



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**SİNİR SİSTEMİNDE MİYELİN MEMBRAN DİNAMİĞİNİN
İNCELENMESİ**

TUBA OĞUZ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. BİLAL ERSEN KERMAN

İSTANBUL-2024

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Tuba OĞUZ
Tez Başlığı : Sinir Sisteminde Miyelin Membran Dinamiğinin İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 22.07.2024

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Bahar GÜNTEKİN

İstanbul Medipol Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Neşe AYŞİT

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

Tuba OĞUZ



TEŞEKKÜR

Yıllar önce bugün içinde bulunduğum araştırma merkezinin kapılarını bana açarak her geçen gün büyüyen ve gelişen donanımlı bir ortamda araştırma yapma imkânı sağlayan, projelerimizde fikirleriyle bize yol gösterici olan, doktora eğitimim boyunca desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Fikirleriyle, tecrübeleriyle beslendiğim, projeleriyle dolu dolu geçen bir doktora yapma fırsatını bana sunan ve çeşitli alanlarda kendimi geliştirmemi sağlayan, sevgili danışman hocam Doç. Dr. Bilal Ersen Kerman'a,

Tezime kattığı fikirlerle ve akademik dünyadaki desteğiyle doktora hayatıma katkı sağlayan Dr. Taha Keleştemur'a,

Hem her konudaki yardımı hem de sonsuz manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, bende yeri hep başka olan Dr. Arda Kebapçı'ya,

Akademik bilgilerini paylaşarak gelişimimize destek olan ve katkı sağlayan, Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç ve Doç. Dr. Mustafa Çağlar Beker'e,

Doktora sürecim boyunca beraber çalışma imkânı sağlayarak farklı alanları tecrübe etmemi sağlayan ve sağladıkları burslar ile beni destekleyen Doç. Dr. Fatih Toy ve Dr. Emrah Eroğlu'na,

Burada geçirdiğim zaman boyunca bana destek olan ve her zaman yanımda olacağını bildiğim, sevgili Dr. Neşe Ayşit'e,

Burada geçirdiğimiz deli dolu hayatımızı yaşanabilir kılan, çok güzel anılar biriktirdiğimiz, beraber gülüp eğlendiğimiz, stresimizi paylaştığımız sevgili arkadaşlarım Eşref Çelik, Zeynep Aladağ, Burcu Kurt Vatandaşlar, İlayda Aydın, Emre Vatandaşlar, Esra Nur Yiğit, Şerif Aydın, Olgu Enis Tok, Şükriye Bilir, İlham Bahhar, Ayşe Server Sezer, Safiye Serdengeçti, Sevginur Bostan, Şevval Şimşek, Sadık Bay, Kemal Bayat, Gülsena Baydaş, Şeyma Çimen, Pelin Dilsiz, Cemil Özgül, İhsan Yozgat, Fadime Çadircı, Fulya Köksalar Alkan'a ve burada sayamadığım tüm arkadaşlarıma,

Bilkent'te başlayan, sürpriz şekilde dünyanın farklı şehirlerinde ve en son Medipol'de yollarımızın kesiştiği, önemli zamanlarda akıl danıştığım, mutlu zamanları paylaştığım, arkadaşım Dr. Kıvanç Kök'e,

Kritik zamanlardaki önemli kurtarıcılarım Büşra Batgi ve Mehtap Şimşek'e, doktora sürecimdeki desteğini hiç unutmayacağım Göknil Erbatu Çelik'e,

Araştırmalarımızda bizi ellerinden gelen en güzel şekilde destekleyen MEDİTAM Ailesine, Ekrem Musa Özdemir, Ali Şenbahçe ve Barış Cebeci'ye,

Bu çalışmaya destek olarak kendi araştırma dünyalarının temellerini atan, tecrübe kazanan ve analizlerde yardımcı olan Osman Mersin ve Semih Macit'e,

Akademik hayatımın bütün safhalarında bana sonsuz sabır gösteren, uzun çalışma saatlerine, çalışmayla geçen tatillere, beraber geçiremediğimiz günlere yıllardır anlayış gösteren, en önemli destekçilerim sevgili annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilim ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü'nün (SABİTA) bilimsel araştırmalara sağladığı olanaklarla yapılmıştır. Bu tez çalışmasında yer alan projeler Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 3501 destek programı proje no:116S506 ve 1002 destek programı proje no:120S327 ile desteklenmiştir. TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB) 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında doktora eğitimim süresince bana verdikleri destekten ötürü teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR.....	ix
TABLO LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Merkezi Sinir Sistemi ve Oligodendrositler.....	5
4.2. Miyelin	6
4.2.1. Miyelinin oluşumu	7
4.2.2. Taşınma mekanizmasının incelenmesi.....	13
4.2.3. Miyelinin yapısı	15
4.3. Miyelin Yapısındaki Önemli Lipitler.....	18
4.3.1. Kolesterol	18
4.3.2. Galaktosilseramid.....	18
4.3.3. Fosfolipitler	19
4.4. Miyelin Yapısındaki Önemli Proteinler	20
4.4.1. Myelin bazık proteini (MBP).....	20
4.4.2. Proteolipid proteini (PLP)	20
4.5. Miyelin Hastalıkları	21
4.5.1. Multipl skleroz	21
4.5.2. Pelizeaus merzbacher hastalığı	21
4.6. Miyelin Görüntüleme Yöntemleri.....	22
4.6.1. Immunflorasan boyamalar	22

4.6.2. İşaretsiz (label-free) miyelin görüntüleme yöntemleri.....	23
5. MATERYAL ve METOD.....	29
5.1. Malzeme Listesi	29
5.2. Plazmidlerin Üretimi	32
5.2.1. MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG plazmitlerinin klonlama ile elde edilmesi	32
5.2.2. MBP:GPI-GFP plazmidinin doğrulanması	35
5.2.3. MBP:Venus-VSVG plazmidinin doğrulanması	37
5.3. Lentivirüslerin Üretimi	38
5.3.1. Plazmidlerin izolasyonu	38
5.3.2. HEK Hücrelerinin çoğaltılması.....	38
5.3.3. Lentivirüs üretimi.....	38
5.4. HELA Hücre Hattında Vezikül Taşınımının İncelenmesi	40
5.4.1. HELA hücrelerinin çoğaltılması ve dondurulması	40
5.4.2. HELA hücrelerinde GPI-GFP ve Venus-VSVG ifadesi	40
5.4.3. Vezikül hareketinin spinning disk mikroskopunda görüntülenmesi ve analizi	40
5.5. Oligodendrosit Hücrelerinde Vezikül Hareketinin İncelenmesi	40
5.5.1. Hücreler için büyüme ortamının hazırlanması	41
5.5.2. Oligodendrositlerin kültür ortamında elde edilmesi	41
5.5.3. Nöronların kültür ortamında elde edilmesi	43
5.5.4. Ortak-kültür sisteminin hazırlanması ve idamesi.....	43
5.5.5. Gerçek zamanlı vezikül takibi.....	43
5.5.6. Görüntü işleme, lipidlerin, lipid sallarının ve kargo veziküllerinin hareketini takip etme	44
5.6. Miyelin Yapısının İşaretsiz Görüntülenmesi	45
5.6.1. Deney hayvanları	45
5.6.2. Demiyelinizasyon hasarı oluşturma ve remiyelinizasyon süreci	45
5.6.3. Demiyelinizasyonun görüntülenerek doğrulanması.....	46
5.6.4. Örnek hazırlama	46
5.6.5. Konfokal mikroskobu ile örnekleri görüntüleme ve kontrol	47

5.6.6. Işık mikroskopunda beyin kesitinin genel görüntüsünün alınması.....	47
5.6.7. Holotomografik görüntüleme ve optimizasyonlar	48
5.6.8. Optimal kesit kalınlığının belirlenmesi.....	49
5.6.9. Niceliksel analiz ve g_e -ratio hesaplamaları	50
6. BULGULAR.....	52
6.1. MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG Plazmidlerinin Klonlama ile Elde Edilmesi	52
6.1.1. MBP:GPI-GFP plazmidinin elde edilmesi.....	52
6.1.2. MBP:Venus-VSVG plazmidinin klonlama ile elde edilmesi.....	53
6.2. MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG Plazmidlerinin Doğrulanması	54
6.2.1. MBP:GPI-GFP plazmidinin kesim enzimleri ve PZR ile doğrulanması	54
6.2.2. MBP:GPI-GFP plazmidinin sekanslama ile kontrolü.....	55
6.2.3. MBP:Venus-VSVG plazmidinin kesim enzimleri ve PZR ile doğrulanması ..	58
6.2.4. MBP:Venus-VSVG plazmidinin sekanslama ile kontrolü.....	59
6.3. HELA Hücre Hattında Vezikül Taşınımının İncelenmesi	61
6.3.1. Durağan noktaların tespiti için hücresel hareket hızının belirlenmesi	61
6.3.2. HELA hücre hattında GPI-GFP işaretli lipid salları bulunan veziküllerin hareketinin incelenmesi.....	62
6.3.3. HELA hücre hattında Venus-VSVG işaretli veziküllerin hareketinin incelenmesi.....	66
6.4. Üretilen Lentivirüslerin Hücrelerde Test Edilmesi	70
6.5. Oligodendrosit Hücrelerinin Morfolojik Sınıflandırılması	72
6.6. Oligodendrosit Membranının Bir Bütün Olarak ve Membran Lipit Sallarının GPI Çapasına Bağlı Floresan Protein Kullanılarak İncelenmesi.....	74
6.7. Oligodendrositlerde Vezikül Taşınımının İncelenmesi	78
6.7.1. Varolan gövde hareketinin belirlenmesi	78
6.7.2. Oligodendrositlerde GPI-GFP işaretli lipid salları bulunan veziküllerin hareketinin incelenmesi.....	81
6.8. In vivo Modelde Miyelinizasyonun İncelenmesi.....	85
6.8.1. Kesit kalınlığının optimize edilmesi	85

6.8.2. 3D Holotomografi mikroskopuyla miyelinli aksonların görüntülenmesi	87
6.8.3. Demiyelinizasyon modelinin oluşturulması.....	88
6.8.4. Demiyelinizasyon modelinin 3D holotomografi mikroskopuyla görüntülenmesi	88
6.8.5. Miyelinin sayısallaştırılması	90
6.8.6. Remiyelinize olmuş aksonların holotomografik görüntülenmesi	92
7. TARTIŞMA.....	94
8. SONUÇ.....	100
9. KAYNAKLAR.....	101
10. ETİK KURUL ONAYI.....	111
11. ÖZGEÇMİŞ	115

KISALTMALAR

μ l	Mikrolitre
μ m	Micrometre
3D	3 boyutlu
Akt	Protein kinase B
Ala	Alanin
AMP	Amfisilin
Asp	Aspartik asit
BDNF	Beyinden gelen nörotrofik faktör
bp	Baz çifti
c	Sitozolik proteinler
cAMP	Siklik-AMP
CARS	Koherent anti-stokes raman mikroskobu
CASPR	Contactin-ilişkili protein 1
CC1	Anti-adenomatous polyposis coli (APC) clone CC1
CFP	Gök mavisi floresan proteini
CMV	Cytomegalovirus güçlendirici erken promotörü
CNP	2,3-cyclic nucleotide-3-phosphodiesterase
CNTF	Siliar nörotrofik faktör
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DM20	Proteolipid proteini izoformu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Hücre besi yeri
DMEM-HG	Yüksek glikozlu Dulbecco's Modified Eagle Hücre besi yeri
DMSO	Dimetil sulfoksit
e	Hücre dışı alan
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EM	Elektron mikroskobu
ERK1/2	Hücre dışı sinyal-kontrollü kinaz 1/2
FBS	Fetal bovine serumu
FGF-2	Fibroblast büyüme faktörü
FWHM	Yarı maksimumdaki tam genişlikte

FYN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
GalC	Galactosylceramidaz
GDNF	Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör
GFP	Yeşil florasan proteini
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GST- π	Glutathione S-transferase
HEK	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HELA	Henrietta Lacks kanser hücreleri
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IPL	İntraprerioid line (orta katman)
KAN	Kanamisin
L-AA	L-Askorbik asit
LB	Luria Broth (bakteri besi yeri)
LckN	Membrana yönelme sinyal sekansı
LPC	Lizolesitin
LV	Lentivirüs
Lys	Lisin
m	Membran
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MBP	Miyelin bazik proteini
MDL	Major dense line (ana koyu katman)
ML	Miyelin katmanı
MOG	Miyelin oligodendrosit glikoproteini
MS	Multipl skleroz
MSS	Merkezi sinir sistemi
mTor	Memeli hedefli Rapamycin
n	Kırınım indisi
nc	Sitosol alanı kırınım indisi
ne	Hücre dışı alan kırınım indisi
NF155	Nörofascin-155
NG2	Nerve/glial antigen 2
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyali

nm	Nanometre
nm	Membran kırınım indisi
np	Periaksonal alan kırınım indisi
NPC	Nöral progenitör hücreler
NT3	Nörotrofin-3
O.C.T.	Optimal cutting solüsyonu
O4	Oligodendrosit markeri 4
Olig2	Oligodendrosit transkripsiyon faktörü
p	Periaxonal alan
PBS	Tamponlu fosfat salin
PDGF- α	Trombosit kökenli büyüme faktörü- α
PE	Phosphatidylethanolamine fosfolipitleri
PEI	Polietilenimin
PFA	Formaldehit
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PLP	Proteolipid proteini
PMD	Pelizaeus-Merzbacher Hastalığı
pMDL	Gag ve pol taşıyıcı plasmid
pRSV-REV	Rev cDNA taşıyıcı plasmid
PSS	Periferik sinir sistemi
PTEN	Fosfataz ve Tensin homologu
pVSVG	Lentivral plasmid VSVG kılıfı
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RI	Kırınım indisi
SARAPE	Survey-anchor-wrap-expand modeli
SCoRe	Spektral konfokal yansıtma mikroskopisi
Sox10	Sry-alakalı HMg-Box geni 10
SPeRe	Spektral reflektometri
SPG2	Spastic paraplegia 2
T3	Triiodothyronine
tc	Sitozol kalınlığı
te	Hücre dışı alan kalınlığı

TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
THG	Üçüncül Harmonik Mikroskobu
tm	Membran kalınlığı
tp	Periaksonal alan kalınlığı
UPS	Unfolded protein response
Val	Valin
VSVG	Veziküler Somatit G Protein
WT	Doğal cins



TABLO LİSTESİ

Tablo 5.1.1: Malzeme Listesi	29
Tablo 5.2.1.1.1: Klonlama için seçilen restriksiyon enzimleri ve tanıma sekansları.	32
Tablo 5.2.1.2.1: GPI-GFP ve Venus-VSVG bölgelerinin çoğaltılması için seçilen primer çiftleri.	34
Tablo 5.2.2.3.1: MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG plazmidlerinde sekanslama için kullanılan primerler.	37
Tablo 6.3.2.1: Hela hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin sayısal hız dağılımları.	63
Tablo 6.3.3.1: Hela hücrelerinde incelenen Venus-VSVG işaretli veziküllerin sahip olduğu hızlara göre gruplara dağılımı.	67
Tablo 6.7.2.1: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin sayısal hız dağılımları.	82

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1: Bir oligodendrosit hücresinin farklılaşma evreleri ve her bir evreye özgü ifade edilen proteinlerin gösterilmesi.....	6
Şekil 4.2.1.1: Oligodendrosit öncül hücrelerinin miyelinleyen olgun oligodendrositlere farklılaşması ve akson üzerinde miyelin kılıfı oluşturma aşamaları.....	9
Şekil 4.2.1.2: Oligodendrosit uzantısının aksonu sararak miyelin membran oluşturma aşamaları ve kompakt miyelin kılıf kesiti görüntüsü.	13
Şekil 4.2.3.1: Miyelinli bir aksonda bulunan akso-glial yapılar.....	17
Şekil 4.6.2.1.1: Holotomografi sisteminin çalışma prensibi ve miyelinli bir aksonun kırılma indisi özellikleri	25
Şekil 4.6.2.1.2: Miyelinin kırınım indeksi tomografisi kullanılarak işaretli görüntülenmesi.....	26
Şekil 5.2.1.1.1: MBP-LckN-TdTomato plazmidi ve MBP promotörünün gösterimi.....	33
Şekil 5.5.2.1: Çoğalma aşamasındaki nöronal progenitor hücrelerin gösterimi.....	42
Şekil 5.5.6.1: TrackMate ile yapılan vezikül takip yöntemi örneği.....	45
Şekil 5.6.6.1: Hazırlanan beyin kesitlerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi.	48
Şekil 6.1.1.1: Klonlama ile elde edilen pMBP:GPI-GFP plazmidinin gösterimi.	53
Şekil 6.1.2.1: Klonlama ile elde edilen MBP:Venus-VSVG plazmidinin gösterimi.	54
Şekil 6.2.1.1: Klonlama ile elde edilen MBP:GPI-GFP plazmidinin doğrulanması.	55
Şekil 6.2.2.1: Üretilen MBP:GPI-GFP plazmidinin 5'-ucu (a) ve 3'-ucuna (b) ait klonlama bölgesinin sekanslama sonuçları.	57
Şekil 6.2.3.1: Klonlama ile elde edilen MBP:Venus-VSVG plazmidinin doğrulanması.	58
Şekil 6.2.4.1: Üretilen MBP:Venus-VSVG plazmidinin 5'-ucu (a) ve 3'-ucuna (b) ait klonlama bölgesinin sekanslama sonuçları.	60
Şekil 6.3.1.1: HELA hücrelerinde hücre hareketin tespit edilmesi.	61
Şekil 6.3.2.1: HELA hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin hızlarının yüzdesel dağılım grafiği.....	62
Şekil 6.3.2.2: HELA hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli her bir vezikülün anlık hız dağılımı	64

Şekil 6.3.2.3: HELA hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli her bir vezikülün toplam ortalama hız ve hareketli olduğu hızların karşılaştırılması.	65
Şekil 6.3.3.1: HELA hücrelerinde Venus-VSVG işaretli veziküllerin hız dağılım histogramı.....	66
Şekil 6.3.3.2: HELA hücrelerinde incelenen Venus-VSVG işaretli her bir vezikülün anlık hız dağılımı.....	68
Şekil 6.3.3.3: HELA hücrelerinde incelenen Venus-VSVG işaretli her bir vezikülün toplam ortalama hız ve hareketli olduğu hızların karşılaştırılması.	69
Şekil 6.4.1: Üretilen MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG lentivirüslerinin oligodendrositlerde test edilmesi.....	71
Şekil 6.5.1: 3 farklı morfolojide gözlemlenen oligodendrositlere örnekler.....	73
Şekil 6.6.1: Tip A oligodendrosit hücresi örneği.	75
Şekil 6.6.2: Tip B oligodendrosit hücresi örneği.....	77
Şekil 6.6.3: Tip C oligodendrosit hücresi örneği.	78
Şekil 6.7.1.1: Oligodendrositlerde hücresel sabit hareket hızının belirlenmesi için seçilen noktalar ve hız dağılım grafikleri.....	79
Şekil 6.7.1.2: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli her bir vezikülün anlık hız dağılımı.....	80
Şekil 6.7.2.2: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin hızlarının sayısal dağılım grafiği.....	82
Şekil 6.7.2.3: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli her bir vezikülün toplam ortalama hız ve hareketli olduğu hızların karşılaştırılması.	84
Şekil 6.8.1.1: Optimal kesit kalınlığının belirlenmesi.	86
Şekil 6.8.2.1: Miyelinli aksonların uzunlamasına görünümü.	88
Şekil 6.8.4.1: Demiyelinizasyon sonrası miyeline özgü imzanın kaybı.	89
Şekil 6.8.5.1: Holotomografik görüntüleme ile g_e -ratio hesaplaması.....	91
Şekil 6.8.5.2: Holotomografi ve elektron mikroskobu görüntülerinden elde edilen g_e -ratio ölçümlerinin karşılaştırılması	91
Şekil 6.8.6.1: Holotomografik görüntülere uygulanan g_e -ratio hesaplama yönteminin, remiyelinize olmuş aksonlarda daha ince miyelini tespit edecek hassasiyette olduğunun gösterilmesi	93

1. ÖZET

SİNİR SİSTEMİNDE MİYELİN MEMBRAN DİNAMİĞİNİN İNCELENMESİ

Bu tez çalışması, merkezi sinir sisteminde miyelinleşme sürecini normal ve hastalıklı durumda incelemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, nöronal kök hücrelerden farklılaştırılan nöron-oligodendrosit ortak kültürleri kullanılarak miyelin membran oluşumu ve genişleme sürecinde kargo veziküllerinin taşınma dinamiği araştırılmıştır. Bu süreçlerde kargo veziküllerinin taşınması, GPI-GFP ve Venus-VSVG proteinleri ile işaretlenmiş oligodendrositlerde gözlemlenmiştir. Ayrıca, LckN sinyalini taşıyan TdTomato proteininin kullanımıyla alternatif taşınma mekanizmaları da incelenmiştir. Araştırma, oligodendrositlerin farklı morfolojik tiplerine göre (Tip A, B ve C) gruplandırıldığını ve bu grupların miyelinleşme sürecindeki farklılıkları ortaya koyduğunu göstermiştir. Kargo veziküllerinin ve lipidlerin taşınmasında sürekli bir dinamik gözlenmiş ve bu süreçlerin hızlı zamansal çözünürlükle incelenmesi için yeni görüntüleme yöntemleri geliştirilmiştir.

Holotomografik görüntüleme yöntemi, işaretli miyelinli aksonları görüntülemek için kullanılmış ve miyelin kalınlığını ve sağlığını değerlendirmek için elektron mikroskobu ile yapılan g-ratio hesaplamaları ile karşılaştırılabilir sonuçlar vermiştir. Ayrıca, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon süreçlerini fare modellerinde incelemek için LPC modeli kullanılmış ve holotomografik görüntüleme ile bu süreçlerin görüntülenmesi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen yöntemlerin sinir sistemi hastalıklarının araştırılmasında ve ilaç taramasında potansiyel olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasını 116S506 ve 120S327 nolu projelerle destekleyen TÜBİTAK ARDEB programına ve 2211-C burs programı ile doktora eğitimimi destekleyen TÜBİTAK BİDEB programına teşekkürlerimi sunarım.

Anahtar kelimeler: Hücre İçi Taşıma, Multipl Skleroz, Oligodendrosit

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF MYELIN MEMBRANE DYNAMICS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

This thesis study aimed to investigate the process of myelination in the central nervous system under both normal and pathological conditions. Using neuron-oligodendrocyte co-cultures differentiated from neuronal stem cells, the dynamics of cargo vesicle transport during myelin membrane formation and expansion were explored. The transport of cargo vesicles was observed in oligodendrocytes labeled with GPI-GFP and Venus-VSVG proteins. Additionally, alternative transport mechanisms were examined using the TdTomato protein carrying the LckN signal.

The research classified oligodendrocytes into different morphological types (Type A, B, and C) and demonstrated their differences in the process of myelination. Continuous dynamics were observed in the transport of cargo vesicles and lipids, and new imaging methods were developed for high temporal resolution of these processes.

The holotomographic imaging method was employed to visualize unlabeled myelinated axons and provided results comparable to g-ratio calculations obtained with electron microscopy for assessing myelin thickness and health. Moreover, the LPC model was used to investigate demyelination and remyelination processes in mouse models, successfully visualized using holotomographic imaging.

In conclusion, this study has demonstrated the potential use of the developed methods in researching neurological disorders and drug screening.

I would like to thank TUBITAK ARDEB research program for supporting my thesis work with grants no: 116S506 and 120S327; and TUBITAK BIDEB program for supporting my PhD education with 2211-C scholarship program.

Keywords: Vesicle Transport, Multiple Sclerosis, Oligodendrocyte

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Sinir sisteminde miyelin, aksonları sararak sinyal iletiminin hem hızlı gerçekleşmesini hem de hücre gövdesinden çok ileri uzanan aksonların görevlerini sağlıklı yapabilmelerine yardımcı olan bir yapıdır. Miyelin, periferik sinir sisteminde (PSS) glia olarak adlandırılan Schwann hücreleri tarafından ve merkezi sinir sisteminde (MSS) oligodendrositler tarafından üretilir (1). Nöron aksonlarının miyelin kılıfla kaplanması için gliaların aksonları bulması, miyelinlenecek aksonu ve akson üzerinde başlama bölgelerini seçmesi ve miyelin membranı oluşturarak aksonu sarması gerekir. Bu aşamalar, şimdiye kadar immunohistokimyasal yöntemlerle, elektron mikroskobu ve kısa gerçek zamanlı görüntüleme ile anlaşılmaya çalışılmıştır (2–7). Elde edilen veriler, miyelin membranının oluşumu sırasında gliaların aksonları saran uzantılarının dinamik bir yapıda olduğu ve miyelinizasyon sırasında (sarma ve genişleme) çeşitli yayılma morfolojileri kullandığını göstermiştir.

Miyelinizasyon genel olarak gözlemlenebilmiş ve incelenebilmiş olsa da miyelinin oluşma evreleri ve miyelini oluşturan komponentlerin (lipitler, proteinler) taşınma mekanizmasıyla ilgili daha çok detaylı bilgiye ihtiyaç vardır. Miyelinleşme sırasında miyelin membranının hem büyümesi hem de genişlemesi için gerekli lipit ve proteinlerin hızlı ve sürekli bir şekilde sağlanması gerekmektedir. Bu taşınma olayının gözlemlenebilmesi, hangi hızda ve sıklıkta miyelin membrana lipit ve proteinlerin katıldığına gözlemlenebilmesi miyelinleşme ile ilgili bize birçok detayı verecektir. Veziküler somatit virüs G glikoproteini (VSV-G) kullanılarak yapılan bir çalışmada, miyelin membrana gelen kargonun miyelinizasyonun farklı evrelerinde farklı yerlerden membrana katıldığı gösterilmiştir (3). Bu katılım, miyelin membran katmanlarının genişlemesine ve membranın iki yana doğru yayılarak her bir katmanın paranodlara doğru uzanmasına sebep olur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar çoğunlukla statik resimlere dayalı ve çok kısıtlıdır.

Glial hücrelerde taşıma mekanizmalarında aksaklık meydana gelmesi durumunda miyelin membran gerekli maddeleri yeteri kadar alamaz ve miyelin kılıfta bozulmalar ve dolayısıyla miyelin hasarı oluşmaktadır. Pelizaeus-Merzbacher hastalığında glial hücrelerdeki taşıma mekanizması, proteolipid (PLP) proteinin PLP geninin duplikasyonu sonucu hücrede fazla bulunmasından dolayı (negatif yönde)

etkilenir ve miyelin kılıfa yeterli yapıtaşı sağlanamamasından dolayı miyelin kılıf hasar görür ve PMD hastalığı görülür (1, 8–12). Glialarda taşınma mekanizmasının zamansal ve boyutsal/uzaysal şekilde incelenmesi, bize bu hastalığı daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

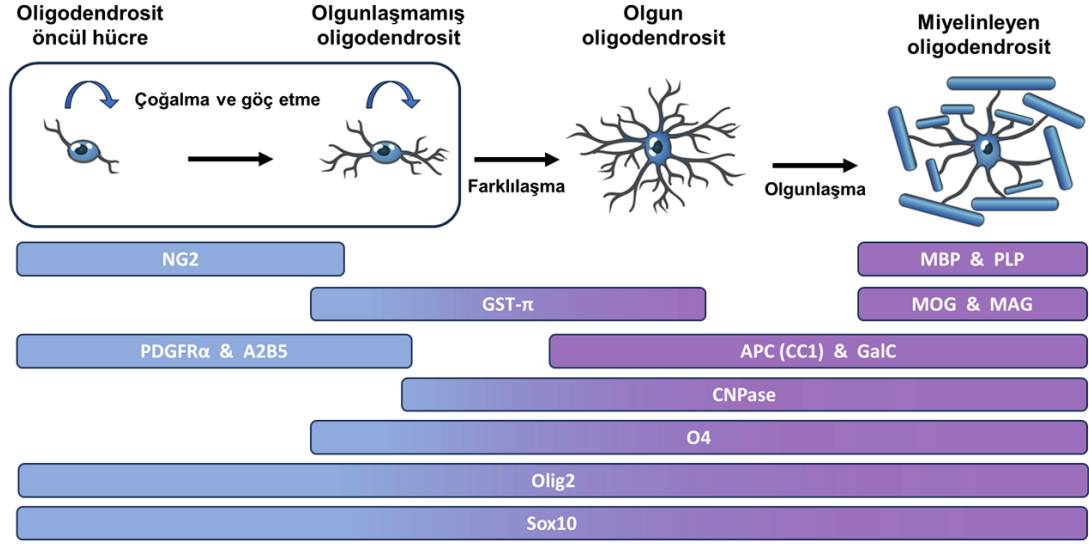
Bu doktora tezinin amacı glial hücrelerdeki dinamik yapının miyelin oluşturma ve miyelin membranın sürekliliğini sağlama sırasındaki durumunu floresan görüntüleme yöntemi ile incelemek, ve miyelin membran bütünlüğünü floresan proteinlere ya da başka zahmetli görüntüleme tekniklerine gereksinim duymadan işaretli ve nispeten daha pratik olan işaretli görüntüleme yöntemi kullanarak görüntüleyebileceğimiz bir görüntüleme tekniği geliştirmek ve demiyelinize ve remiyelinize durumlarda miyelini görüntülemek ve incelemektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Merkezi Sinir Sistemi ve Oligodendrositler

Merkezi Sinir Sistemi, beyin, omurilik, koku ve görme sinirlerini kapsayan, nöronlar ve glial hücrelerden oluşan bir sistemdir (13). Oligodendrosit hücreleri, merkezi sinir sisteminde bulunan, miyelinleyen oligodendrosit evresinde nöron aksonlarını sararak miyelin kılıf üretimini sağlayan glial hücrelerdir. Merkezi sinir sistemindeki bütün oligodendrosit hücreleri, tüm oligodendrosit soyu boyunca ifade edilen Olig2 ve Sox10 transkripsiyon faktörlerinin immünohistokimyasal tespiti ile diğer merkezi sinir sistemi hücrelerinden ayırt edilir (14, 15). Oligodendrosit soyu boyunca hücreler öncül oligodendrositler, olgunlaşmamış oligodendrositler, olgun oligodendrositler ve miyelinleyen oligodendrositler olarak dört evrede bulunur (Şekil 4.1.1) (16). Öncül oligodendrosit hücreleri, olgunlaşmamış ve sessiz halde bulunan, oligodendrositlerin ilk evre hücreleridir. Bu hücreler yetişkin memeli beyinde çoğalma kapasitesini kaybetmemiş, kendini yenileyerek popülasyonu koruyan hücrelerdir (17, 18). Aynı zamanda bu hücreler, yetişkin beyinde öncül hücrelerin üretildiği nörogenik bölgeler olan subventriküler zon ve hipokampüse ek olarak, gri ve beyaz maddeye üniform olarak dağılmış, beyin ve omurilikte çoğalma kapasitesine sahip hücrelerdir (19–21). Bu sessiz hücreler, miyelinleyen oligodendrosit hücrelerin kaybı söz konusu olduğunda ya da değişik koşullarda (e.g. fiziksel egzersiz) çoğalarak ve/veya farklılaşarak miyelinleyen oligodendrositlere dönüşürler (20, 22, 23). Bu dört farklı evredeki hücreler, morfolojik, mitotik ve göç özelliklerine ve ifade ettikleri proteinlere göre ayırt edilirler (Şekil 4.1.1) (24, 25). Öncül oligodendrosit hücre evresinde hücreler spesifik olarak NG2, PDGFR- α ve A2B5 proteinlerini ifade eder (26). Öncül oligodendrositler farklılaşmaya başladıklarında NG2 ifadesi durur ve PDGFR- α ve A2B5 protein ifadeleri azalır. Bu hücreler GST- π , CNPase ve O4 ifade etmeye başlayarak olgun oligodendrosit evresine doğru ilerler, ve aynı zamanda çoğalma kapasitesini kaybeder (19, 21). Olgun oligodendrosit evresinde GST- π ifadesi azalarak GalC ve CC1 proteinlerinin ifadesi başlar. Artık çok uzantılı ve saçaklı görünüme kavuşan olgun oligodendrositler, miyelinleyen oligodendrosit evresine geçerek miyelin kılıfın yapıtaşları olan MBP, MAG, MOG ve PLP proteinlerini üretmeye başlar. Miyelinleyen oligodendrosit evresinde, oligodendrositler

uzantılarıyla nöron aksonlarına uzanarak çok katmanlı olarak sarar ve sitoplazmanın çekilmesiyle kompakt miyelin kılıfı oluşturur.

