural basis of 14-3-3 protein functions.* Semin Cell Dev Biol, 2011. **22**(7): p. 663-72.
364. Davezac, N., et al., *Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization.* Oncogene, 2000. **19**(18): p. 2179-85.
365. Brunet, A., et al., *14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport.* J Cell Biol, 2002. **156**(5): p. 817-28.
366. Obsil, T., et al., *Two 14-3-3 binding motifs are required for stable association of Forkhead transcription factor FOXO4 with 14-3-3 proteins and inhibition of DNA binding.* Biochemistry, 2003. **42**(51): p. 15264-72.
367. Stomski, F.C., et al., *Identification of a 14-3-3 binding sequence in the common beta chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors that is serine-phosphorylated by GM-CSF.* Blood, 1999. **94**(6): p. 1933-42.
368. Berg, D., C. Holzmann, and O. Riess, *14-3-3 proteins in the nervous system.* Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(9): p. 752-62.
369. Ikeda, M., et al., *Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia.* Hum Mol Genet, 2008. **17**(20): p. 3212-22.
370. Cheah, P.S., et al., *Neurodevelopmental and neuropsychiatric behaviour defects arise from 14-3-3zeta deficiency.* Mol Psychiatry, 2012. **17**(4): p. 451-66.

371. Toyo-oka, K., et al., *14-3-3epsilon and zeta regulate neurogenesis and differentiation of neuronal progenitor cells in the developing brain.* J Neurosci, 2014. **34**(36): p. 12168-81.
372. Kuhne, H., et al., *Vitamin D receptor regulates intestinal proteins involved in cell proliferation, migration and stress response.* Lipids Health Dis, 2014. **13**: p. 51.
373. Gorgels, T.G., et al., *B-50/GAP43 is localized at the cytoplasmic side of the plasma membrane in developing and adult rat pyramidal tract.* J Neurosci, 1989. **9**(11): p. 3861-9.
374. Morita, S. and S. Miyata, *Synaptic localization of growth-associated protein 43 in cultured hippocampal neurons during synaptogenesis.* Cell Biochem Funct, 2013. **31**(5): p. 400-11.
375. Routtenberg, A., et al., *Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7657-62.
376. Aigner, L., et al., *Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice.* Cell, 1995. **83**(2): p. 269-78.
377. Skene, J.H., et al., *A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes.* Science, 1986. **233**(4765): p. 783-6.
378. Allegra Mascaro, A.L., et al., *In vivo single branch axotomy induces GAP-43-dependent sprouting and synaptic remodeling in cerebellar cortex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(26): p. 10824-9.
379. Goetzl, E.J., et al., *Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease.* FASEB J, 2016. **30**(12): p. 4141-4148.
380. Holahan, M.R., *A Shift from a Pivotal to Supporting Role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the Coordination of Axonal Structural and Functional Plasticity.* Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 266.
381. Kawasaki, A., et al., *Growth Cone Phosphoproteomics Reveals that GAP-43 Phosphorylated by JNK Is a Marker of Axon Growth and Regeneration.* iScience, 2018. **4**: p. 190-203.

EKLER

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



turnitin Sayfa 2 of 169 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3281075823

16% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çakışan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Rapordan Filtrelenen

- Bibliyografya
- Alıntılanan Metin

Hariç tutulacaklar

- 110 Çıkarılan Eşleşme

Ön Sıradaki Kaynaklar

14% İnternet kaynakları
7% Yayınlar
6% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☒ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☐ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

EBRU KESKİN

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☒ **Kurum izni gerekmektedir.**

☐ **Kurum izni gerekmemektedir.**

EBRU KESKİN

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 16.09.2021-473019



Sayın Doç. Dr. Erdinç DURSUN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Karar No:2021/25

Başvuru : 22.06.2021/ 252213

Toplantı Tarihi : 13.09.2021

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen "Vitamin D'nin Akson Gelişiminde ve Rejenerasyonundaki Rolünün İncelenmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna oy çokluğuyla karar verilmiştir.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	16 Günlük Hamile Dişi
	Sayısı	1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1+1
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		22.11.2021/22.11.2024

Prof. Dr. Ufuk KOLAK
Başkan

Prof. Dr. Alper OKYAR
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Üye
(Toplantıya katılmadı)

Prof. Dr. Büket AYBAR
Üye

Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR
Üye

Prof. Dr. Uğur AKSU
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aydın ÇEVİK
Üye

Arş. Gör. Dr. Gül BAKIRER ÖZTÜRK
Üye

Mak.Yük.Müh.Dr.Burak OLGUN
Üye
(Toplantıya katılmadı)

Av. Selma DEMİR
Üye
(Toplantıya katılmadı)