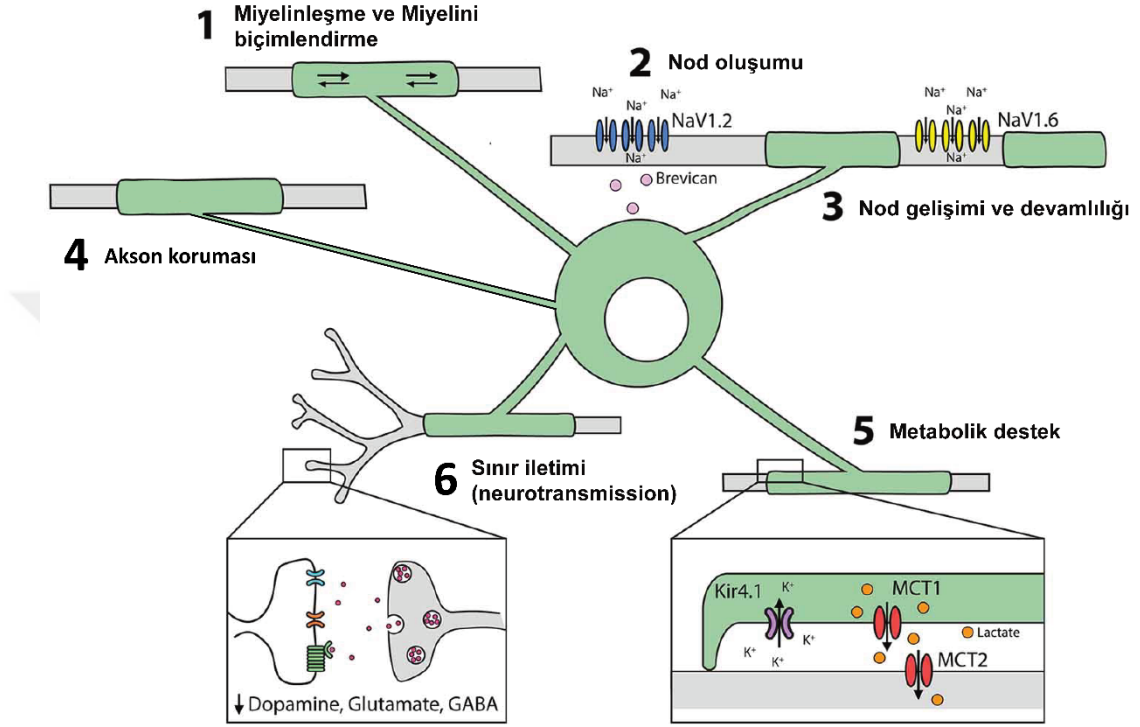


Şekil 4.1.1: Bir oligodendrosit hücresinin farklılaşma evreleri ve her bir evreye özgü ifade edilen proteinlerin gösterilmesi. (Figür Long vd. (2021) ve Kamen vd. (2022)’den uyarlanmıştır (16, 27)).

4.2. Miyelin

Miyelin, aksonların etrafını katmanlar halinde sararak miyelin kılıfını oluşturan, ağırlıklı olarak yağ ve proteinlerden oluşan özelleşmiş hücre zarıdır. Miyelin merkezi sinir sisteminde oligodendrosit hücreleri, periferik sinir sisteminde ise Schwann hücreleri adı verilen özelleşmiş glial hücreleri tarafından üretilir (Şekil 4.2.1) (28–30). Miyelin kılıf, nöron aksonu boyunca miyelinlenmemiş Ranvier nodları arasında kalan geniş yerleri sararak aksonlar etrafında koruyucu ve izole edici bir tabaka oluşturur (Şekil 4.2.1, 1. ve 2. temsil). Bu tabaka, elektriksel iletim için gerekli olan voltaja duyarlı Na^+ kanallarının Ranvier nodlarında toplanmasına neden olur (Şekil 4.2.1, 2. ve 3. temsil). Böylelikle elektriksel iletim/zıplama sadece Ranvier boğumlarında gerçekleşir ve uzun mesafelere uzanan aksonlar üzerinde elektriksel iletim hızlanır (31, 32). Miyelinsiz 1 m/s’den bile küçük olan elektriksel iletim hızı miyelin kılıf sayesinde 50-100 m/s’ye kadar çıkabilir (33). Miyelin kılıf, üzerinde bulunan kanallar sayesinde aksonların sağlığı ve metabolik fonksiyonlarının devamlılığı için gerekli maddeleri sağlar (Şekil 4.2.1, 5. temsil) (34, 35). Merkezi sinir sisteminde bir

oligodendrosit hücresi, birden fazla uzantılarıyla birden çok akson gövdesine uzanarak aksonların miyelin kılıf ile sarılmasını sağlar (36). Diğer taraftan miyelin aksonların üzerini kalın bir tabakayla kapladığı için aksonları immün hücreler ve diğer etkenlerden koruyucu görev yapar (Şekil 4.2.1, 6. temsil) (29).

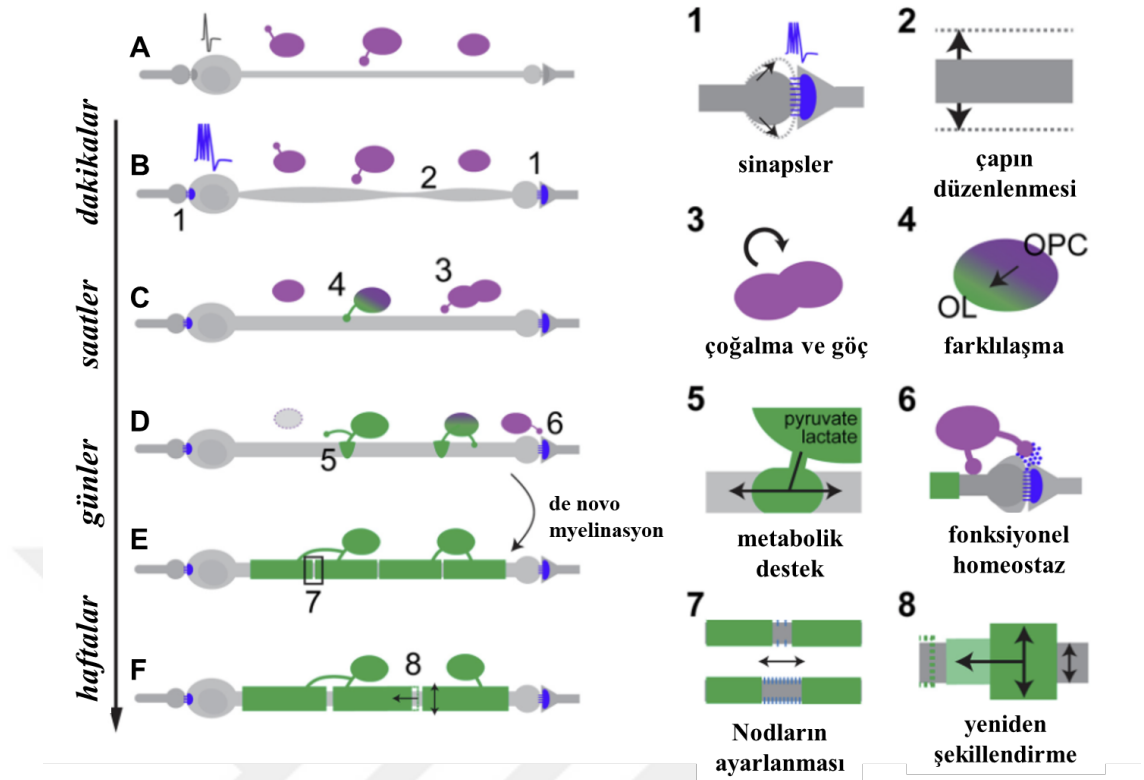


Şekil 4.2.1: Nöron aksonlarının katmanlar halinde oligodendrosit membranı ile sarılmasıyla oluşan miyelin kılıfın görevleri. Detaylar Bölüm 4.2. içerisinde verilmiştir. (Figür Pepper vd. (2018)'den değiştirilerek alınmıştır (37)).

4.2.1. Miyelinin oluşumu

Miyelin kılıf, oligodendrosit hücrelerinin yayılmış, genişlemiş ve miyelin proteinlerince zenginleştirilmiş uzantılarının nöron aksonu üzerinde, tek bir uzantının birden çok katmanlar halinde sarması ve katların kompaktlaşması ile oluşan sıkı bir yapıdır. Merkezi sinir sisteminde bir oligodendrosit birden çok akson üzerinde miyelin kılıf oluşturmak için, 20 ila 60 farklı miyelinleyen uzantı oluşturabilir. Birçok oligodendrosit, uzunluğu 20 μm 'dan 200 μm 'a kadar, 100 kata kadar katmanı olan miyelin kılıfın oluşmasını sağlayabilir (38–40). Aksonlar üzerinde miyelin kılıfın oluşması birden çok biyolojik basamaktan oluşmaktadır: aksonların birbiri ile iletişimi ve kurulan sinapslar sayesinde akson çapının düzenlenmesi (Şekil 4.2.1.1'de 1 ve 2),

miyelini üretecek, aksonlar üzerinde miyelin kılıfı oluşturacak olgun oligodendrositlerin oluşması için, oligodendrosit öncül hücrelerin çoğalması ve gerekli yerlere göç etmesi (Şekil 4.2.1.1'de 3), aksonlardan ve çevredeki hücrelerden gelen sinyallerle miyelinlenecek aksonun ve miyelinlenecek bölgenin tanınması (Şekil 4.2.1.1'de 1, 2 ve 3), oligodendrosit öncül hücrelerden farklılaşarak miyelinleyen olgun oligodendrositlerin oluşması (Şekil 4.2.1.1'de 3), miyelinleyecek uzantının aksonda gezinerek miyelinlenecek yerin belirlenmesi ve miyelin oluşturamayacak olan oligodendrositlerin elimine olması (Şekil 4.2.1.1'de 4), miyelinleyecek uzantının genişleyerek miyelin membranı oluşturması, akson üzerine sarması ve genişlemesi, ve aynı zamanda miyelin membran için gerekli maddelerin miyeline taşınması (Şekil 4.2.1.1'de 5), miyelin membran sitoplazmasının çekilerek kompakt, sıkı miyelin katmanlarının oluşması ve Ranvier nodlarının oluşturulması (Şekil 4.2.1.1'de 7), ve miyelin kılıf modellemesi ile miyelin kılıf uzunluğu ve Ranvier nodlarının sınırlarının belirlenmesi (Şekil 4.2.1.1'de 8) (41). Bunların yanı sıra, oligodendrosit öncül hücreler nöron sinapslerinde fonksiyonel homeostaza destek sağlamaktadır (Şekil 4.2.1.1'de 6) (20, 42). 2015 yılında yayınladıkları makalede Kerman vd., 8 güne kadar sürdürülebilen canlı görüntüleme sayesinde yukarıda anlatılan aşamaların çok dinamik bir süreçte gerçekleştiğini ve oligodendrosit ve aksonun ilk tanıma/dokunma aşamalarında oligodendrosit uzantısının ortamı tarar gibi akson üzerinde gezinerek ara sıra uzantısını geri çekip yeniden kontakt kurduğunu göstermişlerdir.



Şekil 4.2.1.1: Oligodendrosit öncül hücrelerinin miyelinleyen olgun oligodendrositlere farklılaşması ve akson üzerinde miyelin kılıfı oluşturma aşamaları. (Figür Almeida ve Kyons 2017'den modifiye edilerek alınmıştır (43)).

Gelişim boyunca, oligodendrosit öncül hücreleri nörojenik zonlar olan ventriküler/sub-ventriküler zonlardan beyin beyaz maddesine doğru göç ederler. Burada oligodendrosit öncül hücreleri çoğalır ve popülasyon içerisinde orantılı dağılım gösterirler. Oligodendrosit öncül hücreleri final destinasyonlarına göç ettiklerinde, çevreyi anlamak ve ipuçlarını (atraktanlar vs) yakalamak için sürekli uzantılarını ileri-geri atarlar, bu aynı zamanda birbirlerinin alanını kısıtlar ve düzende kalmalarını sağlar (Şekil 4.2.1.1.A-B) (44, 45). Final destinasyonlarındaki oligodendrosit öncül hücre popülasyonunda hücrelerin bir kısmı proliferatif/çoğalma özelliklerini koruyarak öncül hücre olarak kalır, bir kısmı ise oligodendrosit farklılaşma sürecine girerek miyelinleyen oligodendrosit hücrelerine dönüşürler (Şekil 4.2.1.1.C). Bu farklılaşan hücrelerin bir kısmı, miyelinlenecek akson sayısından fazlaca üretilmiş olanlar apoptoza uğrayarak elenir (46). Hedef tarafından salınan, PDGF-A, FGF-2, IGF-1, NT3, CNTF gibi bazı büyüme ve yaşamsal büyüme

faktörlerinin kısıtlanması, bu süreçte bazı oligodendrositlerin elimine olmasında rol oynar (Şekil 4.2.1.1.D) (46, 47). Farklılaşma süreci boyunca oligodendrositler morfolojilerine ve ifade ettikleri moleküler işaretlere göre, Şekil 4.1.1'de de gösterildiği gibi oligodendrosit öncül hücre, olgunlaşmamış oligodendrosit, olgun oligodendrosit ve miyelinleyen oligodendrosit olmak üzere 4 gruba ayrılır (48). Bu soy boyunca oligodendrositlerin farklılaşma hızı, merkezi sinir sisteminde bulundukları yere göre farklılık gösterir (Şekil 4.2.1.1.A-F) (41). Oligodendrositler uzun süre öncül ya da olgunlaşmamış hücre olarak bulunsa da, farklılaşma işareti verildiğinde, bu sürecin hızlı işlediği görülmüştür (41, 49, 50). Diğer taraftan, oligodendrositlerin aksonları miyelinlemeye başlaması ve miyelinleşmenin tamamlanması günlerle başlayıp haftalar süren bir süreçtir (Şekil 4.2.1.1.A-F). Olgun ya da miyelinleyen oligodendrositlerin göç etme/yer değiştirme kapasiteleri oligodendrosit öncül hücrelere göre çok kısıtlı olduğundan, farklılaşmaya başlamadan önce oligodendrosit öncül hücrelerin miyelinlenecek yere göç ettiği düşünülmektedir (Şekil 4.2.1.1.A-D) (41). Miyelinleşme süreci başladığında, PIP3/Akt/mTor and ERK1/2 sinyal yollarının, optimal g-ratio'ya sahip sağlıklı kompakt miyelin kılıf oluşana kadar önemli rolünün olduğu bilinmektedir (51–54).

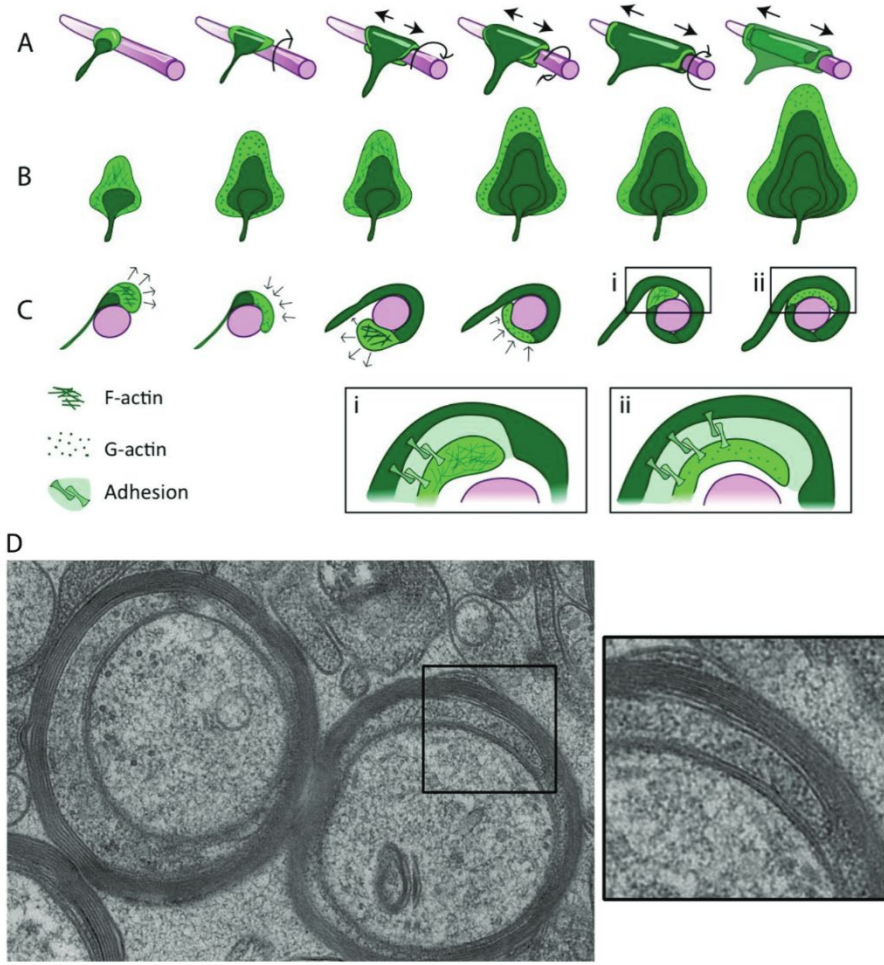
Aksonların miyelinle kaplanmasında önemli basamaklardan biri, miyelinlenecek aksonun tanınması ve seçimidir. Yapılan çalışmalarda, akson çapının genişliğinin miyelinlenecek aksonların belirlenmesinde yeterli olduğu bulunmuştur (55). Farklı çaplardaki polisiten fiberler ile yapılan oligodendrosit kültürlerinde, 400 nm çapından büyük fiberlerin oligodendrosit hücreleri tarafından miyelinle sarıldığı gözlemlenmiştir. Bu da Schwann hücrelerinin aksine, oligodendrosit hücrelerinin aksonlarda miyelin kılıf üretimi için adhezyon moleküllerine veya aksonlardan gelen sinyallere ihtiyaç duymadıklarını, akson çapının yeterli olduğunu göstermektedir (55–57). Merkezi sinir sisteminde normal koşullarda 200-250 nm çapından büyük aksonlar miyelin kılıf ile sarılır (58). Yapılan çalışmalarda, Fyn (59), PTEN, BDNF (58) gibi aksonlara ait moleküllerin, -özellikle küçük çaplı- aksonların miyelinlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu moleküllerin yanında, miyelinlenecek aksonun çapına bağlı olarak ters orantılı artan eğrilik derecesinin küçük çaplı aksonların miyelinlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Bir miyelin membran, küçük çaplı bir aksonu saracağı zaman daha çok bükülmesi gerekirken, büyük çaplı aksonun sarılması sırasında daha

az bir bükülme derecesi yeterli olur. Bu düşüncelere ve literatürdeki verilere dayanarak, miyelinleşme başladığında, miyelinleşme için büyük çaplı aksonların daha tercih edilebilir olduğu söylenebilir.

Yıllardır yapılan araştırmalarda, miyelin kılıfın akson etrafında sarılma tarzı ile ilgili halı yuvarlama, sıvı kruvasan gibi farklı hipotezler ve modeller öne sürülmüştür. Bu modellerde oligodendrosit uzantısı miyelin kılıfın oluşmasında öncü olarak görev alır. **Halı yuvarlama modelinde**, oligodendrosit uzantısı aksonu tanıdıktan sonra akson boyunca genişleyerek bir bütün internodu oluşturur. Bu genişlemiş uzantı akson ya da fiber etrafında bir tam turu tamamladıktan sonra, bu uzantının uç kısmı, miyelin kılıf ile akson arasına girerek büyümeye ve miyelin kılıfı oluşturup halı yuvarlar gibi aksonu sarmaya içten devam eder (3). Turlar halinde devam eden bu süreç sonunda internod boyunca uzanan katmanlı miyelin kılıf oluşur (3). Buna benzer şekilde aksonun etrafında sarılan, fakat oligodendrosit ucunun aksonu tanıyıp, sarma ve genişleme evrelerinin bir arada görüldüğü modele ise **sıvı kruvasan modeli** adı verilmiştir (3, 7). Bir başka model olan **yılan modelinde**, oligodendrosit uzantısı aksonu tanıdıktan sonra spiraller şeklinde ya da yılanın ağaç dalına dolanması gibi oligodendrosit uzantısı aksone dolanır. Sonrasında her bir spiral, genişleyerek her bir miyelin katmanını oluşturur ve her bir katman internod boyunca genişleyerek miyelin kılıfı oluşturur (4–6, 60, 61). Tanımlanan bir diğer model olan **yo-yo modelinde** ise, oligodendrosit ucunun aksone ilk dokunması ile oluşan, ve her bir katman döndüğünde bitiş yerlerinde yenisi oluşturulan bağ, katmanların genişlemesi sırasında ve miyelinizasyon ve miyelin kılıf tamamlanana kadar korunur (4). Miyelin katmanlarının bitiş ile oluşturulan Ranvier nodlarında, miyelin katmanlarının aksone tutunduğu yerlerde görülen bu bağ oluşumunda oligodendrosit ve miyelin membranda bulunan NF155 proteini ile aksonlarda bulunan CASPR ve Contactin proteinleri rol oynar. 2015 yılında Kerman vd. tarafından **survey-anchor-wrap-expand (SARAPE)** adı verilen yeni bir model ortaya konmuştur. Oligodendrosit ve nöron ortak kültürlerinin uzun süreli canlı görüntüleme ile görüntülenmesi sonrasında öne sürülen bu modelde, Ioannidiou vd. (2012)'de de anlatıldığı gibi oligodendrosit uzantısının önce aksonu temas etme ve geri çekme davranışıyla bir süre taradığı gözlemlenmiş, sonrasında uzantının uç kısmının aksone temas halinde kalarak uzantının geri kalan kısmının aksonu sardığı gözlemlenmiştir. Bir güne yakın bu sarmallar sabit kaldıktan

sonra, internod boyunca genişleyerek miyelin katmanlarını ve sonunda miyelin kılıfı oluşturmuştur (62). Oligodendrosit uzantısının genişlemeden önce aksona dolanması ve sonrasında sarmalların genişleyerek miyelin katmanlarını oluşturması her ne kadar yılan modeline benzese de, yılan gibi oligodendrositin uzantısının uç kısmının akson etrafında dolanarak sarıldığı gözlemlenmemiştir. Aksine, uzantının ucunun temastan sonra sabit kaldığı, Pedraza vd'nin (2009) öne sürdüğü yo-yo modelini destekler biçimdedir.

Yapılan çalışmalarda, miyelin kılıfın uzantının uç kısmından büyümesinde, aktin polimerizasyonu ve depolimerizasyonun aktif rol oynadığı görülmüştür (63, 64). Önce aktin polimerizasyonu ile miyelin kılıfın iç ucu aksona tutunmadan büyür. Aktin depolarizasyonu ile, bu büyüyen membran üzerindeki baskı azalır ve böylece membran büyümesi gerçekleşir. Birbirini takip eden bu olaylarla, miyelin membran kat kat içeriden devamlı sarılır. Miyelin katmanları kendi kat aralarında moleküller ile birbirine tutunarak sıkı miyelin kılıfı oluşturur. Yapılan çalışmalar sonucunda, miyelin kılıfın büyümesinde ve sarılmasında öncü görevi olan ucun herhangi bir yere tutunma gereksinimi olmadığı ve sinyale ihtiyaç duymadığı için aksonları veya hazır fiberleri kolaylıkla sardığı düşünülmektedir.



Şekil 4.2.1.2: Oligodendrosit uzantısının aksonu sararak miyelin membran oluşturma aşamaları ve kompakt miyelin kılıf kesiti görüntüsü. Figür Klingseisen ve Lyons 2018'den alınmıştır (65).

4.2.2. Taşınma mekanizmasının incelenmesi

- Glycosylphosphatidylinositol (GPI) çapaları, hücre membranında, lipidlere bağlanan bir çapadır. Birçok membran proteini GPI çapasına bağlanarak hücre membranı yüzeyinde lokalize olur. GPI çapaları, proteinlere post-translasyonel modifikasyon ile eklenir. İnsanlarda birçok fonksiyonda görev yapan yaklaşık 150'ye yakın GPI çapa ile membrana bağlı protein bulunmaktadır. Bu proteinler daha çok, reseptör, hücreler arası bağ molekülleri, enzim, taşıyıcı ya da proteaz inhibitörü olarak görev almaktadırlar (66).

- GPI çapalarının proteinlerle ve lipid sallarıyla bağlanması endoplazmik retikulumda gerçekleşmektedir. GPI çapaları proteinlerin karboksil sonlarına bağlanmaktadır. Proteine bağlı GPI çapaları, endoplazmik retikulumdan golgiye geçerek burada fatty acyl grupları modifiye edilir. Bu modifikasyon, GPI çapaların lipid sallarıyla olan bağlarında önemli rol oynar (66).

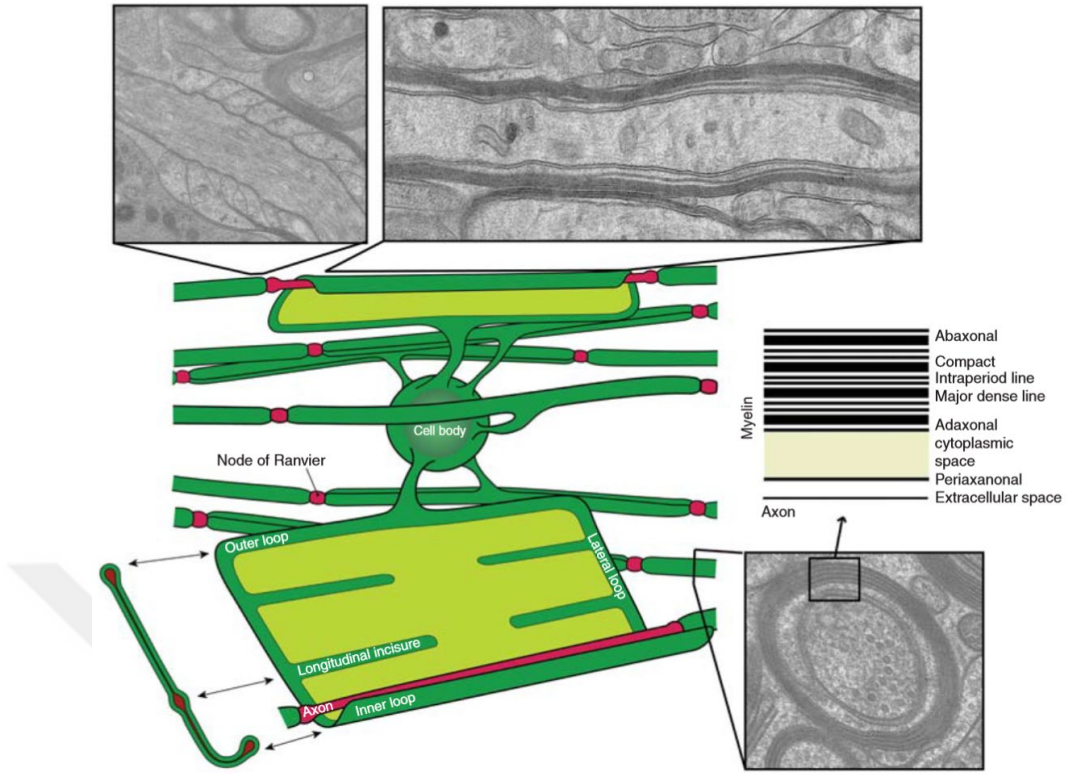
Veziküler Somatitis Virüs G Glikoproteini (VSVG) bir transmembran proteinidir. Asıl görevi viral parçacıkların yüzey kaplamasıdır. Hücre içerisinde transmembran proteini olarak görev yapmakta, sentezlendikten sonra veziküler ya da tübüler taşıyıcılarla membrana taşınmaktadır (67–69). Yapılan araştırmalarda VSVG'nin trans-Golgi aşamasında proteinlerin ayrılmasında, salınmasında ve organeller arasındaki trafiğinde rol aldığı gösterilmiştir (70). Geçmişte yapılan çalışmalarda, membran transportu veziküler somatitis virüs G glikoproteini (VSV-G) kullanarak elektron mikroskobu ile gözlemlenmiş, kargonun oligodendrosit membranına miyelinizasyonun evrelerine göre farklı yerlerden eklendiği gösterilmiştir. Fakat, miyelin oluşumu tamamlanmış 60 günlük farede ise büyük oranda miyelin membranının dış ucundan eklendiği gözlemlenmiştir (3). Miyelin membran oluşum süresince yapılan incelemeler, gözlemler büyük oranda miyelin membrana gelen veziküllerin nasıl eklendiği üzerine olup, veziküllerin taşınma hızı açısından kayda değer bir çalışmaya denk gelinmemiştir.

4.2.3. Miyelinin yapısı

Miyelinleme aşamasındaki oligodendrosit hücreleri, oluşturdıkları miyelin yapısının bütünlüğünün ve sağlığının korunması ve devamlılığının sağlanması için kompakt miyelin katmanları arasındaki/içindeki kanallardan sürekli olarak miyelinin yapıtaşı maddelerinin taşınmasını sağlar (34). Bu maddelerin yeterli miktarda sağlanması ve gerekli hızda taşınması miyelinin devamlılığı için önemlidir. Oligodendrositlerin farklı hücresel kompartmanlarında üretilen bu maddeler, çeşitli taşıma mekanizmaları ile gelişen miyelin kılıfa taşınır. Hücrede yeni üretilen lipid ve proteinlerin işaretlenmesi ile yapılan gözlemlerde lipid ve proteinlerin ilk olarak miyelin kılıfın dış katmanına ulaştıkları, sonrasında kanallar sayesinde miyelin kılıfın iç katmanlarına aktarıldığı gözlemlenmiştir (41, 71, 72). Bu taşıma mekanizmasına ek olarak MBP proteinini kodlayan mRNA'lar sitoplazmik granüller içerisinde miyeline taşınmakta ve kanallar içerisinde proteine dönüşmektedir (41, 73–77). MBP proteini, miyelinin kompaktlaşarak sıkı miyelin kılıf oluşturmada rol oynar. MBP proteini miyelin kılıfın büyümekte olan içerideki uç kısmında mRNA'dan sentezleniyor olsa da, bu alanda miyelin kompaktlaşması görülmez; miyelin kılıfın kompaktlaşması kılıfın dış katmanlarından iç katmanlarına doğru gerçekleşir (78). Miyelinin iç katmanlarında, MBP ifadesine rağmen miyelin kompaktlaşmasını engelleyen CNP proteini bulunur. Bu bölgelerde CNP ve MBP protein ifadelerinin dengede olmasıyla, miyelinleşme süresince kompakt miyelin kılıf oluşturma hızının kontrol edildiği düşünülmektedir (41). Kompaktlaşan miyelin katmanları arasında CNP proteinlerinin varlığıyla miyelin katmanlarının itilmesi sayesinde miyelin katmanları arasında kompaktlaşmamış sitoplazmik bölgeler kalmaktadır ve bu bölgeler miyelinik kanalları oluşturur (79). Myelinik kanallar, hem miyelin katmanları arasındaki madde alışverişini sağlar, hem de oligodendrositlerin aksonun sağlığını desteklemesi için gerekli maddelerin taşınmasını sağlar (79).

Olgun oligodendrositlerde karşılıklı membranlara tutunmuş MBP monomerlerinin polimerize olmaya başlaması ile başlayan miyelin kılıf oluşma sürecinde, sitoplazmayla beraber sitoplazmada ve membranda bulunan fakat miyelin kılıf yapısında kullanılmayan diğer proteinler itirilerek, miyelin kılıfın kompaktlaşması sağlanır (41, 80). Bu süreçte MBP proteini polimerleşerek hem proteinlerin itirilmesini sağlar, hem de sitoplazmik domainleri büyük olan proteinlerin

gelişini engelleyerek seçici bir bariyer oluşturur (41, 81). Böylelikle büyük oranı lipidlerden oluşan, lipidce zengin proteince fakir miyelin kılıf oluşmaktadır. Olgun oligodendrositler, miyelinleyen oligodendrosite dönüşürken, aynı zamanda lipid kompozisyonunda da değişimler gerçekleşir. Bu dönüşüm sırasında, hücreler arasında birbirini itmeyi sağlayan oligosakkaritlerin sayısının azalması, önceden birbirini itici olan hücre membran katmanlarının aksonların miyelinlenmesi aşamasında, birbirine yapışan miyelin katmanlarının oluşmasını sağlıyor olabilir (41). Miyelin katmanlarının kompakt ve sıkı hale gelmesi ile miyelin kılıf oluşur. Bir akson etrafını saran kompakt miyeline dik kesit olarak incelediğimizde, ortada dairesel ya da eliptik şekilde akson boşluğu, akson zarı ve dışında periaksonal bölge (periaxonal extracellular space) adı verilen akson ve miyelin kılıf arasındaki boşluk, adaksonal sitoplazmik bölge (adaxonal cytoplasmic space) ve devamında bu aksonu saran sıralı ve tekrarlayan miyelin katmanları görülür. Kompakt miyelin katmanlarında sitoplazmadaki proteinler elektron mikroskobunda koyu renkte görülmekte ve ana koyu katman (major dense line, MDL) şeklinde adlandırılmaktadır (Şekil 4.2.3.1) (41). Bu protein katmanlarının arasını oluşturan, membran, membranlar arası boşluk ve ikinci membrandan oluşan, elektron mikroskobunda daha açık renkli görülen çizgi ise orta katman (intraperiod line, IPL) olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.2.3.1).



Şekil 4.2.3.1: Miyelinli bir aksonda bulunan akso-glial yapılar. Figür Simons ve Nave 2016'dan alınmıştır (41).

Miyelin yoğun bulunduğu bölgeler açısından kolay elde edilebilir olması nedeniyle detaylı çalışılmış memeli membranlarından biridir. Miyelin kılıf, diğer hücre zarları gibi su, lipidler ve proteinler olmak üzere üç temel yapıtaşlarından oluşur. Diğer hücre membranlarından farklı olarak, miyelin membrandaki bu yapıtaşlarının oranı farklılık gösterir. Miyelin membran yüksek oranda lipid içeren (%70-%85), düşük oranda protein içeren (%15-%30) bir yapıda bulunur; diğer hücre zarlarında ise bu oran %50-%50'dir (13, 82). Miyelin membrandaki yüksek lipid oranı, miyelinin katman katman sarılmasıyla birlikte çok iyi bir izole edici yapı oluşturur, bu yapı aynı zamanda iyonların geçişini engelleyerek aksonlar içindeki sinyal iletiminin hızlı olmasını sağlar (13, 83). Bu nedenle miyelin yapıtaşlarının oranındaki değişiklikler, miyelin katmanlarının bütünlüğünün bozulmasına, akson etrafındaki miyelin kılıfın zarar görmesine sebep olmaktadır (13, 84).

4.3. Miyelin Yapısındaki Önemli Lipitler

Miyelin membranı, aynı zamanda içerdiği lipid çeşitlerinin oranlarının farklı olmasıyla da diğer membran çeşitlerinden farklılık gösterir. Miyelin membranda, %40 oranında kolesterol, %40 oranında fosfolipitler, %20 oranında da glikolipitler bulunur. Bu oran birçok hücrenin membranda sırasıyla %25, %65 ve %10 oranında bulunmaktadır (82). Kompakt miyelin kılıf oluşumunda miyelin membranda yüksek oranda bulunan kolesterol ve fosfolipitlerin katkısı büyüktür (13), ve miyelin membranın MBP proteini ile olan etkileşiminde önemli yere sahiptir. Yüksek kolesterol oranı miyelin membranın MBP proteini ile olan termodinamik etkileşimini destekleyerek miyelin membranın kompaktlaşmasında ve termodinamik stabilitesinin kurulmasında rol oynar (85). Farelerde yapılan deneylerde, miyelin kılıfın sürekli olarak beslendiği ve şekillendirildiği görülmüş, membrandaki lipid dönüşümünün değişen hızlarla hayat boyu devam ettiği gözlemlenmiştir (86). İnsan hayatı boyunca, miyelin lipidlerinin sentezi, depolanması ve hücre içindeki lipid taşınması, miyelin kılıfın sağlığı ve devamlılığı için çok önemlidir (82).

4.3.1. Kolesterol

Kolesterol yapısında bulunan hidrokarbon halkaları, neredeyse düz sert bir yapıya sahiptir. Kolesterolün yapısından dolayı, miyelin membranda bulunan diğer lipid ve proteinlerle olan etkileşmesiyle miyelin membranın daha yoğun olmasına neden olur. Kolesterol, suyun, gazların ve nötr küçük moleküllerin miyelin membrandan geçişinin azalmasını sağlar (13, 87). Membranda kolesterol oranının artması, membran hidrofobikliğin artmasını ve membranın kompaktlaşmasını sağlar. Kolesterol sentezinin bozulduğu ya da sentezin olmadığı durumlarda akson miyelinlenmesinde azalma görülmüştür (88). Benzer şekilde, kolesterol sentezinin hızlı olduğu durumlarda miyelin kılıfının onarımının daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (89).

4.3.2. Galaktosilseramid

Galaktosilseramid (GalC), galaktosulfatit (sGalC) ile birlikte miyelin membranda bol bulunan glikolipitleri oluştururlar. Glikolipitler, fosfolipitler ve kolesterol ile etkileşerek miyelin membranın sıkı ve kompakt yapıya dönüşmesini destekler. Miyelin membranda fosfolipitler lipid membranın iç kısmına bakarken, glikolipitler lipid membranın dış kısmına bakar; miyelin membranda iki lipid çeşidi

asimetrik dağılım gösterir (90). Bu lipitler arasında bulunan hidrojen bağları mikro lipit sallarının oluşmasını destekler. Bu lipit salları, bulunduğu miyelin membranının lipitlerinin hareketini kısıtlayarak, miyelin membranının daha stabil, daha katı ve sıvı/katı membran fazı dönüşümlerine karşı daha dayanıklı olmasını sağlar. Böylelikle miyelin membranının sıvı/katı faz dönüşümleri için gerekli sıcaklığın, vücut sıcaklığından daha yüksek olmasına sebep olur (13).

Kolesterole benzer şekilde miyelin membrandaki glikolipit miktarının azalması, miyelin membranının kompaktlaşmasının bozulmasına, membran geçirgenliğinin artmasına ve aksonlardaki sinyal iletiminin bozulmasına neden olur (13).

4.3.3. Fosfolipitler

Fosfolipitler, miyelin membranındaki lipidlerin %40'ını oluştururlar. Fosfolipitlerin iki ana alt grupları olan sphingomiyelin ve phosphatidylcholinler, toplam fosfolipitlerin %50'sini oluştururlar. Fosfolipitlerde bulunan 14-24 karbon atomu uzunluğunda olabilen hidrofobik kuyruklar, diğer kuyruklarla etkileşimin artmasına ve sıkı miyelin katmanının oluşturulmasına katkı sağlar. Aynı zamanda lipid membranın mobilitesinin azalmasına sağlar ve iyonlar için daha az geçirgen bir yapı oluşturarak aksonların izolasyonuna katkı sağlarlar (84, 91).

Plazmalogenler bir kısmı peroksizomlarda sentezlenen, miyelinde bol bulunan fosfolipitlerdendir. Miyelince zengin beyaz maddede fosfolipitlerin %30'unu oluştururken, gri maddede %20'sini oluştururlar (92). Plazmalogenler sahip oldukları grup başına göre choline ve ethanolamine olarak ikiye ayrılırlar (82). Plazmalogenler temel olarak phosphatidylethanolamine fosfolipitleri (PE) olarak bulunurlar ve miyelindeki PE'lerin %80'i plazmalogenler tarafından oluşturulmaktadır (92). Plazmalogen seviyeleri doğumdan sonra miyelinleşme ile paralel olarak artar. Plazmalogenlerin, miyelin sağlamlığının korunmasına olan katkılarının yanında, yaşlanmaya bağlı olarak gelişen oksidatif strese karşı da miyelini koruyabileceği gösterilmiştir (93). İnsanlarda plazmalogen seviyelerinin 30-40 yaşına kadar arttığı, 70 yaşından sonra ise ciddi oranda azaldığı bilinmektedir (94).

4.4. Miyelin Yapısındaki Önemli Proteinler

4.4.1. Myelin bazik proteini (MBP)

MBP proteini merkezi sinir sistemi miyelin membranında yüksek oranda bulunan proteinlerden ikincisidir ve protein oranının %30'unu oluşturur. Bu oran periferik sinir sisteminde %5-%18'ini oluşturmaktadır (95). MBP proteini sitoplazmiktir ve en önemli temel görevlerinden biri, miyelin membran oluşması sırasında sitoplazmik membranları birbirine doğru çekerek yakınlaşmalarını sağlar (96) ve kompakt miyelindeki major yoğun çizginin oluşmasına neden olur (13). Oligodendosit uzantıları olan bu membranlar negatif yükle yüklüdür ve bu negatif yüklü membranların MBP üzerinde bulunan pozitif yüklü lysine ve arginine gruplarına bağlanmasıyla sitoplazmik boşluğun maksimum derecede azalması ve membranların birbirlerine büyük kuvvetle yakınlaşması gerçekleşir (13, 97). Miyelin oluşumu sırasında gerçekleşen sitoplazmanın da uzaklaştırılmasını kapsayan bu “squeeze out” durumunda rol oynayan MBP proteini aynı zamanda seçici bir bariyer görevi de görerek birçok sitoplazmik proteinin ve membran proteinlerinin miyelin kılıfa sızmasını engeller (80). Normalde membran proteini olan MAG ve CNP gibi olgun oligodendrosit proteinleri, kompakt miyelin oluşma aşamasında membranlar MBP proteini sayesinde yakınlaşırken, MAG ve CNP proteinleri MBP proteini sayesinde miyelin membrandan uzaklaştırılmakta, böylelikle kompakt miyelin kılıfında bulunmamaktadır (80).

4.4.2. Proteolipid proteini (PLP)

Proteolipid proteini, merkezi sinir sisteminde miyelin proteinleri arasında miyelin kılıfta en çok bulunan proteindir (%38), fakat periferik sinir sisteminde ise çok az miktarda görülmektedir (98). PLP proteini, N- ve C- termini bölgeleri sitoplazmaya bakan, 4 transmembran domaininden oluşan, yüksek oranda korunmuş hidrofobik bir membran proteindir. PLP proteini 30 kDa olan 277 aminoasitten oluşan büyük izoform ve 35 aminoasidin çıkmasıyla oluşan 26 kDa olan 242 aminoasitten oluşan PLP/DM20 olarak isimlendirilen kısa izoform olmak üzere literatürde iki izoform halinde bulunmaktadır (99).

PLP proteininin, miyelin membranının kompaktlaşması sırasında membranların birbirine yakınlaşmasında önemli rolü vardır. Transmembran proteini olması dolayısıyla, miyelin membranının bütünlüğünün sağlanmasında PLP proteininin

oranının yüksek olması önemli yer tutar. PLP miktarındaki %50 azalmanın miyelin yapısını ve aksonal patolojiyi bozduğu gösterilmiştir (13, 100). PLP proteinindeki silinme (null), duplikasyon ya da noktasal mutasyonlar sonucunda, miyelin kılıfa yeterli miktarda sağlıklı PLP proteini gidemez ve hipomiyelinasyon kaynaklı nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkar. Bu hastalıklara örnek olarak Pelizaeus-Merzbacher Hastalığı ve spastic paraplegia 2 hastalığı gösterilebilir (13, 101).

4.5. Miyelin Hastalıkları

4.5.1. Multipl skleroz

Multipl Skleroz (MS) hastalığı merkezi sinir sisteminde miyelin kaybına bağlı olarak ortaya çıkan en önemli hastalıklardan biridir. Kronik, immün-hücreler tarafından indüklenebilen, ya da oligodendrositlerde gerçekleşecek bozukluklardan kaynaklanabilecek demiyelinizasyon sonucunda ortaya çıkabilir (102). MS hastalığı dünyada 2.5 milyondan fazla insanı etkilemekte, hem genç yaşlarda, hem ileriki yaşlarda da görülebilmektedir (103–105). MS hastalığı inflamasyon, demiyelinizasyon plakları ve aksonal hasarla tanımlanmaktadır (102). Miyelin kılıf, hasar aldığı durumlarda remiyelinizasyon denilen süreçle geri onarılmaktadır, fakat bu onarım ilerleyen hastalık durumuna bağlı olarak zamanla zayıflamakta ve büyük oranda miyelin kaybı görülmeye başlanılmaktadır (106). MS durumunda, erken safhalarda miyelin onarımı başarılı bir şekilde gerçekleşip, hastalığın durdurulması başarılı olsa da, hastalık ilerleyen safhalarda miyelin kaybı geri döndürülemez hale gelmekte ve MS hastalığının ilerleyen safhaları görülmektedir (107).

4.5.2. Pelizeaus merzbacher hastalığı

Glial hücrelerde taşıma mekanizmalarında aksaklık meydana gelmesi durumunda miyelin membran gerekli maddeleri yeteri kadar alamaz ve miyelin kılıfta bozulmalar ve dolayısıyla miyelin hasarı oluşmaktadır. Pelizaeus-Merzbacher hastalığında (PMD) glial hücrelerdeki taşıma mekanizması, proteolipid (PLP) proteinin PLP geninin duplikasyonu sonucu hücrede fazla bulunmasından dolayı (negatif yönde) etkilenir ve miyelin kılıfa yeterli yapıtaşları sağlanamamasından dolayı miyelin kılıf hasar görür ve PMD hastalığı görülür (1, 8–12).

PMD konnatal ve klasik form olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (108). Klasik formda hastalar ilk yıllarında psikomotor gelişiminde aksaklık gösterirken takip eden

on yıl içerisinde nispeten daha yavaş bir hastalık seyri gösterirler. Klasik formun aksine konnatal formda hastalar doğuştan aksak psikomotor gelişime sahiptirler ve çeşitli sinirsel bozukluklarla birlikte ilerleyici bir hastalık gösterirler. Bu hastalarda sıklıkla görülen *PLP1* geni duplikasyonu, PLP proteinin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. Artan PLP, oligodendrosit gövdesinde birikerek miyelin membranıyla ilişkili protein ve lipidlerin oranını bozmaktadır (1, 11) Normal durumda ER/Golgi sisteminden miyelin membranına taşınan PLP için endozom-lizozom sistemi bir saklama havuzu görevi görür. Miyelinizasyonu kontrol eden sinyallerin etkisi altında bu havuzdan PLP ve onunla birlikte lipid salları miyeline taşınırlar. Hastalık durumunda artan PLP protein seviyesi bu taşınmayı aksatmaktadır. PLP, endozom-lizozom sisteminde birikerek buradan miyelin membranına taşınan kargolarda tıkanıklığa yol açmaktadır. Biriken proteinler proteozom ve otofajik vakuoller gibi yıkım merkezlerine taşınmaya başlar. Miyelin membranına taşınması gereken kolesterol ve diğer lipidler hedeflerine ulaşamazlar (1, 11, 109). Sonuç olarak, miyelin membranının lipid ve protein bileşimi doğru stokiometride olmaz; proteinlerin membrandaki dağılımları etkilenir, miyelinin kompaktlaşması aksar; hücre içi membran sisteminde biriken proteinler katlanmamış protein cevabını (unfolded protein response; UPS) tetikleyebilir ve hatta metabolizması bozulan oligodendrosit apoptoza uğrayabilir. Benzer olarak, PLP'nin ekstraselüler ve transmembran bölgelerindeki nokta mutasyonları proteinin doğru katlanmasını ve/veya taşınmasını önleyerek PLP'nin hücre-içi transport sisteminde birikmesine neden olarak PMD ile sonuçlanmaktadır (12, 108).

4.6. Miyelin Görüntüleme Yöntemleri

4.6.1. Immunflorasan boyamalar

Miyelin görüntülemesi, miyelin araştırmalarında en önemli aşamalardan biridir. Miyelin spesifik proteinlere karşı yapılan immün boyamada, miyelin bazik proteinini (MBP), proteolipid proteinini (PLP) ve miyelin oligodendrosit glikoproteinini (MOG) gibi proteinlerin tespiti yoluyla miyelin kılıf ve miyelin üreten oligodendrositler görselleştirilmekte, miyelin hastalıkları, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon incelenebilmektedir (110–112). Protein spesifik antikorlara bağlı veya protein spesifik antikorları tanıyan ikincil antikorlara bağlı floroforlar yardımıyla merkezi sinir

sistemindeki (MSS) miyelinli aksonların ve miyelin açısından zengin korpus kallosum gibi beyaz madde yapılar görselleştirilebilmektedir (111, 112). İmmün boyama çok başarılı, direkt sonuç veren spesifik bir tekniktir, ancak etkinliği, fiksasyon, örnek kalınlığı, geçirgenlik ve protein lokalizasyonu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Geçirgenlik veya demiyelinizasyon, lipid açısından zengin miyelin kılıfını bozarak gizli miyelin proteinlerini ortaya çıkardığı için, kontrol ve hastalık modellerinde immün boyama ile miyelinizasyonun kantitatif analizi her zaman güvenilir olmamıştır (28). Ayrıca, immün boyamanın sağladığı bilgiler, optik mikroskopi sistemlerinin kırınım sınırı ile sınırlıdır ve miyelin kalınlığı gibi daha ince detaylar çözölememiştir. Araştırmacılar, bu sınırlamaları, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüleme veya etiketsiz görüntüleme ile aşmışlardır.

4.6.2. İşaretsiz (label-free) miyelin görüntüleme yöntemleri

Gerek hazırlık aşamalarında miyelinde olabilecek morfolojik değişimleri bertaraf etmek için, gerek in vivo ya da in vitro canlı görüntülemeye uygun imkan sağlaması için, gerekse uzun hazırlık aşamaları ve deneysel prosedürler gerektirmediği için son zamanlarda florasan işaretleme gerektirmeyen işaretsiz (label-free) görüntüleme yöntemleri ile sıklıkla karşılaşilmektedir. Bu optik görüntüleme yöntemleri, biyolojik örneklerin özgü kırılma indislerine veya kendilerine özgü biyolojik niteliklere dayanarak geliştirilmiştir. Üçüncül Harmonik Mikroskobu (THG), Coherent Anti Stokes Raman Microscopy (CARS), SPeRe, 3D Holotomografi Mikroskobu bu işaretsiz görüntüleme yöntemlerine birer örnektir. Bu yöntemler, yapısal kontrast özelliklerinden ötürü işaretsiz görüntülemeye elverişli bir örnek olması açısından miyelini görüntülemekte uygulanmıştır (113).

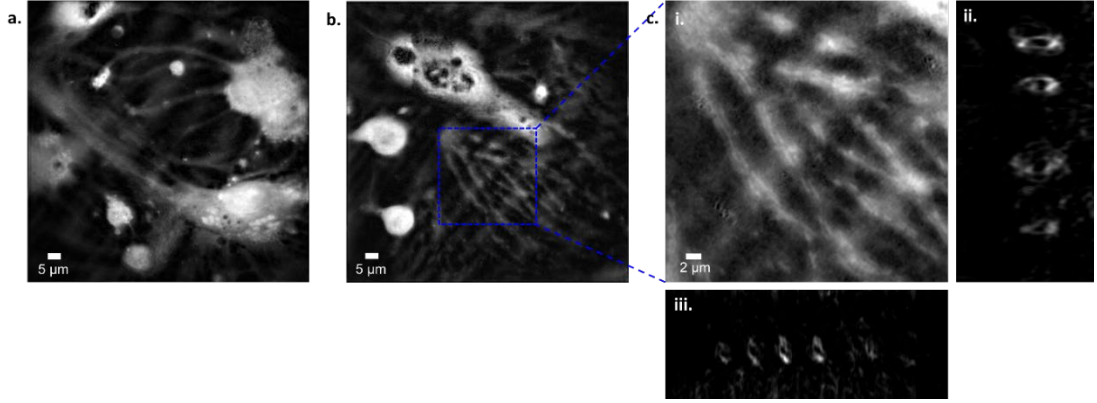
4.6.2.1. 3D Holotomografik görüntüleme

Bir dokunun ya da hücrenin holotomografik görüntülenmesi, yapısını oluşturan maddelerin kırılma indislerini temel alır. Her bir yapı, farklı kırılma indisine sahiptir. Böylelikle hücre içi organeller, biyolojik olaylar (mitoz, fagositoz vs) hiçbir işaretleme yapılmadan görüntülenebilmektedir. Lazer ışığının örneği tomografik olarak taraması prensibine dayanarak çalışan mekanizma, aynı zamanda üç boyutlu görüntüleme imkânı sunar. Kırılma indisi, yapının içsel optik özelliğini barındırdığından ve sayısalılık içerdiğinden, yapılan görüntülemelerin niceliksel analizine imkân sağlar

(114). Herhangi bir fototoksik yönü olmadığından, uzun süreli canlı görüntülemelerde rahatlıkla kullanılabilir.

Aksonların etrafında bulunan miyelin membranı, içerdiği yüksek lipid kompozisyonu ve kompakt haldeyken yapısında belli yerlerde yoğunlaşan miyelin proteinleri sayesinde farklı kırılma indisi profiline sahiptir. Miyelin tabakası ve sitoplazmadan oluşan akson ile miyelinli bir akson holotomografik görüntüleme için çok uygun bir biyolojik bir örnektir. Holotomografik görüntülemenin temel konsepti ve miyelin görüntülemedeki kullanımı Şekil 4.6.2.1.1.a'da gösterilmiştir. Farklı yönlerden açısal olarak lazer ışığıyla taranan örneğin karmaşık dalga saçılması holografik bir düzenek ile kameraya kaydedilmektedir. Farklı aydınlatma açılarından elde edilen saçılmalar 3 boyutlu Fourier uzayında sentezlenir ve örneğin kırılma indisi dağılımı 3 boyutlu bir hacim olarak elde edilir. Ortaya çıkan kırılma indisi hacminin çözünürlüğü nihayetinde sentezlenen 3D apertürün kırınım sınırı ile sınırlıdır (115). Bu nedenle, çözünürlük sınırının altındaki herhangi bir özelliğin görüntüsü bulanıklık yaratmaktadır.

Bir miyelinli aksone ait kesitte bulunan yapıların kırılma indisleri Şekil 4.6.2.1.1.b'de verilmiştir. Bir oligodendrositin miyelinsiz bir aksonu periyodik olarak sarmaya başlamasıyla miyelinleşme süreci başlar. Miyelini oluşturan yapı taşlarının katmanlarda bulunduğu yoğunluğa göre periyodik katmanlar membran (m), sitozolik proteinler (c), membran (m) ve hücre dışı alan (e) bileşenlerinden oluşur (Şekil 4.6.2.1.1.b). Bu periyodik yapı, aksonun membranından önce bir periaxonal alan (p) ile sınırlandırılmıştır. Bu bileşenlerin her biri, literatürde iyi tanımlanmış belirgin kalınlığa ($t_m=5$ nm, $t_c=3$ nm, $t_e=5$ nm, $t_p=12$ nm) ve kırılma indeksine ($n_m=1.5$, $n_c=1.47$, $n_e=n_p=1.35$) sahiptir (116). Bir miyelin katmanı (ML) m, c ve m ve e sıralamasından oluşur (Şekil 4.6.2.1.1.b). Örnek olarak üç miyelin katmanı ile sarılmış bir aksonun kırılma indisi profili, "Fiziksel n değerleri" başlığı ile Şekil 4.6.2.1.1.b'de gösterilmiştir. 3 boyutlu nicel faz mikroskobu ile yapılan görüntülemelerde kırılma indisinin miyelinin ortasında ve kenarlarında farklıymış gibi bir etki beklenir. Bu beklenti ile tutarlı olarak yapılan hücre kültürü deneylerinde miyelinli aksonlar miyelinsiz aksonlardan farklı olarak ortalarında düşük kenarlarında yüksek kırılma indisi varmış gibi görünmektedir (Şekil 4.6.2.1.2.a ve b). Bu farklılık kullanılarak miyelin ayırımı kolaylıkla yapılabilir (Şekil 4.6.2.1.2.c.i-iii).



Şekil 4.6.2.1.2: Miyelinin kırınım indeksi tomografisi kullanılarak işaretli görüntülenmesi. a. Miyelinsiz aksonların görüntüsü. b. Miyelinli aksonların görüntüsü. c.i. Kutuyla işaretli bölgenin (b) büyütülmüş ve histogramı ayarlanmış görüntüsü. ii-iii. Aksonların ortogonal görüntülerinin 3B varyans filtresi ile işlenmiş versiyonu. (Şekil, Toy vd 2019'dan adapte edilmiştir.)(117)

4.6.2.2. *Koherent anti-stokes raman mikroskobu (CARS)*

CARS mikroskobunun temel çalışma prensibi moleküller arası titreşimlerin gözlemlenmesine/tespit edilmesine dayanır. CARS, senkronize iki lazerin non-lineer uyarımı ile stimüle edilmiş Raman dağılımını temel alır, ve bu dağılımın doğası gereği, daha güçlü sinyal elde edilir. CARS mikroskobuyla titreşime bağlı kontrast temelli ilk miyelin görüntülenmesi 2005 yılında Wang ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. CARS mikroskobunun CH_2 titreşimlerine olan hassasiyetini kullanarak canlı omurilik dokusunda miyelin lipidlerinin moleküler organizasyonu ve spektral profiliyle ilgili bilgi elde edilmiştir (118). Günümüze kadar CARS mikroskobu nöronal dokuları görüntüleme konusunda çok gelişme kaydetmiştir. MSS ve PSS'te bulunan miyelin in vivo görüntülenebilmiş (119–121), hatta canlı hayvanda haftalarca süren yüksek kaliteli görüntüler elde edilmiştir (122, 123).

4.6.2.3. *Üçüncül harmonik mikroskopi (THG)*

THG mikroskobunun çalışma prensibi, su-lipid, su-protein ya da lipid-protein fazlarının farklı şekilde uyarılmalarından kaynaklı ortaya çıkan ışık dağılımını temel almaktadır (124). Ortaya çıkan kontrasttan dolayı fazların ayrımı mümkün olabilmektedir. Sinyaller örneğin kendi içinde üretildiği için kontrast oluşturmak amacıyla harici bir maddeye ihtiyaç duyulmaması THG yönteminin en önemli özelliklerinden biridir (125). THG mikroskopi miyelin gibi özellikle yüksek kırınım indisi profili gösteren yapıları görüntülemeye başarılı bir yöntemdir (126–128). 2014

yılında yapılan çalışmada, Lim ve arkadaşları canlı kültürde ve ex vivo dokuda Schwann hücrelerinin oluşturduğu miyelini THG mikroskopisi ile görüntüleyebilmişlerdir. THG ile, kompakt miyeline ek olarak miyelinde bulunan kompakt olmayan bazı yapılar, Schmidt-Lanterman kanalları, Cajal bantları gibi, görüntülenebilmektedir (113).

4.6.2.4. Spektral konfokal yansıtma mikroskopisi (SCoRe)

Spektral konfokal yansıtma mikroskopisi (Spectral Confocal Reflectance Microscopy, SCoRe), lipid açısından zengin miyelinin yüksek kırılma indisi farkından yararlanır. Bu yöntemde, klasik lazer taramalı konfokal mikroskopi sistemlerinde farklı dalga boylarındaki birden fazla lazerden eşzamanlı yansıtılan sinyalleri birleştirerek görüntüler oluşturulmaktadır. 2014 yılında Schain ve arkadaşları, miyelinli fiberlerle yoğun alanları görüntüleyerek her biri miyelinli fibere özgü görünen çarpıcı renklerle fiberlerin ayırt edilebildiğini göstermişlerdir. Elde edilen bu farklı ve çok renkli yansımanın miyelin kalınlığı ve katman sayısının yansıyan dalga boylarını belirlediği ve değişken miyelin kılıf kalınlığı, lipid bileşimi ve diğer lokal hücrel değişkenler nedeniyle bu renk çeşitliliğinin arttığı düşünülmektedir. Bu yöntemle de miyelin kılıf üzerindeki Ranvier nodları, Schmidt-Lanterman kanalları gibi spesifik yapılar tespit edilebilmektedir (129). SCoRe ile canlı farelerde yapılan görüntülemelerde 400 µm gibi bir derinliğe kadar fare kortikal aksonlarının in vivo miyelinlenmesinin görüntüleri alınabilmektedir (129).

4.6.2.5. Spektral reflektometri (SPeRe)

Bir önceki bölümde anlatılan SCoRe yöntemi, yoğun olarak bulunan miyelinli aksonlarda her birinin farklı renkte ışık saçılımından kaynaklı olarak farklı renklerde görülebilmelerine, ayırt edilebilmelerine olanak sağlamaktadır. SPeRe (spectral reflectometry) yöntemi ise, SCoRe yönteminde ortaya çıkan bu ışık saçılımlarının analizine dayanarak geliştirilmiş miyelinli aksonların nano boyutta görüntülenmesine imkân sağlayan bir yeni bir teknolojidir. SPeRe yöntemi miyelin kılıfın çok katmanlı yapısından kaynaklı ortaya çıkan ince-film arayüzü prensibine dayanmaktadır (130). Böylelikle, birçok işaretsiz görüntüleme yöntemi ile elde edilemeyen nano boyutta miyelin katmanlarının bilgisi, bu yöntem ile elde edilebilmektedir. Bu yöntemin miyelinli aksonlara uyarlanması ile miyelinli aksonlarda canlı görüntüleme ile fizyolojik ozmotik değişiklikler ve mekanik beyin hasarı durumunda nano boyuttaki

dinamikleri incelemek mümkündür (116). Yapılan deneylerde, Ranvier nodları, Schmidt-Lanterman kanalları ve miyelin ödemi/şışmesi tespit edilebilmiştir. SPeRe yönteminin diğer bir özelliği, bu yöntemde yakalan ışık, örneğe gönderilen ışık ile aynı dalga boyundadır, fakat florasan görüntülemeye gönderilen ışık ile yakalanan ışık arasında spektral kayma gerçekleşir. Bu SPeRe ile ortak görüntüleme yapmak istendiğinde avantaj oluşturmaktadır.



5. MATERYAL VE METOD

5.1. Malzeme Listesi

Tablo 5.1.1: Malzeme Listesi

Malzeme	Firma – Katalog No
<i>Klonlama:</i>	
Amfisilin (100 ug/ml)	
Kanamisin (50 ug/ml)	Sciencell, 1801
LB Broth	
LB Agar	
SOC Medium	ThermoFisher
Gliserol	
KriyoVial	Nest
Qiagen EndoFree Maxiprep Kit	
MiniPrep Plazmid İzolasyon Kiti	MN
Gel DNA İzolasyon Kiti	MN, 740609.50
10kb Plus DNA Ladder	NEB
PCR Mix	
Safeview	
ThermoFisher Fast Digest MssI kesim enzimi	
ThermoFisher Fast Digest SgsI kesim enzimi	
ThermoFisher Fast Digest BamHI kesim enzimi	
ThermoFisher Fast Digest XbaI kesim enzimi	
ThermoFisher Fast Digest XhoI kesim enzimi	
ThermoFisher Fast Digest NdeI kesim enzimi	
ThermoFisher Fast Digest EcoRI kesim enzimi	
Thermofisher DNA ligase I	
Thermofisher DNA Dephosphatase	

<i>Hücre Kültürü:</i>	
25 cm ² hücre kültürü flaskı	NEST, 707003
Poly-L-Ornithine	Sigma, P3655
Laminin	Sigma, L2020
FBS	Sigma-F4135
DMEM	Multicell, 319-005-CL
DMEM-F12	Capricorn, DMEM-12-A
Tyrpsin	Thermo, 25200056
Accutase	
DMSO	
Antibiyotik-Antimikotik	Multicell-450-115-EL
GlutaMAX	Gibco-35050-061
N2 Supplement	Thermo Fisher, 17502048
B27 Supplement	Thermo Fisher, 12587010
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	R&D Systems, 233-FB-025
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	R&D Systems, 236-EG-200
Rock İnhibitör	Enzo, ALX-270-333-M025
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)	
Trombosit kökenli büyüme faktörü- α (PDGF- α)	Biovision, 4482-10
Siliar nörotrofik faktor (CNTF)	Biovision, 4017-20
Nörotrofin-3 (NT3)	Biovision, 4306-10
Triiodothyronine (T3)	Sigma, T6397
Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör (GDNF)	
Siklik-AMP (cAMP)	
L-Askorbik asit (L-AA)	
Lipofectamine 2000	
35 mm Plastik Tabanlı Kültür Kabı	Thermo, 130180
100 mm plastic tabanlı petri kabı	NEST

<i>Virüs üretimi:</i>	
1x PBS	Sigma-P4417
Optimem	
PEI	
Beckmann Ultracentrifuge Tube	
<i>Görüntüleme:</i>	
Fluoromount	
DAPI	Sigma – D9542
1.5H coverslips	Marienfeld
O.C.T	
Microtome bıçakları	

5.2. Plazmidlerin Üretimi

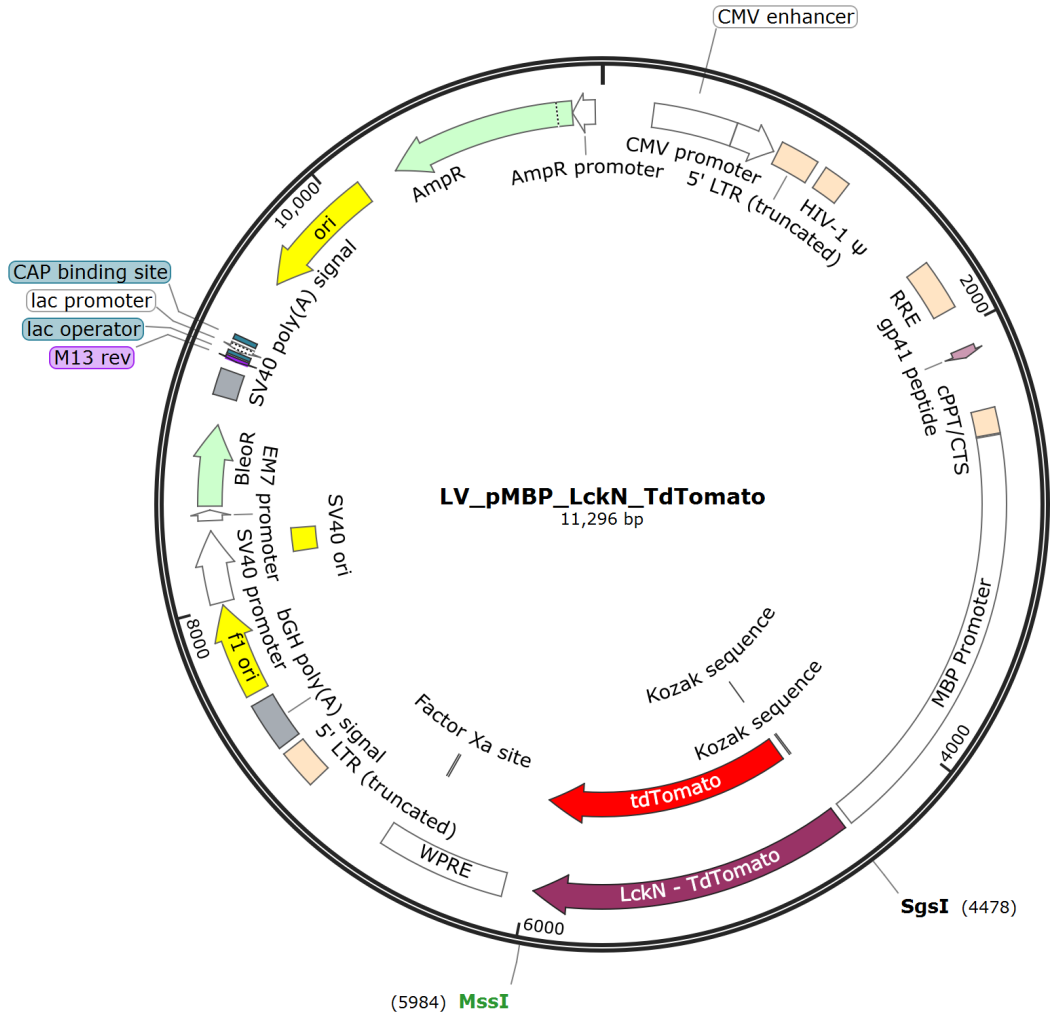
5.2.1. MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG plazmitlerinin klonlama ile elde edilmesi

5.2.1.1. MBP promotörünü taşıyan lentiviral plazmit parçasının eldesi

Oligodendrosit hücrelerinde GPI çapa ile taşınan proteinlerin taşınma dinamiğini inceleyebilmek için oligodendrosit hücrelerinde GFP floresan bağlı GPI çapayı ve genel olarak kargo veziküllerinin taşınma dinamiğini inceleyebilmek için kargo veziküllerinde ifade edilen VSVG proteinini Venüs floresan proteine bağlı olarak lentivirüs yardımıyla oligodendrosit hücrelerinde ifade ettirdik. Bunun için öncelikle miyelin bazik proteini (MBP) promotörüne sahip lentiviral vektör, Şekil 5.2.1.1.1’de gösterilen MssI ve SgsI kesim enzimleri ile kesilerek içerisinde TdTomato sekansı çıkarılmış, MBP promotörüne sahip düz lentiviral vektör elde edilmiştir. Enzimlerin tanıma sekansı ve bilgileri Tablo 5.2.1.1.1’de verilmiştir. Bu lentiviral vektör GPI-GFP ve Venüs-VSVG lentiviral plazmitlerinin üretimi için kullanılmıştır.

Tablo 5.2.1.1.1: Klonlama için seçilen restriksiyon enzimleri ve tanıma sekansları.

Enzim Adı:	Tanıma Sekansı:
ThermoFisher Fast Digest SgsI	GG/CGCGCC
ThermoFisher Fast Digest MssI	GTTT/AAAC



Şekil 5.2.1.1.1: MBP-LckN-TdTomato plazmidi ve MBP promotörünün gösterimi. Beyaz renkli kısım MBP promotörünü, kırmızı ile vurgulanan kısım TdTomato sekansını göstermektedir. Çıkarmak istediğimiz bölge (TdTomato) 1506 bp, kullanmak istediğimiz MBP sekansına sahip lentiviral vektör ise 9790 bp uzunluğundadır. Plazmidi tek noktadan kesen MssI ve SgsI enzimleri kullanılarak TdTomato sekansı, MBP promotörünü taşıyan ana vektörden çıkartılmıştır. Oluşan bu boşluğa klonlanan GPI-GFP ya da Venus-VSVG sekansları klonlanmıştır.

5.2.1.2. MBP:GPI-GFP plazmidinin klonlama ile elde edilmesi

Oligodendrosit hücrelerinde GPI çapa ile taşınan proteinlerin taşınma dinamiğini inceleyebilmek için oligodendrosit hücrelerinde GFP florasan bağlı GPI çapayı lentivirüs plazmidi yardımıyla ifade ettirdik. Bunun için GPI-GFP sekansını taşıyan CAG:GPI-GFP plazmidi Addgene'den sipariş verilmiştir. (pCAG:GPI-GFP, Addgene Plazmid No:32601, Amfisilin Resistant, Anna-Katerina Hadjantonakis tarafından hediye edilmiştir.).

İstediğimiz protein ifadesini oligodendrositlere özgü olmasını istediğimizden, GPI-GFP sekansı, Bölüm 5.2.1.1'de hazırlanan MBP promotörü altına klonlanmıştır. Bu klonlama için gerekli kesim enzimleri GPI-GFP sekansının başında ve sonunda bulunmadığından SgsI ve MssI enzim bölgelerini içeren, Tablo 5.2.1.2.1'de belirtilen primer dizileri tasarlanarak GPI-GFP sekansı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmış, PZR ürünü SgsI ve MssI enzimleri ile kesilerek klonlamaya hazır hale getirilmiştir. Ligasyon enzimi ile MBP lentiviral vektör (9790 bp) ve GPI-GFP (953 bp) sekansı birleştirilerek Stbl3 bakterilerine transformasyonu yapılmıştır. Elde edilen MBP:GPI-GFP lentivirüs haritası (10.744 bp) Şekil 6.1.1.1'de verilmiştir.

Tablo 5.2.1.2.1: GPI-GFP ve Venus-VSVG bölgelerinin çoğaltılması için seçilen primer çiftleri. MBP promotörünü taşıyan ana vektöre GPI-GFP veya Venus-VSVG sekanslarını klonlayabilmek için forward primerlere SgsI tanıma bölgesi (yatık harfler) reverse primerlere MssI tanıma bölgesi (yatık harfler) eklenmiştir.

PCR Primer Adı:	Primer Dizisi: (5'→3')
GPI-GFP Forward Primer	TTGGCGCGCCGAGTATGGTAGAGATG
GPI-GFP Reverse Primer	GGTTTAAACAGCCTGCACCTGAGGA
Venus-VSVG Forward Primer	TTGGCGCGCCGACTCAGATCTC
Venus-VSVG Reverse Primer	CCGTTTAAACCGCGGCCGCTTTACTT

5.2.1.3. MBP:Venus-VSVG plazmidinin klonlama ile elde edilmesi

Oligodendrosit hücrelerinde kargo vezikülleri ile taşınan proteinlerin taşınma dinamiğini inceleyebilmek için oligodendrosit hücrelerinde Venus florasan bağlı VSVG proteinini lentivirüs plazmidi yardımıyla oligodendrositlerde ifade ettirdik. Bunun için Venus-VSVG sekansını taşıyan CMV:VSVG-Venus plazmidi

Addgene'den sipariş verilmiştir. (CMV:VSVG-Venus, Addgene Plazmid No: 11914, Kanamisin Resistant, Jennifer Lippincott-Schwartz tarafından hediye edilmiştir.).

İstedığımız protein ifadesini oligodendrositlere özgü olmasını istediğimizden, Venus-VSVG sekansı, sadece miyelinleyen oligodendrosit hücrelerinde aktif olan, Bölüm 5.2.1.1'de hazırlanan MBP promotörü altına klonlanmıştır. Bu klonlama için gerekli kesim enzimleri Venus-VSVG sekansının başında ve sonunda bulunmadığından SgsI ve MssI enzim bölgelerini içeren, Tablo 5.2.1.2.1'de belirtilen primer dizileri tasarlanarak Venus-VSVG sekansı PZR ile çoğaltılmış, PZR ürünü SgsI ve MssI enzimleri ile kesilerek klonlamaya hazır hale getirilmiştir. Ligasyon enzimi ile MBP lentiviral vektör (9790 bp) ve Venus-VSVG (2341 bp) sekansı birleştirilerek Stbl3 bakterilerine transformasyonu yapılmıştır. Elde edilen MBP:Venus-VSVG lentivirüs plazmidinin haritası (12.131 bp) Şekil 6.1.2.1'de verilmiştir.

5.2.2. MBP:GPI-GFP plazmidinin doğrulanması

Klonlama sonrası elde edilen plazmidler Stbl3 bakterilerine transforme edilmiş, antibiyotik seleksiyon dizisi içeren plazmidleri taşıyan bakteriler, MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG plazmidleri için amfilisin ile seleksiyon yapılarak büyümesi sağlanmış, sonrasında seçilen koloniler amfilisinli LB besisi yerinde büyütülerek çoğaltılmış ve bir dizi doğrulama basamaklarından geçmiştir.

5.2.2.1. MBP:GPI-GFP plazmidinin kesim enzimleriyle doğrulanması

Ligasyon işlemi ve bakterilere transformasyon sonrasında MBP:GPI-GFP klonlaması için amfilisinli besisi yerinde büyüyen bakteri kolonileri arasından seçilen 9 koloni tekrar amfilisinli besisi bulunan sıvı ortamda büyütülmüş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır. İlk olarak, plazmidler XhoI ve NdeI enzimleri ile kesilerek plazmidlerin doğruluğu test edilmiştir (Şekil 6.2.1.1.a). Sonuçlar Bölüm 6.2.1'de verilmiştir. Beklenen bant uzunluklarını (5932 bp ve 4812 bp) veren G3, G4, G6 ve G9 plazmidleri GPI-GFP bölgesinin bulunduğu bir kez daha doğrulanması için seçilmiştir.

5.2.2.2. MBP:GPI-GFP plazmidinin PZR ile doğrulanması

Seçilen dört plazmidde bulunması beklenen GPI-GFP bölgesinin tespiti için klonlamada kullanılan primerler ile (Tablo 5.2.1.2.1) yeniden PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.2.1.1.b). Sonuçlar Bölüm 6.2.1'de verilmiştir. Ligasyon ile eklediğimiz GPI-GFP bölgesinin 4 örnekte de var olduğunu doğrulanmıştır. Bu aşamaya kadar olan işlemlerde herhangi bir mutasyon eklenip eklenmediğinin kontrol

edilmesi amacıyla G4, G6 ve G9 nolu plazmidler seçilerek GPI-GFP bölgelerinde DNA sekanslaması yapılmıştır.

5.2.2.3. MBP:GPI-GFP plazmidinin sekanslanması

Klonlama aşamasında GPI-GFP, Venus-VSVG sekanslarında olduğu gibi PZR ile çoğaltılan sekanslarda mutasyon ortaya çıkma ihtimali düşük de olsa göz ardı edilemez. Özellikle proteinlerin kodlandığı bölgelerde olabilecek bir ekleme ya da silinme gibi ifade kaymasına (frame shift) neden olabilecek mutasyonlar tüm proteini etkisiz hale getirebilir. Klonlamanın ardından mutasyon olup olmadığını anlamanın en kesin yolu DNA sekanslaması ile kontrol edilmesidir. Bu amaçla klonlama ile üretilen plazmidlerden ilk iki doğrulama aşamasını da geçen üçer koloni seçilerek sekanslanmıştır.

MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG plazmidlerinde MBP promotörünü taşıyan aynı vektör kullanıldığı için kesim enzimi alanlarının yaklaşık 100 bp dışında olan alanlar vektöre denk gelmekte, bu nedenle öncelikle bu alanlardan ortak forward ve ortak reverse sekanslama primerleri tasarlanmıştır (Tablo 5.2.2.3.1). Sekanslama reaksiyonlarında primerden itibaren yaklaşık olarak ilk 100 bp'lik bölge net bir şekilde okunamadığı için bu şekilde bir seçim yapılmıştır. Modern teknikler ile net bir şekilde okunabilen DNA baz çifti sayısı yaklaşık 1000 bp'dir. Bu nedenle, GPI-GFP DNA bölgesinin uzunluğu 953 bp olduğundan sadece ortak primerler ile sekanslanmıştır. Sekanslama sonuçlarına örnek Şekil 6.2.2.1'de verilmiştir.

Tablo 5.2.2.3.1: MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG plazmidlerinde sekanslama için kullanılan primerler. MBP:GPI-GFP plazmidleri Ortak Forward Primer ve Ortak Reverse Primer ile sekanslanmıştır. MBP:Venus-VSVG plazmidlerinin sekanslamasında ortak primerlere ek olarak MBP:Venus-VSVG Forward Primer 1 ve 2 ve MBP:Venus-VSVG Reverse Primer 1 ve 2 kullanılmıştır.

Sekanslama Primer Adı:	Primer Dizisi: (5'→3')
Ortak Forward Primer	CAACACCTTCAAAGACAGGC
MBP:Venus-VSVG Forward Primer 1	CTGGCATTCCGACTATAAGGTC
MBP:Venus-VSVG Forward Primer 2	GCAGCTTCCTGATGATGAGAC
Ortak Reverse Primer	CCAAGATCCTCTCAACGTCC
MBP:Venus-VSVG Reverse Primer 1	CCGTCGACTGCAGAATTCTG
MBP:Venus-VSVG Reverse Primer 2	CTCCTCTTGTGCTTCTAGCC

5.2.3. MBP:Venus-VSVG plazmidinin doğrulanması

5.2.3.1. MBP:Venus-VSVG plazmidinin PZR ile doğrulanması

Ligasyon işlemi ve bakterilere transformasyon sonrasında MBP:Venus-VSVG klonlaması için amfisilinli besi yerinde büyüyen bakteri kolonileri arasından seçilen 10 koloni tekrar amfisilin bulunan sıvı ortamda büyütülmüş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır. İlk olarak, plazmidde bulunması beklenen Venus-VSVG bölgesinin doğrulanması amacıyla klonlamada kullanılan primerler ile (Tablo 5.2.1.2.1) yeniden PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.2.3.1.a). Beklenen 2346 bp uzunluğunda bant elde ettiğimiz 5 plazmidten V2, V3, V4, V9 numaralı plazmidler seçilerek ikinci doğrulama için enzimlerle kesilmiştir.

5.2.3.2. MBP:Venus-VSVG plazmidinin kesim enzimleriyle doğrulanması

V2, V3, V4, V9 numaralı MBP:Venus-VSVG plazmid klonları doğrulama amacıyla EcoRI enzimi ile kesilmiştir. Beklenen bant uzunlukları 1050 ve 1481 bp'dır. Sadece V2, V3 ve V9 nolu örneklerde beklenen bant uzunlukları gözlenmiştir. Sonuçlar Şekil 6.2.3.1.b'de verilmiştir. Bu üç plazmid, bu aşamaya kadar olan

işlemlerde herhangi bir mutasyon eklenip eklenmediğinin kontrol edilmesi amacıyla DNA sekanslaması için seçilmiştir.

5.2.3.3. MBP:Venus-VSVG plazmidinin sekanslanması

MBP-Venus-VSVG plazmidi için, Venus-VSVG DNA bölgesi 2346 bp uzunlukta olduğundan, ortak primerlere ek olarak iki ayrı forward primer ve iki ayrı reverse primer tasarlanmıştır. Tasarlanan bütün primerler sorunsuz çalışıp çalışmadıklarını görmek için sekanslama öncesinde tasarlandıkları plazmidlerle PZR reaksiyonu yapılarak test edilmiştir. Sekanslama sonuçlarına örnek Şekil 6.2.4.1’de verilmiştir.

5.3. Lentivirüslerin Üretimi

5.3.1. Plazmidlerin izolasyonu

Doğrulama aşamalarını geçen ve ileriki deneyler için seçilen MBP:GPI-GFP plazmidinin G4 klonunu ve MBP:Venus-VSVG plazmidinin V9 nolu klonunu içeren bakteriler amfisilinli LB besi yerinde (400 ml LB+400 µl amfisilin) 16 saat çoğaltılmış, plazmidler Qiagen Endofree Maxiprep Kiti kullanılarak izole edilmişlerdir. Benzer şekilde lentivirüs üretiminde kullanılan pMDL, pRev, ve pVSVG lentivirüs yardımcı plazmidleri de maxi prep kiti ile izole edilmişlerdir.

5.3.2. HEK Hücrelerinin çoğaltılması

Lentivirüs üretimi için HEK293T hücreleri antibiyotiksiz, %5 FBS içeren besi yeri ile 150 mm’lik petri kapları içerisinde büyütülmüş ve çoğaltılmıştır. Her bir virüs için ortalama 10-12 petri yeterli olmaktadır. Hücreler %70 yoğunluk oranına ulaştığında Bölüm 5.3.3’te verilen protokole göre transfekte edilmiş ve lentivirüsleri üretilmiştir.

5.3.3. Lentivirüs üretimi

MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG plazmidleri ile lentivirüsler üretilmiştir. Gerekli görülen deneylerde oligodendrosit membranını işaretleyebilmek için florasan molekülün membrana yönelmesini sağlayan LckN sekansına sahip MBP:LckN-TdTomato plazmidinden de lentivirüsü üretilmiştir. PBS içinde çözdürülmüş virüs partikülleri deneylerde kullanılmak üzere -80 °C’de saklanmıştır.

Bu plazmidlerin her biri, pMDL, pRev, ve pVSVG lentivirüs yardımcı plazmidleri, Optimem ve polietilenimin (PEI) ile birlikte HEK-293T hücrelerine

verilerek 6 saat 37 °C’de inkübe edilmiş ve süre sonunda hücrelerin vasatı taze hücre vasatı ile değiştirilmiştir. Hücrelerin içinde yardımcı plazmidler sayesinde paketlenen lentivirüs partikülleri vasata salınmaktadır. Dördüncü günde virüs partikülleri hücre vasatından önceden uyguladığımız standart protokollerin modifiye edilmiş versiyonları kullanılarak izole edilmiştir (131). Kısaca, transfekte olmuş HEK-293T hücrelerinin vasatı dördüncü günde toplanmış ve vasat 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek virüs partikülleri haricindeki partiküllerden ve vasattaki ölü hücrelerden olabildiğince arındırılmıştır. Bu filtreleme sonrasında virüs parçacıkları yapılan deneyler süresince eldeki imkanlar doğrultusunda iki farklı pürifikasyon yöntemi ile izole edilmiştir.

5.3.3.1. PEG8000 ile virüs partiküllerinin eldesi

Hücrelerin içinde yardımcı plazmidler sayesinde paketlenen lentivirüs partiküllerinin pürifikasyonu için filtrelenen vasat 4:1 oranında otoklavlanmış %50 polietilen glikol 8000 (PEG8000) solüsyonu ile karıştırılmış ve gece boyu +4 °C’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. PEG-virüs karışımı, 24 saatlik inkübasyonun ardından 2500 rpm’de 20 dakika sonra da 1200 rpm’de 5 dakika çevrilerek çöktürülmüş ve vasattan ayrılmıştır. Çöktürülen virüs pelleti steril $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ içermeyen PBS solüsyonunda resüspanse edildikten sonra alikotlanarak -80 °C’de saklanmıştır.

5.3.3.2. Beckmann ultrasantrifüj ile virüs partiküllerinin eldesi

Araştırma birimimize Beckmann ultrasantrifüj alınması sonrasında hem çöktürebileceğimiz virüs miktarını arttırmak hem de protokolümüzü kısaltmak açısından yeni ürettiğimiz virüslerde ultrasantrifüj ile yüksek hızda çöktürme yöntemini uyguladık. Kısaca, hücrelerden toplanan ve 0.22’lik filtre ile filtrelenen hücre vasatı ultrasantrifüj tüplerine bölünerek 69,000 rpm’de 2 saat boyunca santrifüj edildi. Sonrasında tüplerdeki vasat atılarak çöktürülmüş olan virüs partikülleri PBS ile çözündürülerek tek bir santrifüj tüpüne toplandı. 69,000 rpm’de 2 saat santrifüjün sonunda süpernatant atılarak çöktürülmüş virüs partikülleri elde edildi. Virüs partikülleri steril $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ içermeyen PBS içerisinde çözülmeleri için bir gece +4 °C’de bekletildikten sonra ertesi gün 1-2 µl olacak şekilde alikotlanarak -80 °C’de saklanmıştır.

5.4. HELA Hücre Hattında Vezikül Taşınımının İncelenmesi

5.4.1. HELA hücrelerinin çoğaltılması ve dondurulması

-80 °C’de saklanan HELA hücreleri çözündürüldükten sonra %1 Antibiyotik, %1 Glutamax, %10 FBS içeren DMEM-HG besi yeri (tamamlanmış besi yeri) içerisinde büyütülmüştür. %70 yoğunluğa ulaşan hücreler Tripsin ile kaldırılarak 1200 rpm’de 3 dakikada çöktürülmüştür. Hücreler pasajlanarak ya hücre hattı devam ettirilmiş ya da %10 DMSO içeren tamamlanmış besi yeri içerisinde dondurulmuştur.

5.4.2. HELA hücrelerinde GPI-GFP ve Venus-VSVG ifadesi

Oligodendrosit hücrelerinden önce daha basit hücre tipi olan HELA hücrelerinde GPI-GFP ile lipit sallarını ve Venus-VSVG ile kargo veziküllerini işaretleyerek taşıma mekanizmalarını inceledik. Bunun için HELA hücreleri MBP:GPI-GFP plazmidi veya MBP:Venus-VSVG plazmidleri ile PEI ya da lipofektamin kullanılarak protokollere göre transfekte edilmiş ve transfeksiyonun ikinci gününde görüntülenmiştir.

5.4.3. Vezikül hareketinin spinning disk mikroskobunda görüntülenmesi ve analizi

Görüntüleme için Zeiss Cell Observer SD Spinning Disk Time-Lapse Konfokal Mikroskobu kullanılmış, kargo veziküllerinin hızlı hareketinden dolayı her 5 saniyede 1 görüntü alınmıştır. Görüntüleme için 20x ve 40x objektifler kullanılmıştır. Canlı görüntüleme olduğu için hücreler inkübasyon sistemi içine yerleştirilmiş ve 37°C ve %5 CO₂’li ortam sağlanmıştır. 40x objektif kullanıldığı durumlarda hücrelerin ısı kaybetmemesi için objektif ısıtıcı kullanılarak, objektifin de 37°C’de olması sağlanmıştır.

Her bir hücreye ait görüntüler, Fiji yazılımındaki TrackMate eklentisi ile her 5 saniyedeki lokasyonu işaretlenerek hız, lokasyon, mesafe ve yönelme bilgileri elde edilmiştir. Sonuçlar Bölüm 6.3’de verilmiştir.

5.5. Oligodendrosit Hücrelerinde Vezikül Hareketinin İncelenmesi

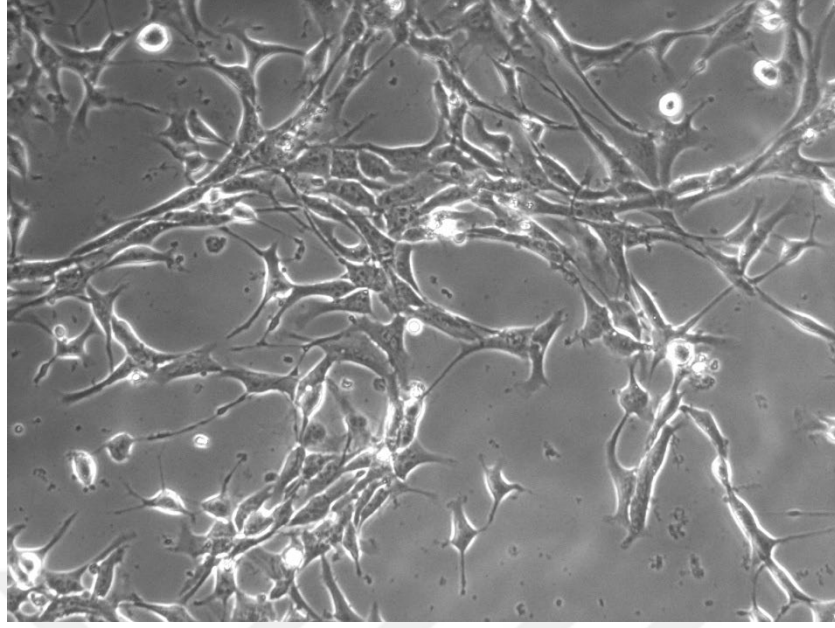
Bu tezde vezikül hareketinin incelenmesi için merkezi sinir sistemine ait fare embriyonik kök hücrelerinden üretilen nöral progenitör hücreler (NPC), faktörler ile oligodendrosit ve nöronlara farklılaştırılmış, deneylerde bu iki hücrenin ortak kültürü kullanılmıştır.

5.5.1. Hücreler için büyüme ortamının hazırlanması

Nöral progenitor hücreler, yaşamaları için tutunacakları bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle önce hücrelerin büyütüleceği flasklar ve görüntüleme deneylerinin yapılacağı cam tabanlı petripler Poly-L-Ornitin ve laminin ile kaplanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Plastik tabanlı yüzeyler önce steril ddH₂O içerisinde %0.1'lik Poly-L-Ornitin ile bir gece bekletildikten sonra ddH₂O ile iki kez yıkanarak 1x steril PBS içerisinde %1'lik laminin ile bir gece inkübe edilmiştir. Cam tabanlı yüzeyler ise aynı şekilde Poly-L-Ornitin ile kaplandıktan sonra %5'lik laminin ile kaplanmıştır. Bütün aşamalar oda sıcaklığında yapılmıştır. Kaplama sonrasında ya direkt hücre ekiminde kullanılmış ya da daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. -20 °C'de saklanan yüzeyler, kullanılmadan önce 37 °C'deki etüvde ısıtılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hücre ekiminden önce yüzeyde bulunan laminin uzaklaştırılmıştır.

5.5.2. Oligodendrositlerin kültür ortamında elde edilmesi

Oligodendrositler, NPC'lerinden kendi geliştirdiğimiz protokol kullanılarak farklılaştırılmışlardır (62). -80 °C'de saklanan NPC'ler çözündürülerek 25 cm²'lik flasklarda %70-80 oranında hücre doluluğuna ulaşana kadar büyütülmüştür. NPC'lerin büyüme ve çoğalmaları için 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF, 1x N2 ve 1x B27 eklenmiş DMEM-F12 besi yeri kullanılmıştır. Sağlıklı NPC hücreleri Şekil 5.5.2.1'deki gibi görülmektedir.



Şekil 5.5.2.1: Çoğalma aşamasındaki nöronal progenitör hücrelerin gösterimi.

Elimizdeki protokole göre miyelinleyen oligodendrosit oluşumu iki haftalık bir süreç gerektirmektedir (62). NPC'leri oligodendrositlere farklılaştırmanın ilk haftasında 1x N2/B27 içeren DMEM-F12 besi yerine ilave 10 ng/ml İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)) ve 10 ng/ml Trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor- α (PDGF- α)) eklenmiş (farklılaştırma besi yeri, differentiation medium), besi yeri gün aşırı değiştirilerek hücrelerin genç oligodendrositlere farklılaşması desteklenmiştir. Farklılaştırma protokolünün ikinci aşamasında 1x N2/B27 içeren DMEM-F12 besi yerine ilave 10 ng/ml Siliar nörotrofik faktör (Ciliary neurotrophic factor (CNTF)), 5 ng/ml Nörotrofin (Neurotrophin-3 (NT3)) ve 40 ng/ml Triiodothyronine (T3) eklenmiş (olgunlaştırma besi yeri, maturation medium), besi yeri gün aşırı değiştirilerek hücrelerin olgun oligodendrositlere farklılaşması desteklenmiştir. Bu aşamadan sonra besi yerinden CNTF ve NT3 çekilerek T3 içeren besi yeri (myelination medium) ile miyelinleyen oligodendrosit elde edilmiştir. İki haftalık farklılaştırma sürecinden sonra ya hücreler aynı petride miyelinleyen oligodendrosite dönüştürülerek kullanılmış, ya da Akkutaz enzimi ile kaldırılarak miyelinizasyona daha uygun ortam oluşması için NPC'lerden farklılaştırılan nöron petrisine ortak kültür elde etmek için ekilmişlerdir. Bu durumda da 1x N2/B27 içeren DMEM-F12 besi yerine nöron farklılaştırmada kullanılan

faktörlere ek olarak yine 40 ng/ml T3 eklenerek oligodendrositlerin miyelinleyen oligodendrosit seviyeleri desteklenmiştir.

5.5.3. Nöronların kültür ortamında elde edilmesi

NPC'lerden MSS karakterli nöronlar elde edebilmek için canlı görüntüleme yapmaya uygun cam tabanlı petrilere ekilen NPC'ler nöronlara farklılaştırmayı sağlayan faktörler ile iki hafta boyunca beslenmiştir. NPC'lerin besi yeri 20 ng/ml Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör (Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF)), 500 µg/ml siklik-AMP (cAMP) ve 0.2 µM askorbik asit (L-AA), 1x N2/B27 içeren DMEM-F12 besi yeri ile gün aşırı değiştirilerek nöronlara farklılaşmaları sağlanmıştır. İki haftalık farklılaştırma ile elde edilen nöronlar deneylerde oligodendrositlerle ortak kültür için kullanılmıştır.

5.5.4. Ortak-kültür sisteminin hazırlanması ve idamesi

İki haftalık farklılaşma süreciyle elde edilen oligodendrositler incelenmek istenen kargo vezikülleri ya da lipit sallarına göre MBP:Venus-VSVG & MBP:TdTomato ya da MBP:GPI-GFP & MBP:TdTomato virüs kombinasyonları ile farklılaşmanın 10. gününde enfekte edildikten sonra farklılaştırmayla elde edilen nöronların üstüne ekilerek ortak kültür oluşturulmuştur. Ortak kültürler, nöron faktörleri eklenmiş miyelinizasyon besi yeri ile 37 °C'de %5 CO₂ sağlayan etüvde saklanmıştır. Hazırlanan ortak kültürler Bölüm 5.5.5'de anlatılan canlı görüntülemelerde kullanılmıştır.

5.5.5. Gerçek zamanlı vezikül takibi

Görüntüleme boyunca hücrelerin 37 °C ve %5 CO₂'i sağlayan ortamda bulunmaları için araştırma merkezimizin bünyesinde bulunan mikroskop inkübasyon sistemleri kullanıldı. Bu sistemler Zeiss Cell Observer SD Spinning Disk Time-Lapse Konfokal Mikroskobu ve Zeiss LSM 780 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu ile kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Hücreleri ektiğimiz cam tabanlı petriler, mikroskoplarda görüntü alabilmemiz ve aynı zamanda hücreleri yaşatabilmemiz için tasarlanmış inkübasyon sistemleri ile uyumludur.

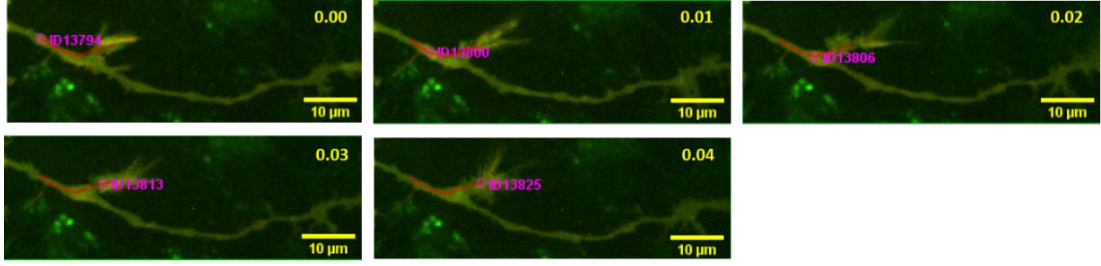
Canlı görüntülemeler için Spinning Disk Konfokal Mikroskobu kullanılmıştır. Görüntülemelerimize 20x büyötmeye sahip objektif ile başlanmış, genel bir fikir elde edildikten sonra 40x objektife geçilerek canlı görüntülemelerimizin büyük çoğunluğu bu büyötmeye yapılmıştır. Bu büyötmeye gruplar arasında göze çarpan bir fark

gözlemlemediğimizden boyutsal çözünürlüğümüzü arttırmak için 63x objektife geçtik. Uzun süreli (mesela >1 gün) gözlemlerimizde, ışığın neden olduğu fototoksititeyi en aza indirmek için her 10 dakikada bir görüntü alınmıştır. Kısa süreli (1-3 saat arası) gözlemlerimizde bu süre her 1-3 dakikada bir düşürülmüştür. Yaptığımız incelemelerde veziküller tahminimizden daha hızlı olduğunu tespit ettikten sonra her 5 saniyede 1 kare görüntü alınarak 10 dakikalık canlı görüntülemeler yapılmıştır. Hız, yön, mesafe gibi analizler bu görüntülerin incelenmesi ile elde edilmiştir. Sonuçlar Bölüm 6.7’de verilmiştir.

5.5.6. Görüntü işleme, lipidlerin, lipid sallarının ve kargo veziküllerinin hareketini takip etme

Spining Disk Konfokal Mikroskobu ile çekilen canlı görüntülemelerimizde her ne kadar hücre spesifik işaretleme yapmış olsak da, hücre kültürü ortamından ve hücrelere zarar vermemek için lazer gücünü en uygun minimum seviyede tuttuğumuzdan dolayı bazı videolarda arka plan kirliliği görülmekte ve bu da bizim takip etmek istediğimiz sinyalleri görmemizi zorlaştırmıştır. Bu nedenle öncelikle videolarda ZEN programındaki “Background Subtraction” modülünü kullanarak arka plan gürültüsü azaltılmıştır (ZEN 2.3 Lite -> Processing -> Adjust -> Background Subtraction). Analizler için çekilen görüntülerde lazer ışığının fototoksitesinden kurtulmak için SD mikroskobunun floresan modülü tercih edilmiş ve ön kamerası kullanılmıştır.

Bir sonraki aşamada hücrelerde kargo veziküllerinin, lipidlerin ve lipid sallarının hareketini takip edebilmek ve rotalarını çıkarabilmek için elde edilen görüntü stackleri Fiji (132) programı ile açılmıştır. TrackMate (133) eklentisi kullanılarak incelenen vezikülün her bir görüntüde bulunduğu noktalar (lokasyonu) hem otomatik hem manuel olarak seçilmiş ve TrackMate’e kaydedilmiştir (Şekil 5.5.6.1). Bu noktaların otomatik tanınması için vezikül/sinyal büyüklüğü kendi ölçümlerimizden elde ettiğimiz ortalama değer olarak 1,5 mikron olarak sisteme tanımlanmıştır. TrackMate eklentisi işaretlenen noktaların yer değiştirmesini, toplam aldığı yolu, ortalama hız gibi bilgileri bize vermektedir. Analizlerde bu bilgiler kullanılmıştır.



Şekil 5.5.6.1: TrackMate ile yapılan vezikül takip yöntemi örneği. Yukarıda resimler 1 dakikalık aralıklarla mikroskopta görüntü alınarak videosu oluşturulmuştur. TrackMate eklentisi ile her bir resimdeki vezikül, nokta olarak tanımlanabilmekte, son görülebildiği resme kadar nokta takip edilebilmekte ve resimler arasındaki konum farkı belirlenerek en sonunda ne kadar yer değiştirdiği bize rota olarak verilmektedir. Her bir resimdeki noktaya farklı bir ID atanarak bilgileri kaydedilmektedir.

5.6. Miyelin Yapısının İşaretsiz Görüntülenmesi

5.6.1. Deney hayvanları

Tüm cerrahi ve deneysel prosedürler, Avrupa Ekonomik Topluluğu Konseyi Direktifi 86/609'a uygun olarak İstanbul Medipol Üniversitesi Deneysel Hayvan Bakımı ve Araştırma Etik Kurulu (IMU-HADYEK) tarafından onaylanmıştır. Çalışmamızda dört vahşi tip (WT) BALB/c fare ve bir FVB-Tg(Prism)1989Htz/J (Jackson ID: 018068, Prism JD1989) fare (erkek, 2 aylık) kullanılmıştır. Dört WT hayvandan ikisi doku kesit kalınlığı optimizasyonları için kullanılmıştır. Korpus kallosum hasarı olan hayvanlar hariç tutulmuştur. Prism JD1989 faresinde, oligodendrositler (cerulean floresan protein (CFP)), astrositler (DsRedMax) ve nöronlar (sarı floresan protein (YFP, nükleer ifade)) farklı floresan proteinler ifade etmektedir. Tüm hayvanlar Medipol Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde (MEDITAM) üretilmiş ve barındırılmıştır. Tüm hayvanların sınırsız gıdaya ve suya erişim sağlamış, 12 saat/12 saat (h) ışık/karanlık döngüsüne maruz kalmış ve 20-24 °C ve %40-60 nem ortamında barındırılmıştır.

5.6.2. Demiyelinizasyon hasarı oluşturma ve remiyelinizasyon süreci

Demiyelinizasyonu gerçekleştirmek için L- α -Lizofosfatidilkolin (Lizolesitin; LPC) (Sigma, L1381) kullanılmıştır. %2 stok çözeltisi elde etmek için %0.9 NaCl içinde süspanse edilmiş ve alikotlanarak -20 °C'de saklanmıştır. Operasyon öncesinde stok solüsyonları 1:1 oranında sulandırılarak %1 LPC süspanسیون elde edilmiştir. %1'lik LPC farelerin korpus kallosumunda seçilen lokal bölgelerde demiyelinizasyonu indüklemek için kullanılmıştır (Şekil 6.8.4.1.a-b). Ketamin (100

$\mu\text{g/g}$) ve ksilazin ($10 \mu\text{g/g}$) kokteyli ile anestezi edilen hayvanlar stereotaktik cihaza (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, ABD) yerleştirilmiştir. %0.9 NaCl içinde %1'lik LPC'den $2 \mu\text{l}$ 'lik süspansiyon, Mouse Brain Atlasına göre korpus kallosumda seçilen bölgelere (koordinatlar: 0.3 mm lateral, bregma'ya göre -1.7 mm rostral, kafatası kalınlığı dahil olmak üzere beyin yüzeyine 1.7 mm derin) 120 nl/dk 'lık bir akış hızıyla mikromanipülatör (Narishige, East Meadow, NY, ABD) tarafından tek taraflı olarak intrakraniyal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyon pipeti, LPC'nin difüzyonu ve sıvı geri akışını önlemek için 10 dakika bekletilmiş ve yavaşça geri çekilmiştir.

Demiyelinizasyonu görüntülemek için LPC verilmesinden üç gün sonra fareler perfüze edilerek beyinleri alınmıştır. Remiyelinizasyonu gözlemlemek için fareler LPC enjeksiyonundan sonra 21 gün boyunca postoperatif bakım almış ve perfüze edilerek beyinleri alınmıştır. Lezyon bölgesinin karşı tarafındaki hemisfer kontrol olarak kullanılmıştır. Postoperatif bakım sırasında, hayvanlar sınırsız gıdaya ve suya erişim sağlamış, 12 saat/12 saat ışık/karanlık döngüsüne maruz kalmış ve $20-24^\circ\text{C}$ ve %40-60 nem ortamında barındırılmıştır.

5.6.3. Demiyelinizasyonun görüntülenerek doğrulanması

Lizolesitin ile demiyelinizasyon modeli oluşturabildiğimizi görebilmek için lizolesitin enjeksiyonu yapılmış prizma fare beyninden kesitler alınarak LSM780 Konfokal Mikroskopu ile $10\times$ objektif ile görüntülenmiştir. Prizma farede oligodendrosit hücreleri gök mavisi floresan proteini ifade ettiği için hem oligodendrositler hem de oligodendrositlerin bir uzantısı olan miyelin ile sarılı aksonların bulunduğu bölgeler gök mavisi floresan proteiniyle işaretlenmekte, dolayısıyla konfokal mikroskop ile görüntülenebilmektedir (Şekil 6.8.4.1.b). Lizolesitin ile demiyelinizasyon sonucu bu sinyallerde azalma beklenmektedir. Dolayısıyla kendi görüntülemelerimizde korpus kallosum bölgesindeki sinyalin büyük oranda azaldığı yerler, demiyelinize olmuş bölgeler olarak kabul edilmiştir (Şekil 6.8.4.1.b).

5.6.4. Örnek hazırlama

Fareler ketamin ($100 \mu\text{g/g}$) ve ksilazin ($10 \mu\text{g/g}$) kokteyli ile anestezi edilmiş ve transkardiyal olarak 4°C 'de soğutulmuş 20 ml $1\times$ tamponlu fosfat salin ($1\times\text{PBS}$) ile perfüze edilmiş, ardından fiksasyon için 4°C 'de soğutulmuş 20-40 ml %4 paraformaldehit (PFA) fiksatif dolaşım sisteminden geçirilerek fare dokuları fikse

edilmiştir. Karaciğer dokusunun renginin açılması, dolaşım sisteminden kanın uzaklaştırılmasının, fare kuyruğunun ve fare vücudunun oynatıldığında hareket kabiliyetinin azalması, dolaşım sisteminden fiksatifin yeterli geçtiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Fiksasyon sonrasında beyin çıkarılarak 1 gece %4 PFA fiksatifi içerisinde 4°C’de bekletilmiş, ardından kriyokoruyucu olması açısından %30’luk sükröz çözeltisi içerisinde alınarak 4°C’de kriyostat cihazında kesilene kadar saklanmıştır.

Beyin kesitlerinin holotomografik görüntülemesi ve doğrudan görüntülemesi için kesitler aynı beyinden seri beyin kesitleri olarak elde edilmiştir. 4°C’de %30’luk sükröz çözeltisi içerisinde bekletilen beyinler kriyostat cihazında kesit alınmadan hemen önce optimal kesme sıcaklığı (optimal cutting temperature, O.C.T) solüsyonu ile -20°C’de kaplanarak kesime hazır hale getirilmiştir. Korpus kallosum bölgesinin “gövde” olarak adlandırılan bölümünü içeren 5 µm, 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm ve 30 µm kalınlıklarında beyin kesitleri hazırlanmıştır. Holotomografi mikroskobunun çalışma mesafesine uygun numuneyi hazırlamak için, beyin kesitleri No:1.5H (0.17 mm) kalınlığındaki yüksek performanslı iki lamel arasına alınmış (0107222, Marienfeld Superior, Almanya) ve 0.09 mm kalınlığında çift taraflı bant aralık (spacer) olarak kullanılarak sandviç yöntemiyle iki lamel arasında örnek görüntülemeye hazır hale getirilmiştir. Refraktif indeksi (RI) 1.354 olan Sigma Fluoromount (F4680) sıvısı lameller içerisinde kullanılarak örneği kapamak için kullanılmıştır. Sonrasında hazırlanan örnekler holotomografi mikroskobu ile görüntülemesi yapılana kadar 4°C’de yatay şekilde saklanmıştır.

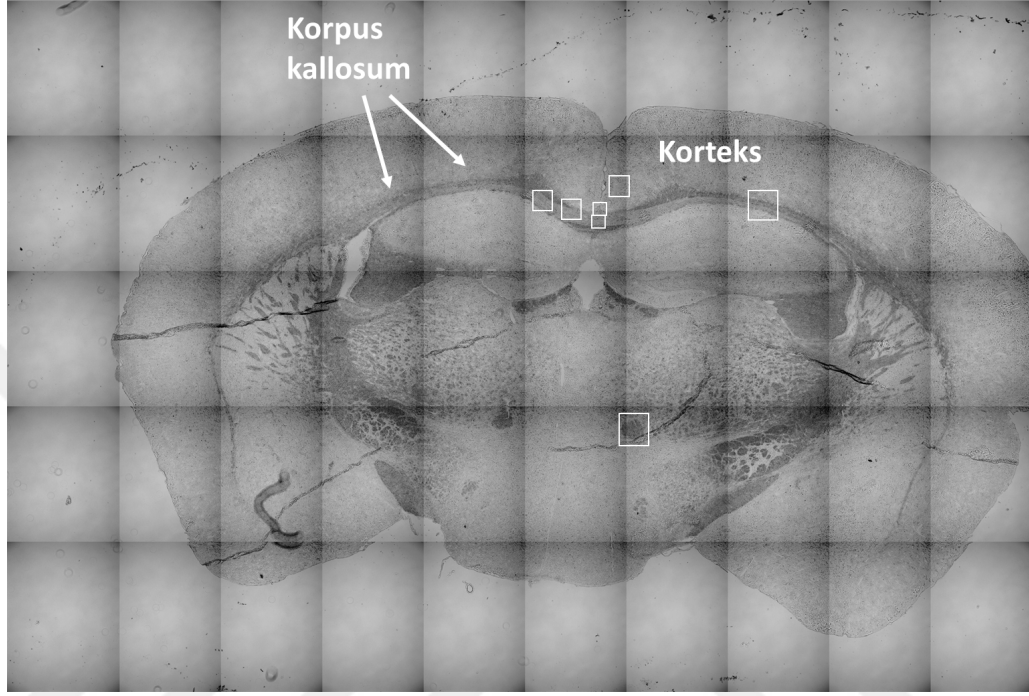
5.6.5. Konfokal mikroskobu ile örnekleri görüntüleme ve kontrol

Prizma JD1989 faresinin beyin kesitlerinin görüntüleri, Zeiss LSM780 lazer taramalı konfokal mikroskobunda 20x objektif kullanılarak elde edilmiştir. Beyin kesiti büyük bir alanı kapsadığından görüntüler birçok parça halinde ve z-katmanları olarak alınmış, son görüntüler bu görüntülerin birleştirilmesi ve maksimum yoğunluk projeksiyonu ile elde edilmiştir. Görüntüleri hazırlama ve analizler için Zen programı (Zeiss) ve Fiji kullanılmıştır.

5.6.6. Işık mikroskobunda beyin kesitinin genel görüntüsünün alınması

Hazırlanan beyin kesitleri, faz mikroskobunda lokasyon bulma konusunda elimizde kılavuz şablon olması için önce ışık mikroskobunda faz kontrast ayarında ya

da geniş alan ayarında genel görünümü çekilmiştir. Görüntülerdeki gözle ayırt edilebilen dokudaki boşluklar, karartılar gibi ayrıntılar, faz mikroskobunda geniş alan ayarında tomografik görüntüsünü almak istediğimiz bölgeleri seçmekte kullanılmıştır (Şekil 5.6.6.1).



Şekil 5.6.6.1: Hazırlanan beyin kesitlerinin ışık mikroskobunda görüntülenmesi. 3 boyutlu faz ve floresan mikroskobunda çekilecek bölgeleri seçebilmek için hazırlanan beyin kesitleri önce ışık mikroskobunda görüntülenmiştir. Beyin üzerindeki spesifik yapılar (korteks, hipotalamus, ventriküller gibi) ve doku üzerindeki noktalar, boşluklar, karartılar gibi küçük detaylar, korpus kallosum üzerinde tomografik çekim yapılan alanları seçmek için kılavuz olarak kullanılmıştır. Bu beyin kesiti 5 μm 'luk WT fare beyin kesitine ait olup, kare ile işaretli alanlar holotomografik çekim yapılan alanları göstermektedir.

5.6.7. Holotomografik görüntüleme ve optimizasyonlar

Görüntüleme yapılmadan yarım saat öncesinde örnekler oda sıcaklığına getirilmiştir. Örnek 3 boyutlu nicel faz ve floresan mikroskobuna yerleştirilerek objektif ve yoğunlaştırıcı (condenser) arası çalışma aralığı (working distance), ve tomografik tarama için lazer ışık yolu ayarları/kontrolleri yapılmıştır. Beyin kesitlerinde miyelince zengin bölge olan korpus kallosum bölgesinden en az üç, miyelinin daha az miktarda ya da dağınık bulunduğu beynin diğer bölgelerinden (korteks ve striatum gibi) birer görüş alanının (field of view) holotomografi mikroskobu ile görüntülenmiştir. Holotomografik görüntüleme için motorlu bir gimbal

ayna (OMG-T4A, Zaber, Kanada) ile özelleştirilmiş bir off-axis Mach Zehnder enterferometrik mikroskobu kullanılmıştır. Koherent lazer ışığı ($\lambda = 520$ nm) referans ve nesne kolları olarak iki kola ayrılmıştır. Nesne kolundaki motorlu gimbal ayna, iki 4-f görüntüleme sistemi aracılığıyla numune düzlemine bağlanmıştır. 4-f sistemlerinin son elemanı olarak, yüksek sayısal açıklıklı mikroskop objektifi (CFI Plan Fluor 60x, 0.85 NA; Nikon Instruments Inc., ABD) geniş bir tepe açısına sahip bir koni üzerinde aydınlatma açısı taraması sağlar. Numune saçılması, aynı özelliklere sahip başka bir mikroskop objektifi (CFI Plan Fluor 60x, 0.85 NA; Nikon Instruments Inc., ABD) tarafından toplanmış ve bir tüp mercekten ($f=200$ mm, ITL200; Thorlabs Inc.) geçtikten sonra bir CMOS kameraya (UI-3060CP-M-GL, IDS Imaging, Almanya) görüntülenmiştir. Her tomografik alım için, farklı aydınlatma yönlerinden 45 saniye içinde numunenin 100 off-axis holografik görüntüsü elde edilmiştir. Her off-axis hologramdan, 2D karmaşık alan elde edilmiştir. Elde edilen saçılma alanları, Rytov Yaklaşımı yoluyla 3D kırılma indeksi dağılımını yeniden oluşturmak için 3D Fourier alanında sentezlenmiştir (114). İlk görüntü işleme ve ham verilerin yeniden eşlemesinden sonra, işlenen görüntüler niteliksel ve/veya niceliksel olarak analiz edilmiştir.

5.6.8. Optimal kesit kalınlığının belirlenmesi

Nicel faz mikroskobu ile miyelinin katmanlı yapısının ışığı farklı kırmasından yararlanarak miyelini işaretli görüntüleyebilmek için öncelikle farklı doku kalınlıklarını deneyerek miyelinin en iyi görüntüleyebildiğimiz kesit kalınlığı belirlenmiştir. Bunun için WT fareden 5 μ m, 10 μ m, 15 μ m, 20 μ m, 25 μ m ve 30 μ m kalınlıklarındaki beyin doku kesitleri yukarıda anlatılan yöntemlerle hazırlanmıştır.

5 μ m, 10 μ m, 15 μ m, 20 μ m, 25 μ m ve 30 μ m olmak üzere altı farklı doku kalınlığındaki örneklerde miyelin görüntüledikten sonra görüntüler nitel olarak karşılaştırılarak miyelinin daha iyi ve net görüldüğü doku kalınlığı 5 μ m olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Bölüm 6.8.1’de verilmiştir. İleri ki aşamalarda bu kalınlıktaki örnekler görüntüleme için kullanılmıştır.

Beyin kesitlerinde miyelince zengin bölge olan korpus kallosum bölgesinden en az üç, miyelinin daha az miktarda ya da dağınık bulunduğu beynin diğer bölgelerinden (korteks ve striatum gibi) birer görüş alanı (field of view) holotomografik görüntüleme ile görüntülenmiştir.

5.6.9. Niceliksel analiz ve g_e-ratio hesaplamaları

MATLAB ile işlenmiş görüntüler Fiji programında niceliksel miyelin analizi için her holotomografik görüntüdeki miyelin-akson-miyelin profilleri üzerine düz çizgi çekilerek kırılma indeksi ve mesafe bilgileri grafik olarak oluşturulmuştur. Bu grafikler üzerindeki hesaplama yapmak istediğimiz noktalardaki bilgileri çekebilecek MATLAB kodları yazılarak görüntü işleme ve hesaplamalar yapılmıştır. Yarı maksimumdaki tam genişlikte (FWHM) genişlik (W_f) ve $n_{\max 1}$ ile $n_{\max 2}$ arasındaki mesafe (w_p) MATLAB'da yazılan kod ile hesaplanmıştır. Maksimum kırılma indeksleri ($n_{\max 1}$, $n_{\max 2}$), W_f ve w_p değerleri g_e-ratio hesaplamasında kullanılmıştır. Kwon ve arkadaşlarının ölçümlerinin senaryomuza uygulanmasıyla, miyelin kalınlığı ve g_e-ratio hesaplanması için aşağıdaki formülasyonlar oluşturulmuştur (116). d_e ve D_e , sırasıyla iyi bilinen g_e-ratio= d/D formülündeki d (akson çapı) ve D (miyelinli aksonun dış çapı) için hesaplanan değerlerdir. Kriter (c) hesaplaması için maksimum kırılma indekslerinin ortalaması ($\overline{n_{\max}}$) kullanılmıştır, bu da ortalama $n_{\max}$ 'a göre tahmini miyelin kalınlığını (t_{myelin}) temsil eder (Denklemler 1-3). α , β , g ve z , görüntüleme sistemi parametrelerine bağlı olarak değerleri değişen katsayılardır. Holotomografi sistemi için bu katsayılar ampirik olarak $\alpha = 209.5$, $\beta = 286.7$, $g = 36$ ve $z = 34$ olarak hesaplanmıştır.

$$\overline{n_{\max}} = (n_{\max 1} + n_{\max 2})/2 \quad (1)$$

$$c = \alpha \cdot \overline{n_{\max}} - \beta \quad (2)$$

$$t_{myelin} = \gamma \cdot c + \zeta \quad (3)$$

$$g_e - ratio = d_e/D_e \begin{cases} D_e = 2W_f - w_p \text{ and } d_e = D_e - t_{myelin} & \text{for } c < 18 \\ D_e = W_f + 275 \text{ and } d_e = w_f - 235 & \text{for } c \geq 18 \end{cases} \quad (4)$$

$$\quad (5)$$

WT fare korpus kallosum bölgesinden incelediğimiz 164 profilden 160'ı g_e-ratio hesaplama yöntemimizin doğrulanması için kullanılmıştır. Remiyelinizasyon gerçekleşikten sonra oluşan miyelini göstermek için ve g_e-ratio hesaplama yöntemimizin her koşulda işlevsel olduğunu gösterebilmek amacıyla, remiyelinizasyon profillerinden 94 profilden 93'ü ve kontrol grubundan tüm 91 profil çalışmaya dahil edilmiştir. Bir aksonun miyelinli olarak sayılması için, aksonu

evreleyen en az bir miyelin tabakası olması gerekmektedir. Miyelin tabakalarını temsil eden kriter olarak, $kriter < 1$ olan veri noktaları çalışmadan çıkarılmıştır.

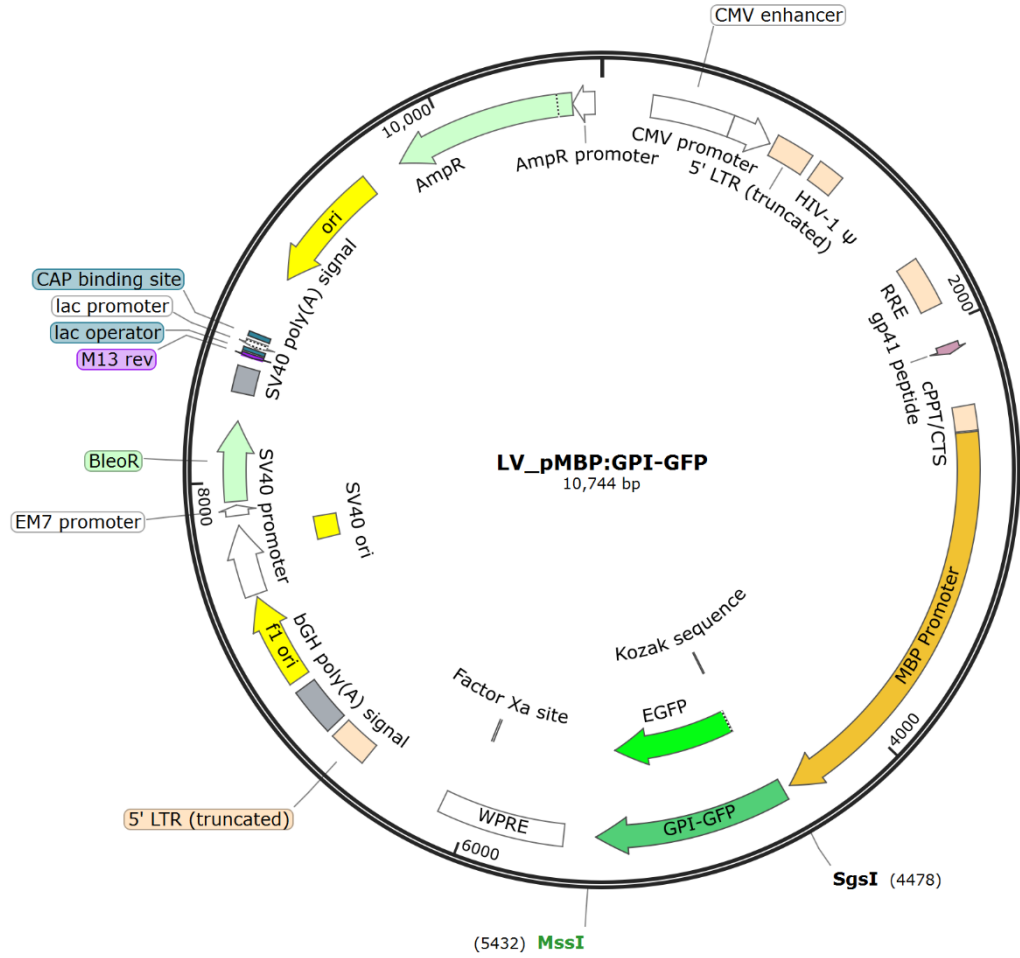


6. BULGULAR

6.1. MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG Plazmidlerinin Klonlama ile Elde Edilmesi

6.1.1. MBP:GPI-GFP plazmidinin elde edilmesi

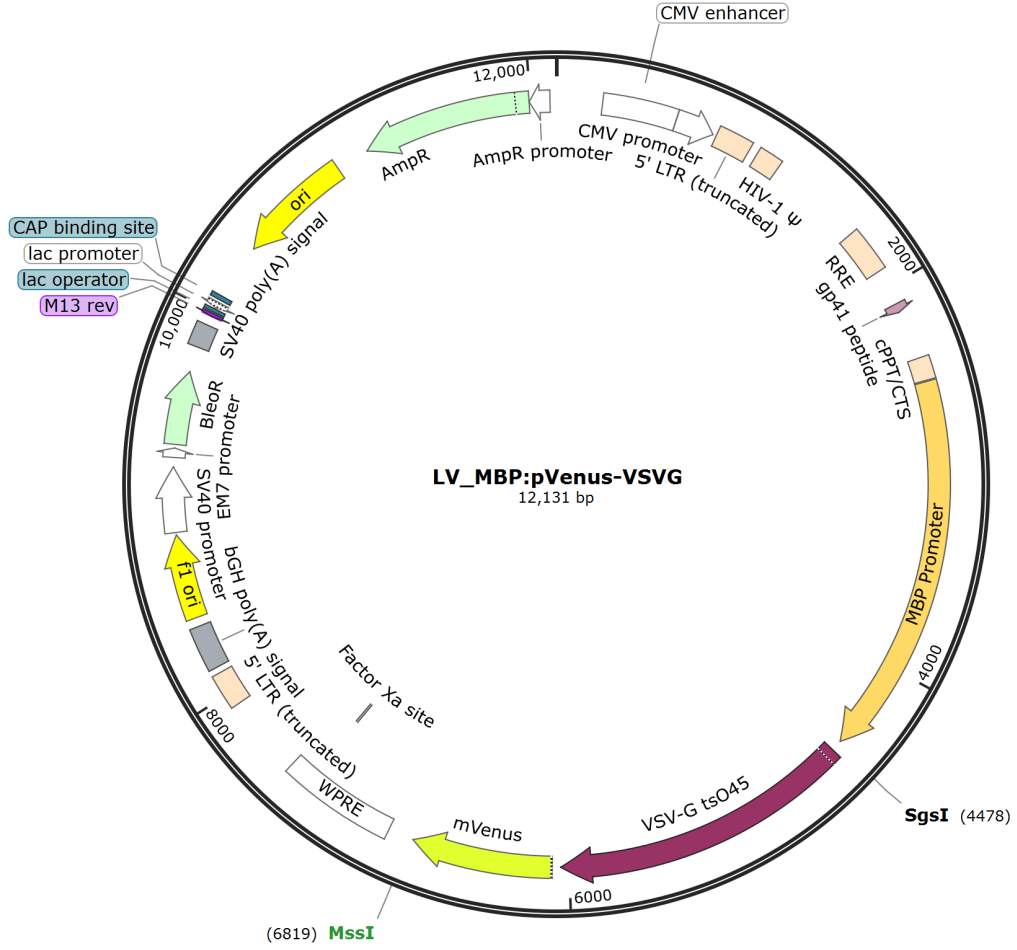
Miyelinleme aşamasındaki oligodendrositlerde GPI-GFP sekansının ifade edilmesini amaçladığımız için GPI-GFP sekansı, MBP promotörü altına Bölüm 5.2.1.2’de anlatıldığı şekilde klonlanmıştır. Elde edilen plazmit haritası Şekil 6.1.1.1’de gösterilmiştir. Böylelikle aynı zamanda MBP:GPI-GFP lentivirüsü üretiminde kullanabileceğimiz plazmit elde edilmiştir. Eklenen sekans PZR reaksiyonu ile çoğaltıldığı için herhangi bir mutasyon ihtimaline karşı doğrulama ve sekanslama aşamalarından geçirilmiştir.



Şekil 6.1.1.1: Klonlama ile elde edilen pMBP:GPI-GFP plazmidinin gösterimi. Sarı renkli kısım MBP promotörünü, yeşil ile vurgulanan kısım GPI-GFP sekansını göstermektedir. GPI-GFP sekansı SgsI ve MssI kesim bölgelerinden MBP promotörünü içeren lentiviral vektöre klonlanmıştır. Sonuçta 10.744 bp uzunluğunda plazmid elde edilmiştir. Bu plazmid, çoğaltma ve sekanslama ile doğrulama sonrasında üretilen lentivirüs parçacıkları ile oligodendrosit hücrelerinde GPI-GFP ifadesi için kullanılmıştır.

6.1.2. MBP:Venus-VSVG plazmidinin klonlama ile elde edilmesi

Miyelinleme aşamasındaki oligodendrositlerde Venus-VSVG sekansının ifade edilmesini amaçladığımız için Venus-VSVG sekansı, MBP promotörü altına Bölüm 5.2.1.3’de anlatıldığı şekilde klonlanmıştır. Elde edilen plazmit haritası Şekil 6.1.2.1’de gösterilmiştir. Böylelikle aynı zamanda MBP:Venus-VSVG lentivirüsü üretiminde kullanabileceğimiz plazmit elde edilmiştir. Eklenen sekans PZR reaksiyonu ile çoğaltıldığı için herhangi bir mutasyon ihtimaline karşı doğrulama aşamalarından geçirilmiştir.



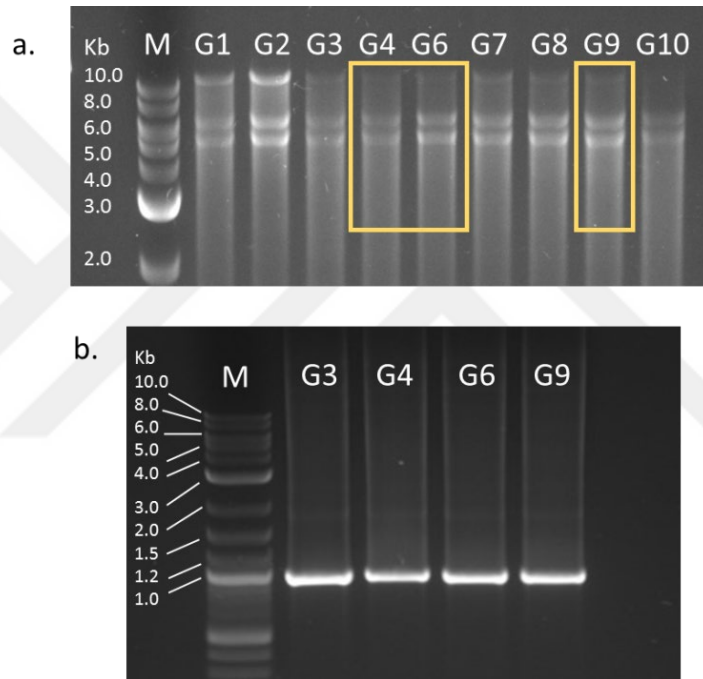
Şekil 6.1.2.1: Klonlama ile elde edilen MBP:Venus-VSVG plazmidinin gösterimi. Sarı renkli kısım MBP promotörünü, kırmızı ile vurgulanan kısım VSVG sekansını, yeşil ile vurgulanan kısım mVenus sekansını göstermektedir. Venus-VSVG sekansı SgsI ve MssI kesim bölgelerinden MBP promotörünü içeren lentiviral vektöre klonlanmıştır. Sonuçta 12.131 bp uzunluğunda plazmid elde edilmiştir. Bu plazmid, çoğaltma ve sekanslama sonrasında oligodendrosit hücrelerinde Venus-VSVG ifadesi ile kargo veziküllerini takip etmek için kullanılmıştır.

6.2. MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG Plazmidlerinin Doğrulaması

6.2.1. MBP:GPI-GFP plazmidinin kesim enzimleri ve PZR ile doğrulanması

Ligasyon işlemi ve bakterilere transformasyon sonrasında üretilen MBP:GPI-GFP plazmitini doğrulama için amfisilinli besi yerinde büyüyen bakteri kolonileri arasından seçilen 9 koloni tekrar amfisilin bulunan LB içerisinde büyütülmüştür ve her koloniden plazmit izolasyonu yapılmıştır. İlk olarak, XhoI ve NdeI enzimleri ile

kesilerek plazmidlerin doğruluğu test edilmiştir (Şekil 6.2.1.1.a). Beklenen bant uzunluklarını veren G3, G4, G6 ve G9 kodlu plazmitler, GPI-GFP bölgesinin bulunduğu bir kez daha doğrulanması için seçilmiştir. Bu dört plazmitte bulunması beklenen GPI-GFP bölgesinin klonlama aşamasında kullanılan primerler ile (Tablo 5.2.1.2.1) yeniden PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve eklenen bölgenin varlığı doğrulanmıştır (Şekil 6.2.1.1.b). Bu aşamaya kadar olan işlemlerde herhangi bir mutasyon eklenip eklenmediğinin kontrol edilmesi amacıyla DNA sekanslaması için G4, G6 ve G9 plazmitleri sekanslamaya gönderilmiştir.



Şekil 6.2.1.1: Klonlama ile elde edilen MBP:GPI-GFP plazmidinin doğrulanması. a. G1-G10 numaralı kolonilerden elde edilen MBP:GPI-GFP plazmidlerinin XhoI ve NdeI enzimleri ile kesilerek doğrulanması. MBP:GPI-GFP plazmid toplam uzunluğu: 10,753 bp; XhoI ve NdeI enzimleri ile kestikten sonra görülmesi beklenen bant uzunlukları: 5932 bp ve 4812 bp. b. G3-G4-G6 ve G9 plazmidlerinin PCR ile doğrulanması. GPI-GFP PZR ürününü beklenen uzunluğu: 953 bp. M: Marker.

6.2.2. MBP:GPI-GFP plazmidinin sekanslama ile kontrolü

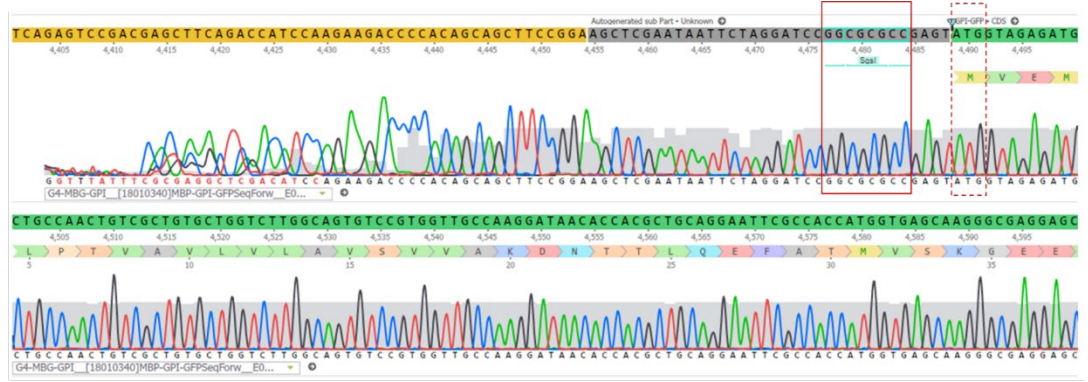
PZR reaksiyonu ile kesim uçları eklenerek çoğaltılan 953 bp uzunluğundaki GPI-GFP parçası, olası mutasyonları tespit edebilmek için sekanslanmıştır. Tek yönlü bir sekanslama reaksiyonu yaklaşık 800-1000 bp'lik bir bölgeyi kapsadığından klonlanan bölgenin 100 bp kadar dışından tasarlanan forward ve reverse iki farklı

primer, sekanslamak istediğimiz bölgeyi kapsamıştır (Tablo 5.2.2.3.1, ortak primerler). Sekanslama sonucuna örnek olarak

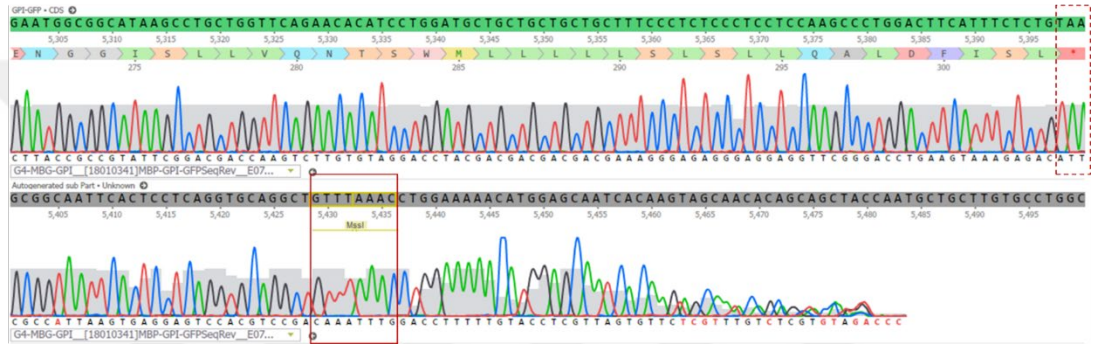
Şekil 6.2.2.1’de görülebilir. Yapılan sekanslama sonucunda G4 numaralı plazmidde herhangi bir mutasyona rastlanmamış, lentivirüs üretimi için bu plazmid kullanılmıştır. G6 numaralı MBP:GPI-GFP plazmid klonunda klonlama yapılan GPI-GFP bölgesinde toplam olarak üç mutasyon gözlenmiştir. Bunlardan iki tanesi amino asid değişikliğine neden olmaktadır. G4 ve G9 plazmidlerinde GPI-GFP bölgesinde mutasyon gözlenmemiştir. Lentivirüs üretimine G4 plazmidi ile devam edilirken G9 plazmidi yedekte saklanmıştır.



a.



b.

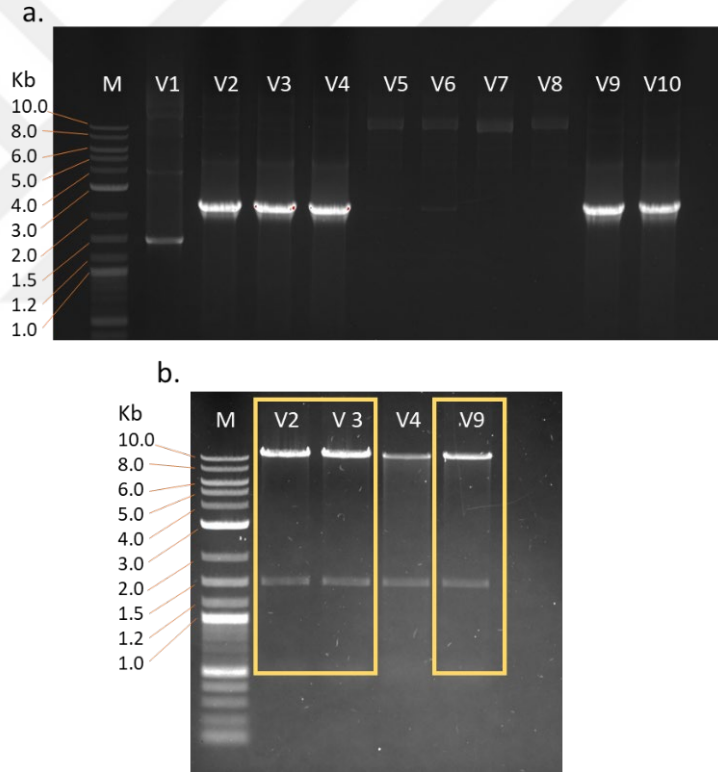


Şekil 6.2.2.1: Üretilen MBP:GPI-GFP plazmidinin 5'-ucu (a) ve 3'-ucuna (b) ait klonlama bölgesinin sekanslama sonuçları. DNA sekansında sarı ile vurgulanan alan MBP promotör dizisine, yeşil ile vurgulanan alan GPI-GFP proteinin DNA dizisine, gri ile gösterilen alan bağlantı DNA bölgesine aittir. Kırmızı düz çizgi ile gösterilen karelerde klonlama için kullanılan SgsI (a) ve MssI (b) enzimlerin kestiği ve tekrar yapılandırıldığı bölgeler görülmektedir. GPI-GFP'nin başlangıç (a) ve bitiş (b) kodonları kesikli çizgi ile gösterilmiştir.

6.2.3. MBP:Venus-VSVG plazmidinin kesim enzimleri ve PZR ile doğrulanması

Seçilen 10 koloniden izole edilen plazmidler, Venus-VSVG sekansının varlığını tespit edebilmek amacıyla önce bölgeyi çoğaltmak için kullandığımız primerler ile PZR yapılmıştır. Klonlanan Venus-VSVG sekansı 2346 bp uzunluğundadır. V2, V3, V4, V9 ve V10 numaralı plazmid klonlarında beklenen yerde bant görülmüş, Venus-VSVG sekansı varlığın doğrulanmıştır (Şekil 6.2.3.1.a).

Bu klonlardan V2, V3, V4 ve V9 numaralı olanlar ana vektörü doğrulamak ve DNA kalitesini görebilmek için EcoRI enzimi ile kesilmiştir (Şekil 6.2.3.1.b). Beklenen bant uzunluklarını gördüğümüz V2, V3 ve V9 plazmid klonları mutasyon kontrolü için sekanslamaya gönderilmiştir.



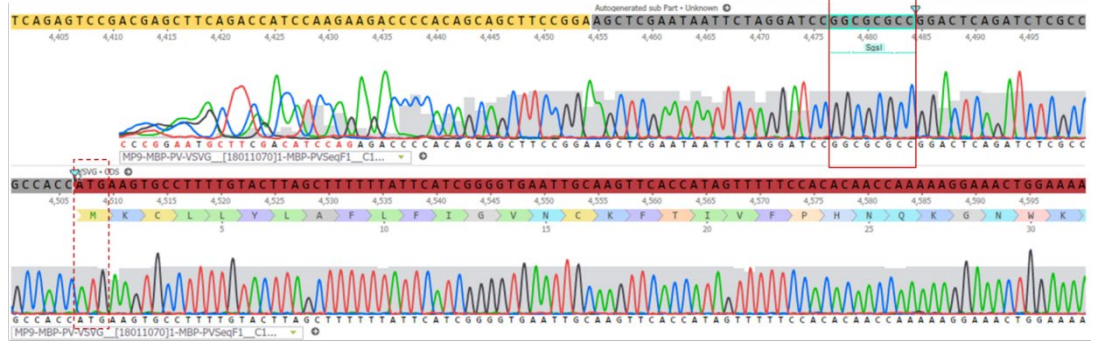
Şekil 6.2.3.1: Klonlama ile elde edilen MBP:Venus-VSVG plazmidinin doğrulanması. a. V1-V10 numaralı kolonilerden elde edilen plazmidlerin PZR ile doğrulanması. Venus-VSVG PZR ürününü beklenen uzunluğu: 2346 bp. b. V2, V3, V4, V9 plazmidlerinin EcoRI enzimi ile kesilerek doğrulanması. MBP:Venus-VSVG plazmid toplam uzunluğu: 12,131 bp; EcoRI enzimi ile kestikten sonra görülmesi beklenen bant uzunlukları: 10650 bp ve 1481 bp. M: Marker.

6.2.4. MBP:Venus-VSVG plazmidinin sekanslama ile kontrolü

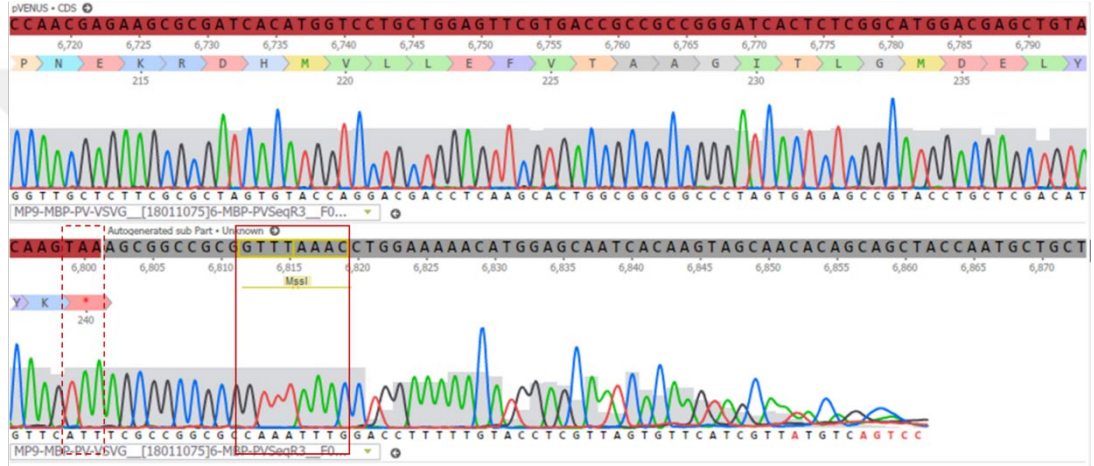
PZR reaksiyonu ile çoğaltılan 2346 bp uzunluğundaki Venus-VSVG parçasındaki olası mutasyonları tespit edebilmek için klonlama sonrası elde edilen V2, V3 ve V9 plazmid klonları sekanslanmıştır. Tek yönlü bir sekanslama reaksiyonu yaklaşık 800-1000 bp'lik bir bölgeyi kapsadığından klonlanan bölgenin tümünü kapsayabilmek adına 100 bp kadar dışından tasarlanan forward ve reverse primerlerine ek olarak dizinin içinden ikişer forward ve ikişer reverse primerleri tasarlanmış, primerler Tablo 5.2.2.3.1'de verilmiştir. Sekanslama sonucuna örnek olarak Şekil 6.2.2.1'de görülebilir. Yapılan sekanslama sonucunda V9 numaralı plazmidde herhangi bir mutasyona rastlanmamış, MBP:Venus-VSVG lentivirüsü üretimi için bu plazmid kullanılmıştır.

MBP:Venus-VSVG plazmidinin V2, V3, V9 klonlarında üçünde de protein kodlayan bölge içinde ATG başlangıç kodonundan sonraki 150'inci (4656 no'lu) bazda G'den T'ye bir mutasyon gözlenmiştir. Bu mutasyon Lys amino asidinin Asp amino asidine dönüşmesine neden olmaktadır. Her üç plazmidde de gözleendiği için bunun orijinal olarak gelen plazmidde olduğu kabul edilmiştir. V2 plazmidinin protein kodlayan bölgesinde yukarıda bahsi geçen ortak mutasyon dışında üç tane mutasyon gözlenmiştir. Bunların iki tanesi kodlanan amino asidin değişmesine yol açmaktadır. V3 plazmidinin protein kodlayan bölgesinde ortak mutasyon dışında üç tane mutasyon gözlenmiştir. Bunların hepsi kodlanan amino asidin değişmesine yol açmaktadır. V9 plazmidinde ise ortak mutasyon dışında bir tane VSVG ve Venus proteinlerinin bağlantı bölgesinde Ala amino asidini Val amino asidine çeviren mutasyon gözlenmiştir. Hem bu iki amino asidin yapısının benzer olması hem de VSVG veya Venus proteinlerinde olmayıp sadece bağlantı bölgesinde bulunması nedeniyle bu mutasyonun bir sonuç doğurmayacağı düşünülmüştür. Son olarak V9 plazmidinde bir tane kodlanan amino asidi değiştirmeyen baz değişimi gözlenmiştir.

a.



b.

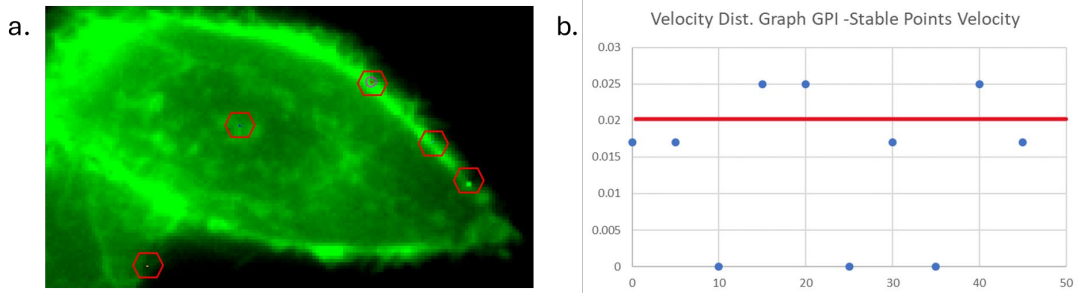


Şekil 6.2.4.1: Üretilen MBP:Venus-VSVG plazmidinin 5'-ucu (a) ve 3'-ucuna (b) ait klonlama bölgesinin sekanslama sonuçları. DNA sekansında sarı ile vurgulanan alan MBP promotör dizisine, kırmızı ile vurgulanan alan Venus-VSVG proteinin DNA dizisine, gri ile gösterilen alan bağlantı DNA bölgesine aittir. Kırmızı düz çizgi ile gösterilen karelerde klonlama için kullanılan SgsI (a) ve MssI (b) enzimlerin kestiği ve tekrar yapıştırıldığı bölgeler görülmektedir. Venus-VSVG'nin başlangıç (a) ve bitiş (b) kodonları kesikli çizgi ile gösterilmiştir.

6.3. HELA Hücre Hattında Vezikül Taşınımının İncelenmesi

6.3.1. Durağan noktaların tespiti için hücresel hareket hızının belirlenmesi

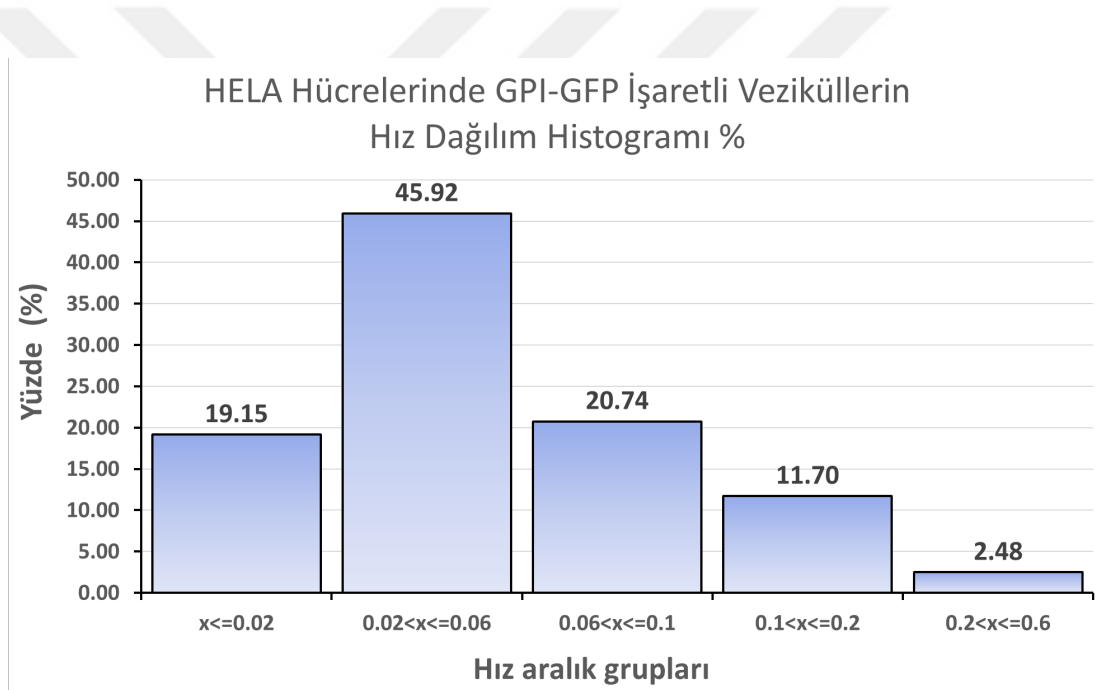
Klonlamada kullandığımız CAG:GPI-GFP ve CMV:Venus-VSVG plazmidleri ile vezikül takibi önce oligodendrosit hücreleri gibi karmaşık yapıda olmayan ve üretimi, büyümesi daha kolay ve hızlı olan HELA hücrelerinde incelenmiştir. Plazmidler bu hücrelere PEI ile verilmiş ve transfeksiyondan iki gün sonra mikroskop görüntülemesi yapılmıştır. HELA hücrelerindeki vezikül takibi, Bölüm 5.5.6'da anlatıldığı ve Şekil 5.5.6.1'de gösterildiği şekilde, görüntüleme süresi boyunca aralıklarla alınan görüntüler üzerinde tespit edilen vezikül lokasyonlarının incelenmesi ile yapılmıştır. Her bir görüntüdeki vezikül lokasyonları değişmekte ya da sabit kalmakta olup, programın bu lokasyonları kaydetmesi ve mesafe bilgisini çıkarması ile vezikül hareketine dair bilgiler elde edilmiştir. Takip etmek istediğimiz kargo veziküllerinin gerçek hareketinin tespit edilebilmesi ve durağan kabul edeceğimiz noktalar için bir limit (threshold) belirlemek amacıyla önce hücrenin olağan hareketi tespit edilmiştir. HELA hücresi üzerinde farklı noktalar seçilerek takip eden üç görüntü boyunca noktaların takibi yapılmış ve hızları çıkarılmıştır. Hızların dağılımına bakarak 0.02 mikron/sn threshold noktası olarak kabul edilmiş, bu hızın altındaki noktalar durağan, bu hızın üzerindeki noktalar ise hareketli olarak kabul edilmiştir.



Şekil 6.3.1.1: HELA hücrelerinde hücresel hareketin tespit edilmesi. Hücrenin farklı bölgelerinden işaretlenen noktalar takip eden üç görüntü boyunca takip edilerek hücrenin bazal hareketi çıkarılmıştır ve bunun için limit (threshold) 0.02 mikron/sn kabul edilmiştir. Bu limit altındaki hıza sahip noktalar durağan kabul edilmiştir.

6.3.2. HELA hücre hattında GPI-GFP işaretli lipid salları bulunan veziküllerin hareketinin incelenmesi

HELA hücrelerinde yeşil florasan ifadesi ile işaretlenmiş lipid sallarını taşıyan kargo vezikülleri her bir görüntüde tek tek işaretlenerek vezikül hareketlerinin takibi ve analizleri yapılmıştır. Bu görüntülerde veziküllerin bulunduğu noktalar yer değiştirme olarak alınmış ve hız hesaplamaları yapılmıştır. Bu grupta toplamda 23 vezikülün rota takibi yapılmış, toplamda 564 nokta işaretlenmiştir. Bu veziküllerin hızlı ve yavaş hareket ettiği, ya da durduğu noktaların dağılımı yüzde olarak Şekil 6.3.2.1’de, her hız aralığı grubundaki sayısal nokta dağılımları ise Tablo 6.3.2.1’de verilmiştir.



Şekil 6.3.2.1: Hela hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin hızlarının yüzdesel dağılım grafiği. Bu grupta durağandan farklı olarak yavaş hareketle hareket eden noktaların oranı %45.92 olarak görülmektedir ve en yüksek sayıda noktayı barındırmaktadır.

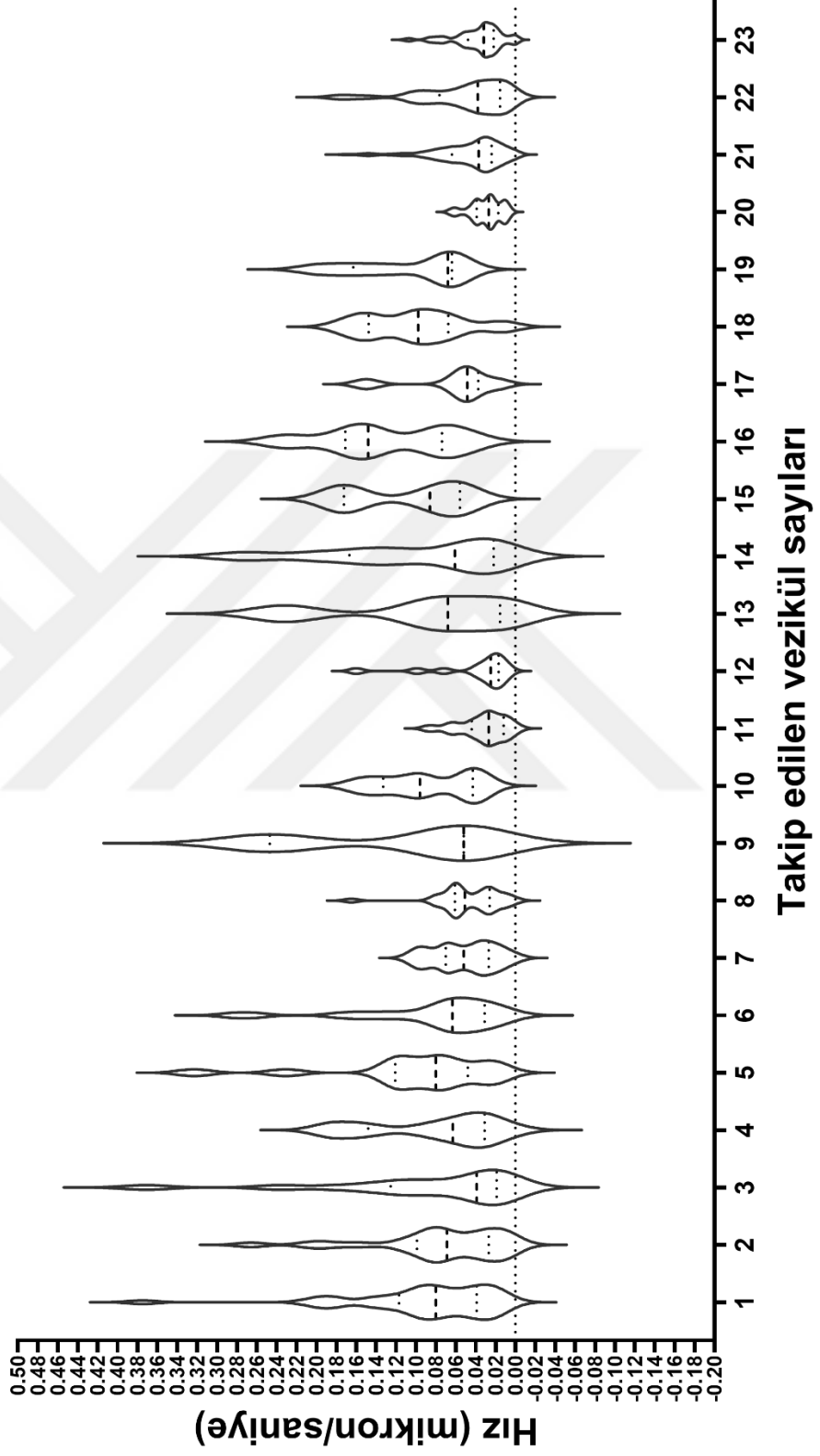
Tablo 6.3.2.1: Hela hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin sayısal hız dağılımları.

GPI-GFP	Hız Aralık Grupları (mikron/saniye)	Nokta Sayısı	Yüzde (%)
Durağan	$x \leq 0.02$	108	19.15
Hareketli	$0.02 < x \leq 0.06$	259	45.92
	$0.06 < x \leq 0.1$	117	20.74
	$0.1 < x \leq 0.2$	66	11.7
	$0.2 < x \leq 0.6$	14	2.48
	Toplam:	564	100

Şekil 6.3.2.1 ve Tablo 6.3.2.1 incelendiğinde, takip edilen toplam 23 vezikül rotasında bulunan 564 noktadan 108'inin (%19.15) durağan kabul ettiğimiz sınır olan 0.02 mikron/sn'ye eşit veya küçük olduğu görülmektedir. Yavaş hareketli kabul ettiğimiz 0.1 mikron/sn'ye kadar olan gruplarda 376 nokta tespit edilmiş olup, toplam noktaların % 66.66'sını oluşturmaktadır.

Mikroskopta çektiğimiz görüntüleri incelediğimizde bir vezikülün hareket rotası boyunca sürekli hareketli olduğu ya da sürekli durağan olduğu görülmemektedir. Örnek olarak, vezikül hareketine başladığında, bir miktar ilerleyip, bir miktar yavaş hareketle devam ettiği, durduğu, bazı durumlarda geri hareket ettiği, ya da birdenbire çok hızlı hareket ettiği gözlemlenmiştir. Bunu görünür kılabilmek adına, her bir vezikülün hareketi boyunca göstermiş olduğu hızlar Şekil 6.3.2.2'de gösterilmiştir. Burada da görüldüğü üzere, 1., 3. ve 5. vezikül gibi bazı veziküllerin çok hızlı hareket ettiği zamanlar olmuştur. 21., 22., 23. vezikül gibi bazı veziküllerin çoğunluk hareketinin 0.1 mikron/sn'nin altında, yavaş hareketle tamamlandığı görülmektedir.

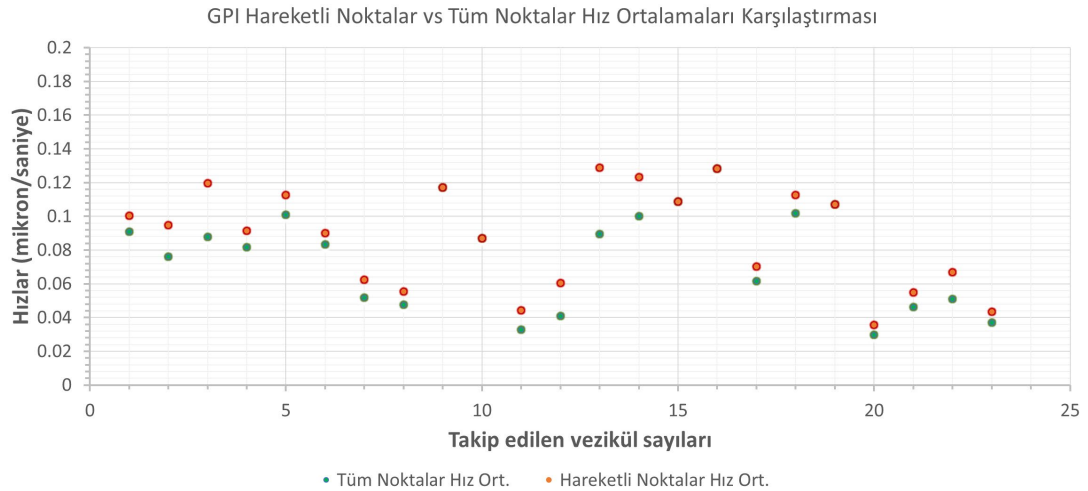
Hela Hücrelerinde İncelenen GPI-GFP İşaretli Her Bir Vezikülün Anlık Hız Dağılımı



Şekil 6.3.2.2: HELA hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli her bir vezikülün anlık hız dağılımı

Burada önemli diğer bir husus ise, veziküllerin takip boyunca başka vezikül topluluğunun içine girmesi ya da membrana yaklaşması dolayısıyla takibinin sonlanması sebebiyle veziküllerin incelenen görüntü sayıları değişiklik göstermektedir. Bu nedenle Şekil 6.3.2.2 incelendiğinde bazı veziküllerde izlenen daha az nokta, bazılarında daha fazla nokta görülmektedir.

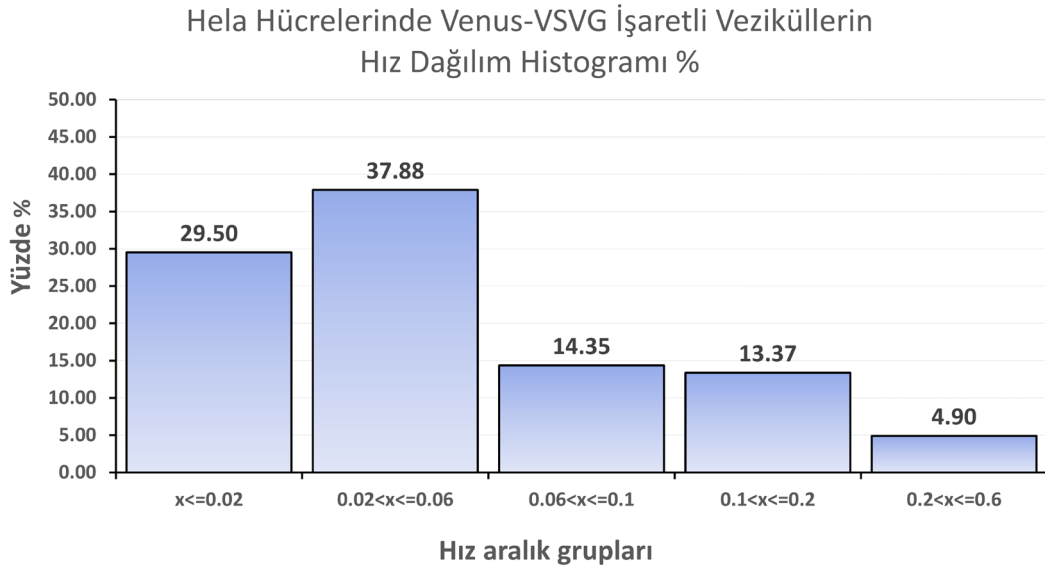
Bir vezikülün hareketi boyunca, sürekli hareket halinde mi, yoksa durağan olduğu zamanlar varsa hareketinin ne kadarını durağan geçirdiğini anlamak için bir vezikül hızları arasından 0.02 mikron/sn ve altındaki hızları çıkararak hareketli noktalar hız ortalaması çıkarılıp vezikülün hız ortalamasıyla karşılaştırılmıştır. Hareketli noktalar ortalaması ve total hız ortalaması ne kadar birbirine yakın ise, bu vezikül hareketi boyunca daha az durağan hareket göstermiş demektir. Birbirine ne kadar uzak iseler, vezikülün hareketi boyunca daha çok durduğu anlamına gelmektedir. Eğer üst üste denk geliyorsa, hareketi boyunca hiç durağan olmamış demektir. Şekil 6.3.2.3'te görüldüğü gibi, 3 ya da 13. veziküllerin bir miktar durduğu, 9., 10., 15, 16., ya da 19. veziküllerin rotaları boyunca sürekli hareketli oldukları görülmektedir.



Şekil 6.3.2.3: HELA hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli her bir vezikülün toplam ortalama hız ve hareketli olduğu hızların karşılaştırılması.

6.3.3. HELA hücre hattında Venus-VSVG işaretli veziküllerin hareketinin incelenmesi

HELA hücrelerinde Venus florasan ifadesi ile işaretlenmiş kargo vezikülleri her bir görüntüde tek tek işaretlenerek vezikül hareketlerinin takibi ve analizleri yapılmıştır. Bu görüntülerde veziküllerin bulunduğu noktalar yer değiştirme olarak alınmış ve hız hesaplamaları yapılmıştır. Bu grupta toplamda 52 vezikülün rota takibi yapılmış, toplamda 1122 nokta işaretlenmiştir. Bu veziküllerin hızlı ve yavaş hareket ettiği, ya da durduğu noktaların dağılımı yüzde olarak Şekil 6.3.3.1’de, her hız aralığı grubundaki sayısal nokta dağılımları ise Tablo 6.3.3.1’de verilmiştir.



Şekil 6.3.3.1: HELA hücrelerinde Venus-VSVG işaretli veziküllerin hız dağılım histogramı.

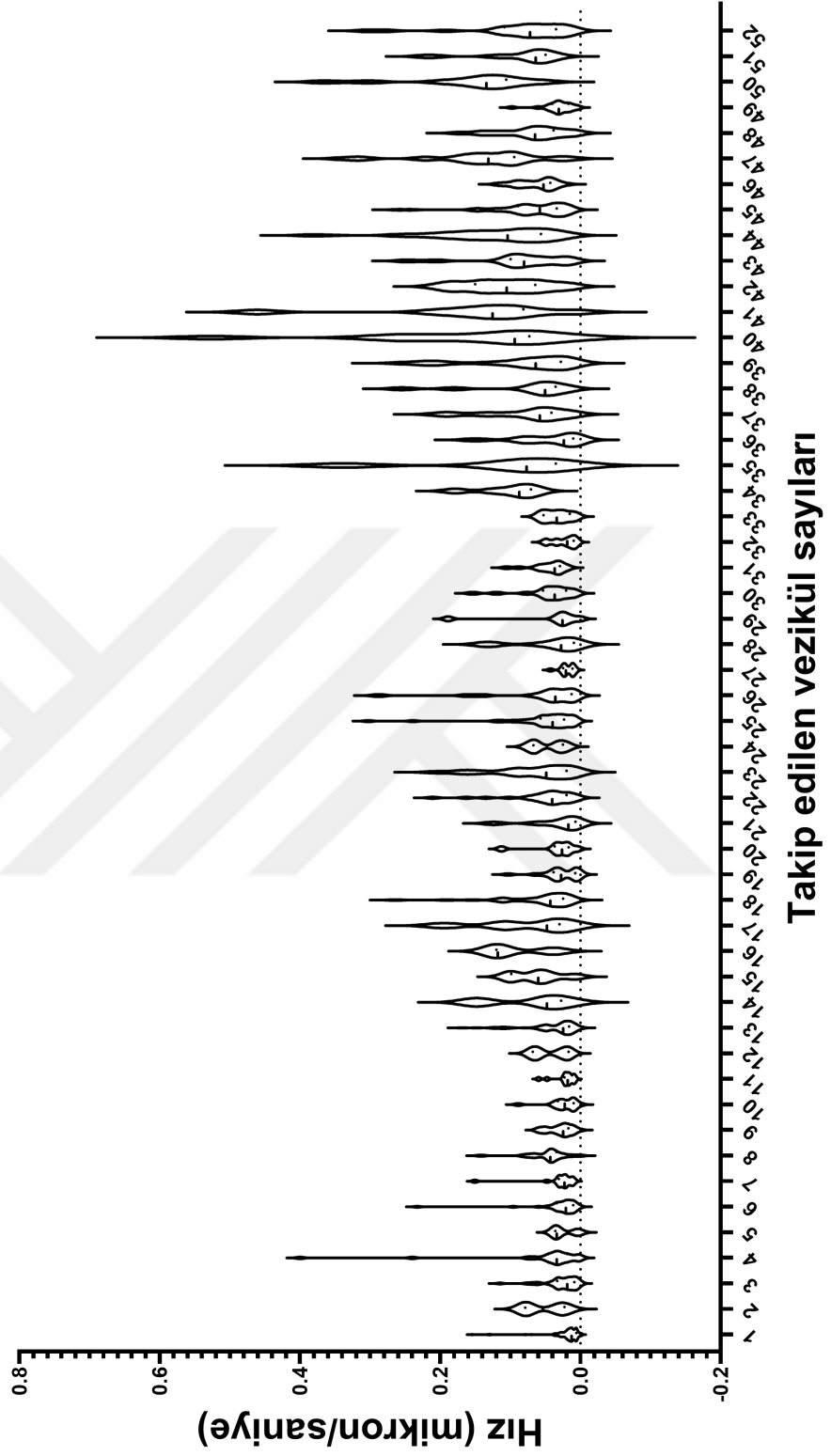
Şekil 6.3.3.1’teki bu dağılıma göre, Venus-VSVG işaretli veziküllerin durağan olduğu noktalar %29.5 oranında görülmüştür. $0.02 \mu/\text{sn}$ ’nin üzerinde olan hareketli kabul edilen noktaların oranı ise toplamda %70.5 ve yavaş hareketli grup %37.88 oranındadır. Hareketli noktalar arasında VSVG grubunda $0.2-0.6 \mu/\text{sn}$ aralığında en hareketli noktaların oranı %4.9’dur. Bu hız aralıklarında bulunan nokta sayıları Tablo 6.3.3.1’te verilmiştir.

Tablo 6.3.3.1: Hela hücrelerinde incelenen Venus-VSVG işaretli veziküllerin sahip olduğu hızlara göre gruplara dağılımı.

Venus-VSVG	Hız Aralık Grupları (mikron/saniye)	Nokta Sayısı	Yüzde (%)
Durağan	$x \leq 0.02$	331	29.5
Hareketli	$0.02 < x \leq 0.06$	425	37.88
	$0.06 < x \leq 0.1$	161	14.35
	$0.1 < x \leq 0.2$	150	13.37
	$0.2 < x \leq 0.6$	55	4.9
	Toplam:	1122	100

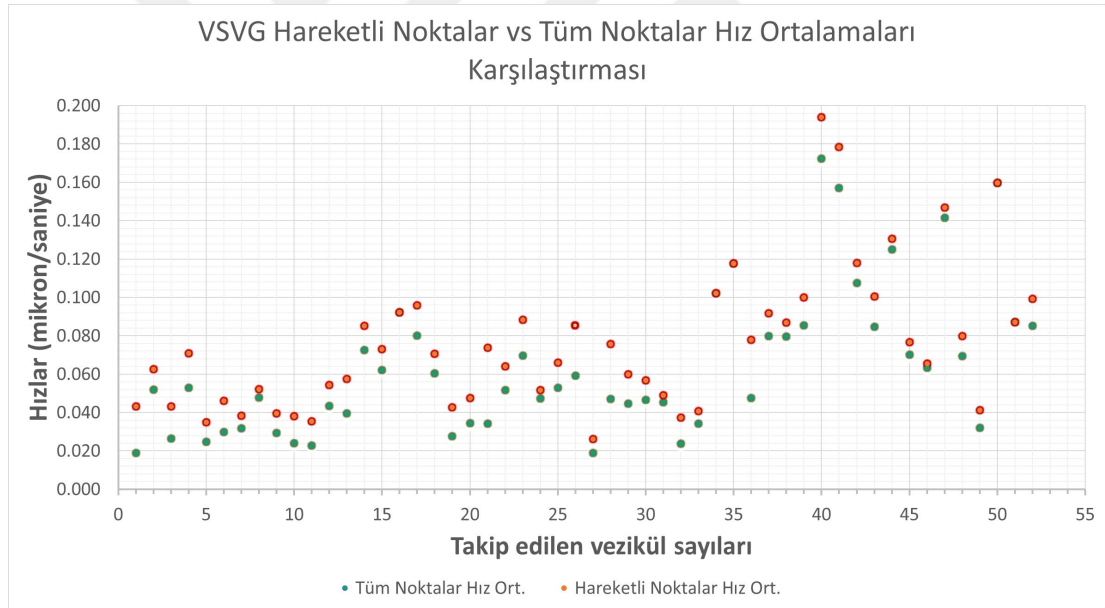
Vezikül hareketi boyunca ne kadar hızlı, ne kadar yavaş ve ne kadar durağan olduğunu göstermek amacıyla her bir veziküldeki hareket dağılımı incelenmiştir. Şekil 6.3.3.2’de görüldüğü üzere, bazı veziküllerin çok hızlı hareket ettiği zamanlar olmuştur. Dağılımın geneline bakıldığı zaman bazı veziküllerin çoğunluk hareketinin 0.6/0.8 mikron/sn’nin altında, yavaş hareketle tamamlandığı görülmektedir.

Hela Hücrelerinde İncelenen Venus-VSVG İşaretli Her Bir Vezikülün Anlık Hız Dağılımı



Şekil 6.3.3.2: HELA hücrelerinde incelenen Venus-VSVG işaretli her bir vezikülün anlık hız dağılımı

Bu grupta da bir vezikülün hareketi boyunca, sürekli hareket halinde mi, yoksa durağan olduğu zamanlar varsa hareketinin ne kadarını durağan geçirdiğini anlamak için bir vezikül hızları arasından 0.02 mikron/sn ve altındaki hızları çıkararak hareketli noktalar hız ortalaması çıkarılıp vezikülün hız ortalamasıyla karşılaştırılmıştır. Hareketli noktalar ortalaması ve total hız ortalaması ne kadar birbirine yakın ise, bu vezikül hareketi boyunca daha az durağan hareket göstermiş demektir. Birbirine ne kadar uzak iseler, vezikülün hareketi boyunca daha çok durduğu anlamına gelmektedir. Eğer üst üste denk geliyorsa, hareketi boyunca hiç durağan olmamış demektir. Şekil 6.3.3.3'te görüldüğü gibi, 3 ya da 13. veziküllerin bir miktar durduğu, 16., 34., 35. ya da 50. veziküllerin rotaları boyunca sürekli hareketli oldukları görülmektedir. 8. vezikül gibi, hareket boyunca durmanın en az olduğu veziküller görülmektedir.

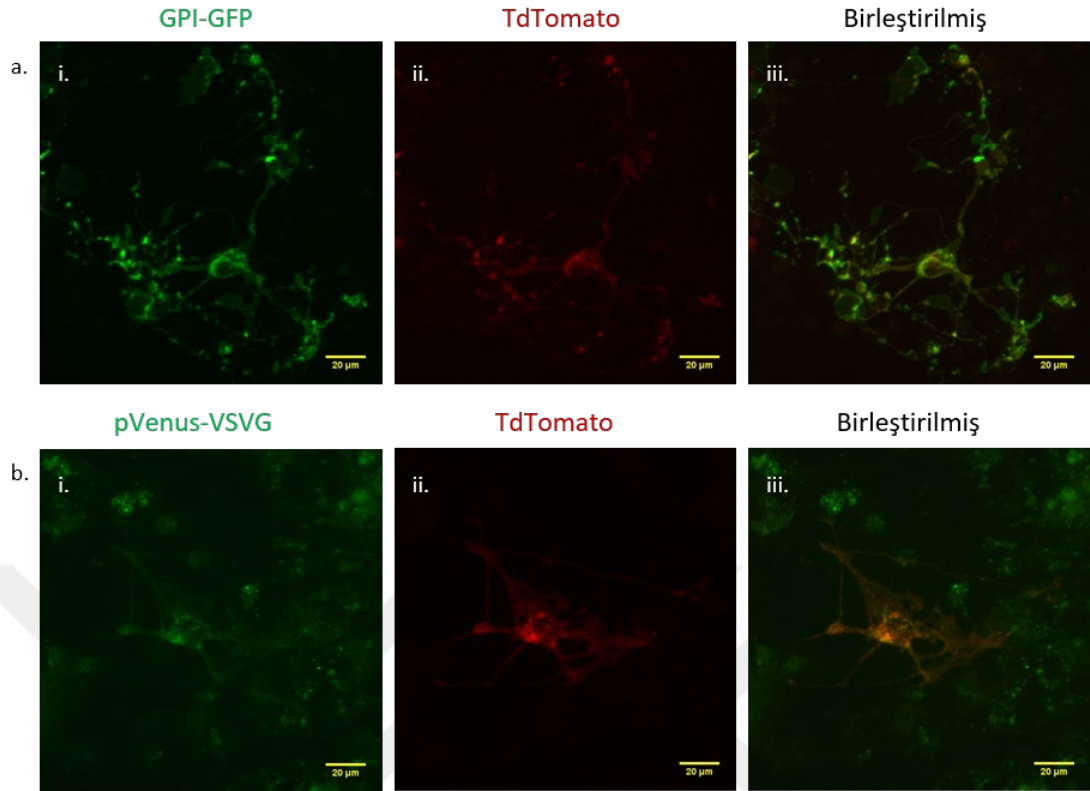


Şekil 6.3.3.3: HELA hücrelerinde incelenen Venus-VSVG işaretli her bir vezikülün toplam ortalama hız ve hareketli olduğu hızların karşılaştırılması.

6.4. Üretilen Lentivirüslerin Hücrelerde Test Edilmesi

Üretilen lentivirüsler oligodendrositlere verilerek oligodendrosit spesifik promotör altında istediğimiz proteinlerin oligodendrositlerde üretilip üretilmediği test edilmiştir. Bunun için Bölüm 5.5.2’de anlatılan yöntemle olgun oligodendrositler elde edildikten sonra oligodendrositlere üç gün aralıklarla MBP:TdTomato ve MBP:GPI-GFP virüsü veya MBP:TdTomato ve MBP:Venus-VSVG lentivirüsleri verilmiştir. GPI-GFP ile işaretlenen lipid sallarının ve Venus-VSVG ile işaretlenen kargo veziküllerinin oligodendrosit hücre içindeki hareketini ve membranla ilgili olabilecek ilişkisini anlayabilmek için, oligodendrosit hücresinin hatlarının belirlenmesi ve membranın işaretlenmesi amacıyla membrana yönelme sekansı taşıyan LckN sekansı bağlı TdTomato proteinin membrana yönelmesi ile sağlanmıştır.

Ürettiğimiz MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG virüslerinin oligodendrositleri enfekte ettiğini doğrulamak amacıyla, MBP promotörü sadece olgun-miyelin üreten oligodendrositlerde aktif olacağı için MBP:TdTomato virüsü ile enfekte ettiğimizde oligodendrositlerde ifade edilen TdTomato floresan proteininden aldığımız sinyal ile GFP ve Venus sinyallerinin tespit edildiği hücreler incelenmiştir. Spinning Disk Konfokal mikroskobu ile çektiğimiz görüntülerde MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG virüslerinin oligodendrositleri doğru bir şekilde enfekte ettiğini, GFP sinyali sayesinde GPI proteinin ve Venus sinyali sayesinde VSVG proteinin oligodendrositlerde üretildiği gözlemlenmiştir. MBP’ye bağlı olarak TdTomato üreten oligodendrositlerde bu sinyalleri görmemiz, istediğimiz proteinlerin oligodendrositlere özgü olarak ifade edildiğini doğrulamaktadır.

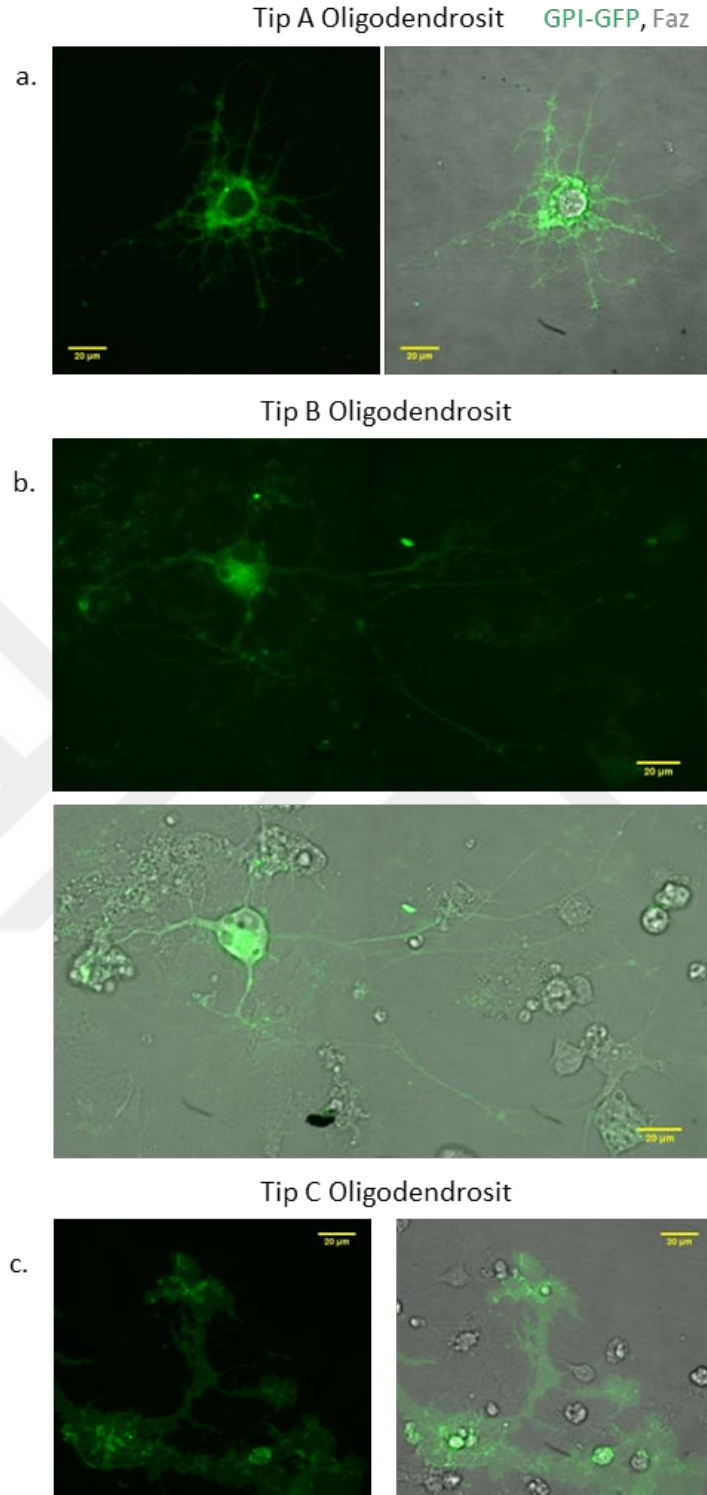


Şekil 6.4.1: Üretilen MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG lentivirüslerinin oligodendrositlerde test edilmesi. Yeşil renk, oligodendrosit spesifik MBP promotörü altında GPI-GFP (a.i ve a.iii) ya da Venus-VSVG (b.i ve b.iii) proteinlerinin ifadesini göstermektedir. Kırmızı renk, MBP-TdTomato lentivirüsü ile oligodendrosit spesifik ifade edilen TdTomato floresan proteinini göstermektedir (a.ii, a.iii, b.ii ve b.iii). Bu iki rengin aynı hücrelerde bulunması (a.iii ve b.iii), ürettiğimiz MBP:GPI-GFP ve MBP:Venus-VSVG lentivirüslerinin oligodendrosit spesifik protein ifadesini sağladığını göstermektedir. Bar: 20 µm.

Bu doğrulamalardan sonra, MBP:GPI-GFP lentivirüsü, oligodendrositlerde lipit sallarının oligodendrosit membranının normal zamanda genişleme ve miyelin üretimi sürecinde oligodendrosit membranına entegrasyonunun incelenmesi amacı ile kullanılmıştır. MBP:Venus-VSVG lentivirüsü ise oligodendrositlerde membrana lipit ve membran proteini taşıyan kargo veziküllerinin izlenmesi amacı ile kullanılmıştır. TdTomato proteinin membrana yönelmesi ise palmitilasyon sekansı ile sağlanmaktadır.

6.5. Oligodendrosit Hücrelerinin Morfolojik Sınıflandırılması

Yaptığımız canlı görüntülemelerde gözlemlediğimiz oligodendrositlerde, membrana kargo ve membran komponentlerinin taşınmasını daha iyi açıklayabilmek için oligodendrositler morfolojik olarak 3 farklı gruba ayrılmıştır. İnce uzantılarla yayılmış oligodendrositler tip A oligodendrosit (Şekil 6.5.1.a), gövdeden kalın, tüpü andıran bir yapıda uzantıları olan ve uzantılarının hafif yayılma/genişleme potansiyeli gösterdiği oligodendrositler tip B oligodendrosit (Şekil 6.5.1.b), tamamen yayılmış morfolojide olan oligodendrositler tip C oligodendrosit (Şekil 6.5.1.c) olarak gruplandırılmıştır. Tip A, olgun, miyelinlemek için ince uzantılarıyla ortamı tarayan, SARAPE modeline göre survey aşamasındaki oligodendrositi; Tip C, MBP'nin kompakt miyelin oluşturmak için polimerize olduğu aşamada olan oligodendrositi, tip B ise bu ikisi arasındaki seviyede olan ve survey aşamasına devam eden oligodendrositi göstermektedir.

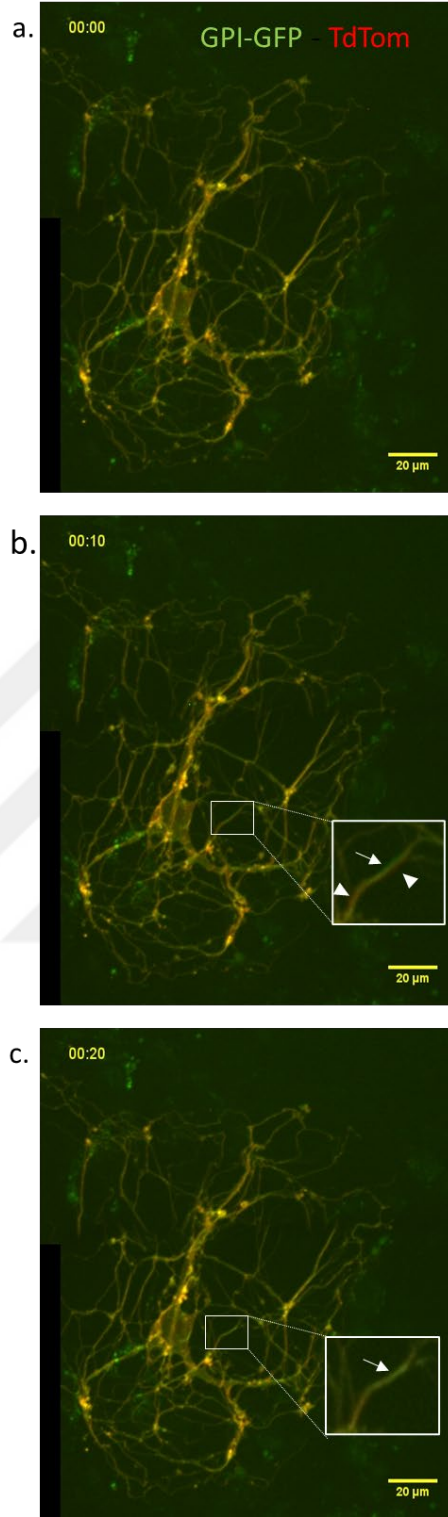


Şekil 6.5.1: 3 farklı morfolojide gözlemlenen oligodendrositlere örnekler. a. Tip A oligodendrosit, ince uzun uzantılar şeklinde. b. Tip B oligodendrosit, gövdeden çıkan kalın, tüp benzeri uzantılar şeklinde. c. Tip C oligodendrosit, yumurta akı gibi yayılmış bir şekilde. Yeşil: MBP:GPI-GFP ile enfekte edilmiş, GPI-GFP üreten oligodendrositleri göstermektedir. Faz: Hücre gövdelerini ve ortamda GPI-GFP üretmeyen diğer hücreleri göstermektedir. Bar: 20 µm.

6.6. Oligodendrosit Membranının Bir Bütün Olarak ve Membran Lipit Sallarının GPI Çapasına Bağlı Floresan Protein Kullanılarak İncelenmesi

Oligodendrositlerde miyelin membranının büyük çoğunluğunu lipitler oluşturmaktadır. Miyelin membranının sürekliliğinin sağlanması ve miyelinin sağlığının devamlılığı için oligodendrosit hücre gövdesinden miyelin membrana lipit taşınması büyük önem arz etmektedir. Oligodendrositlerde lipitlerin trafiğinin takip edilmesi için, lipit sallarına GPI çapa ile bağlı GFP floresan proteini kullanılmıştır. Lipit saları, oligodendrositlerin MBP:GPI-GFP lentivirüsü ile enfekte edilmesi sonrasında GPI çapa proteinine bağlı GFP proteinin ifade edilmesi ile işaretlenmişlerdir. Oligodendrositlerde hücre içinde ve membranda lipit sallarının takibi, GFP floresan proteininden aldığımız sinyali takip ederek yapılmıştır.

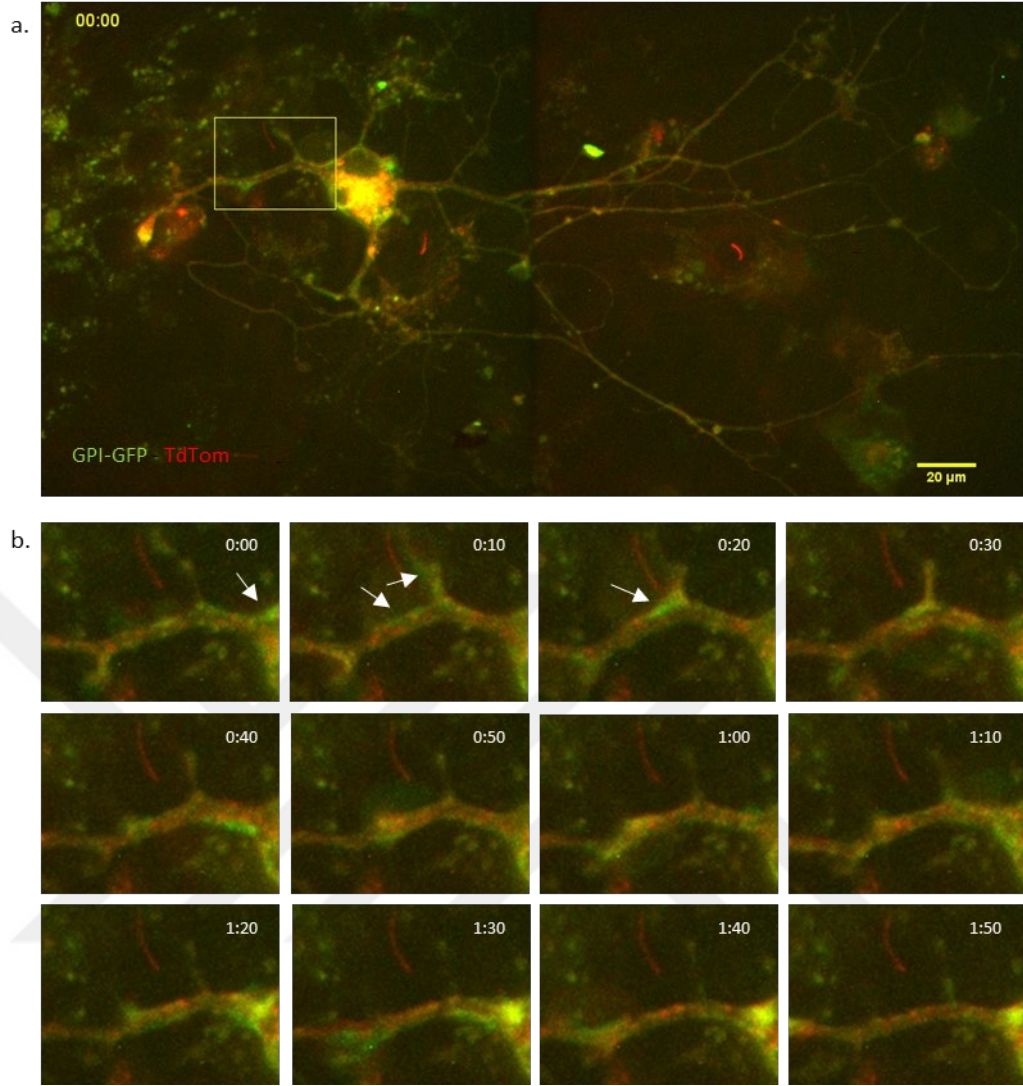
Yaptığımız canlı görüntülemelerde, GPI-GFP ifade eden 18 tane sağlıklı oligodendrosit hücresi incelenmiş, bu oligodendrositlerden 8 tanesi tip A oligodendrosit, 5 tanesi tip B oligodendrosit, 5 tanesi tip C oligodendrosit morfolojisinde gözlemlenmiştir (Şekil 6.6.1, Şekil 6.6.2, Şekil 6.6.3). Bu hücre tiplerinin hepsinde genel olarak oligodendrosit uzantılarında ve gövdelerinde aktif bir GPI-GFP hareketliliği gözlenmiştir. GPI-GFP sinyalinin hücre gövdesinde yoğun olarak bulunması, lipit sallarının beklendiği gibi Golgi cisimciğinde hazırlandığını ve salındığını göstermektedir.



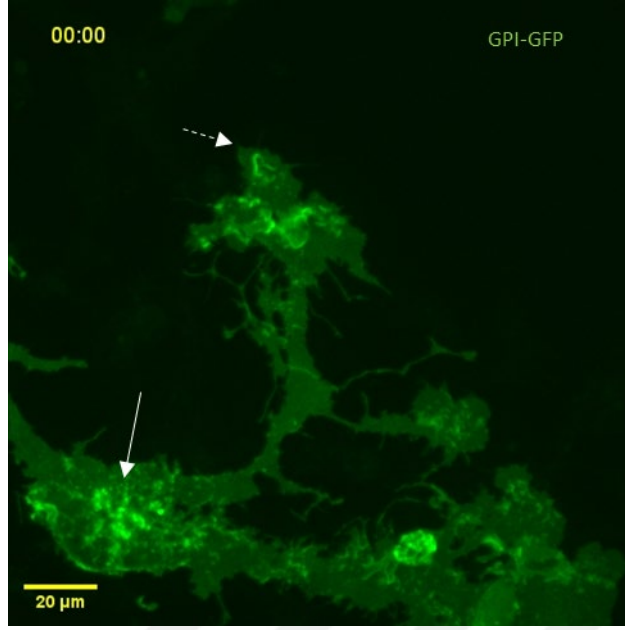
Şekil 6.6.1: Tip A oligodendrosit hücresi örneği. MBP:GPI-GFP ve MBP:TdTomato lentivirüsleri ile enfekte edilmiş, GPI-GFP ve TdTomato üreten Tip A oligodendrosit hücresine ait videonun ilk 20 dakikasına ait görüntüler. Görüntüler her 10 dakikada bir alınmıştır. Yeşil renk ve beyaz oklar GPI-GFP'yi, kırmızı renk ve beyaz ok başları TdTomato'ya aittir. Bar: 20 μ m.

GPI-GFP ifade eden tip B oligodendrositler detaylı incelendiğinde, GPI-GFP ifade eden Tip A oligodendrositlerde gözlemlenen GPI-GFP ve TdTomato'nun ayrı taşınması, Tip B oligodendrositlerde daha açık bir şekilde görülebilmektedir. Şekil 6.6.2.a'da GPI-GFP ifade eden Tip B oligodendrosit, Şekil 6.6.2.b'de ise Şekil 6.6.2.a'da sarı kare içerisinde gösterilen bölgenin birbirini takip eden zamanlarda alınmış görüntüleri görülmektedir. Tip B oligodendrositlerde gövdeden tüp şeklinde çıkan uzantılar, bizim gözlemlerimizi kolaylaştırmaktadır (Şekil 6.6.2.b, beyaz oklar). Bu hücre tipinde lipit sallarının tahmin edilen aksine her zaman uzantıların uçlarından itibaren değil, uzantıların gövdeye yakın bir bölgesinden membrana entegre olduğunu ve uzantı boyunca membran yüzeyinden ilerlediği gözlemlenmiştir (Şekil 6.6.2.b, beyaz oklar).

GPI-GFP ifade eden Tip A oligodendrositi yakından incelediğimizde (Şekil 6.6.1.b ve c; oklar: GFP, ok başları: TdTomato) bu iki proteinin de hücrede birbirinden ayrı taşındığı görülmektedir. Bu proteinlerin içinde bulunduğu kargoların birbirinden ayrı taşınması, oligodendrositlerde farklı moleküllerin farklı yollarla taşındığını öne sürmektedir.



Şekil 6.6.2: Tip B oligodendrosit hücresi örneği. MBP:GPI-GFP ve MBP:TdTomato lentivirüsleri ile enfekte edilmiş, GPI-GFP ve TdTomato üreten Tip B oligodendrosit hücresine ait görüntüler. a. Burada uzun süreli görüntülenen hücrenin ilk karesi gösterilmiştir. b. Kare içerisindeki bölgenin birbirini takip eden zamanlardaki görüntüsü. Görüntüler 10 dakikada bir kaydedilmiş olup, zaman ilerledikçe GPI-GFP sinyalinin kare içlerinde sol tarafa doğru yani hücrenin uzantısının ucuna doğru ilerlediği görülmektedir. Bar: 20 μm.



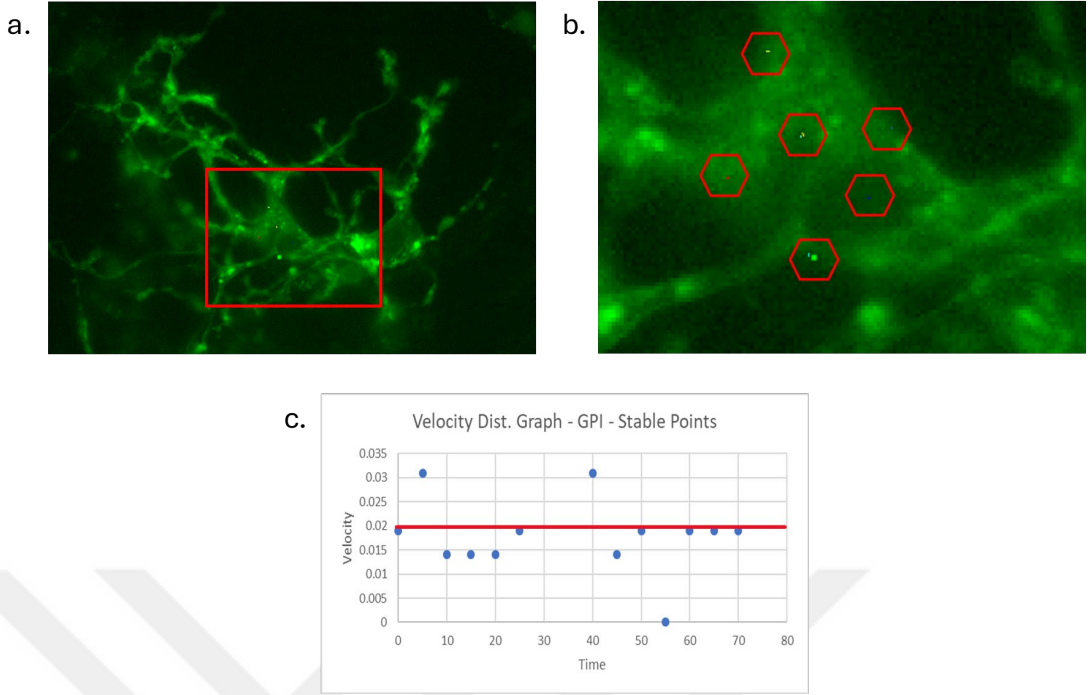
Şekil 6.6.3: Tip C oligodendrosit hücresi örneği. MBP:GPI-GFP lentivirüsü ile enfekte edilmiş, GPI-GFP ifade eden Tip C oligodendrosit hücresine ait görüntü. Görüntüde bazı bölgelerde yoğun olarak görülen GFP sinyali, lipid sallarının bazı bölgelerde bir araya geldiğini göstermektedir. Bar: 20 μ m.

GPI-GFP ifade eden tip C oligodendrositler detaylı incelendiğinde ise, bu hücreler büyük oranda yumurta akı gibi yayılmış morfolojide oldukları için geniş bir alanın oligodendrosit membranı ile kaplandığı görülmektedir. GPI-GFP sinyali incelendiğinde, oligodendrositin hem genişleyen membran bölgelerinde (Şekil 6.6.3 kesik çizgili ok) hem de oligodendrositin orta kısımlarında (Şekil 6.6.3 düz çizgili ok) belirli bir yer gözetmeksizin membrana katıldığı ve aktif hareket ettiği görülmektedir.

6.7. Oligodendrositlerde Vezikül Taşınımının İncelenmesi

6.7.1. Varolan gövde hareketinin belirlenmesi

Oligodendrosit hücreleri kendi yapıları gereği hareket etmeye meyilli hücrelerdir. Elde ettiğimiz görüntülerde birçok hücrede, oligodendrosit uzantılarının hareket ettiğini tespit ettik. Bu da oligodendrosit uzantısı üzerinde yapılacak vezikül takibinin sonuçlarını etkileyeceği için hücrenin hem gövdesindeki hem de uzantı üzerindeki “hücresel hareketi” tespit ettik (Şekil 6.7.1.1).

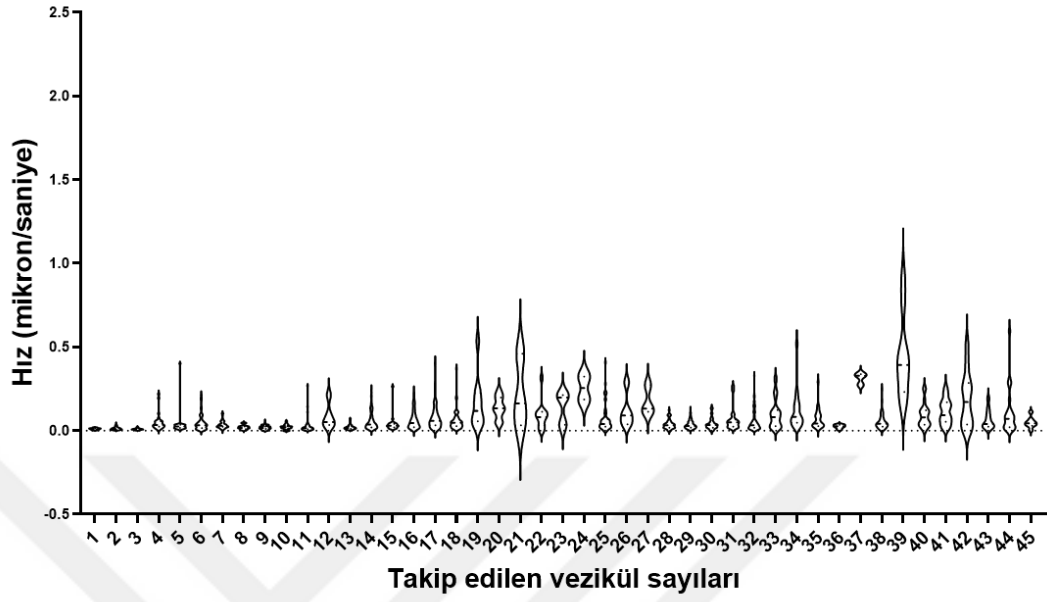


Şekil 6.7.1.1: Oligodendrositlerde hücresel sabit hareket hızının belirlenmesi için seçilen noktalar ve hız dağılım grafikleri.

Hem hücre gövdesinde (Şekil 6.7.1.1.a-b) hem de oligodendrosit uzantılarında hareket etmediği, ya da hücre üzerinde sabit nokta gibi görünen yerlerden rastgele noktalar seçilmiştir ve üç görüntü boyunca görülme yerleri TrackMate eklentisinde işaretlenerek takip edilmiştir. Bu noktaların hızları alınarak hız dağılımları incelenmiştir. Hız dağılımları incelendiğinde hücrelerde 0.02 mikron/saniye altında hızlarda gruplaşmalar görülmüştür. Bu nedenle 0.02 mikron/saniye oligodendrosit hücreleri için de vezikül takibinde durağan olarak kabul edeceğimiz grubu ayırmak için bir threshhold noktası olarak belirlenmiştir.

GPI-GFP ile lipid sallarını işaretleyerek oligodendrositlerde takibini yaptığımız veziküllerin rotalarındaki hız verilerinin dağılımı inceleyerek önceki aşamada belirlemiş olduğumuz 0.02 mikron/saniye threshhold noktasının toplam hız dağılımına uygun olup olmadığı değerlendirilmiştir. Şekil 6.7.1.2’de görüldüğümüz gibi belirlemiş olduğumuz threshhold noktasının altındaki durağan nokta birikmesi, 0.02 mikron/sn’nin bizim için doğru seçim olduğunu göstermektedir. İleriki analizlerimizde 0.02 μ /sn ve altındaki değerler durağan olarak kabul edilmiştir.

**Oligodendrosit Hücrelerinde İncelenen GPI-GFP İşaretli
Her Bir Vezikülün Anlık Hız Dağılımı**



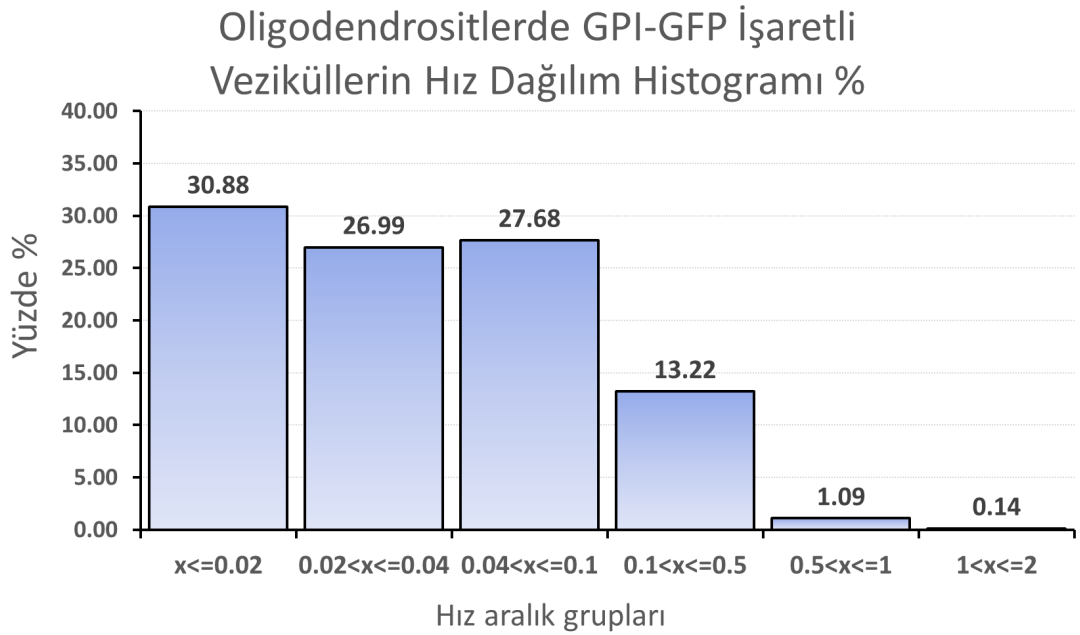
**Oligodendrosit Hücrelerinde İncelenen GPI-GFP İşaretli
Her Bir Vezikülün Anlık Hız Dağılımı**



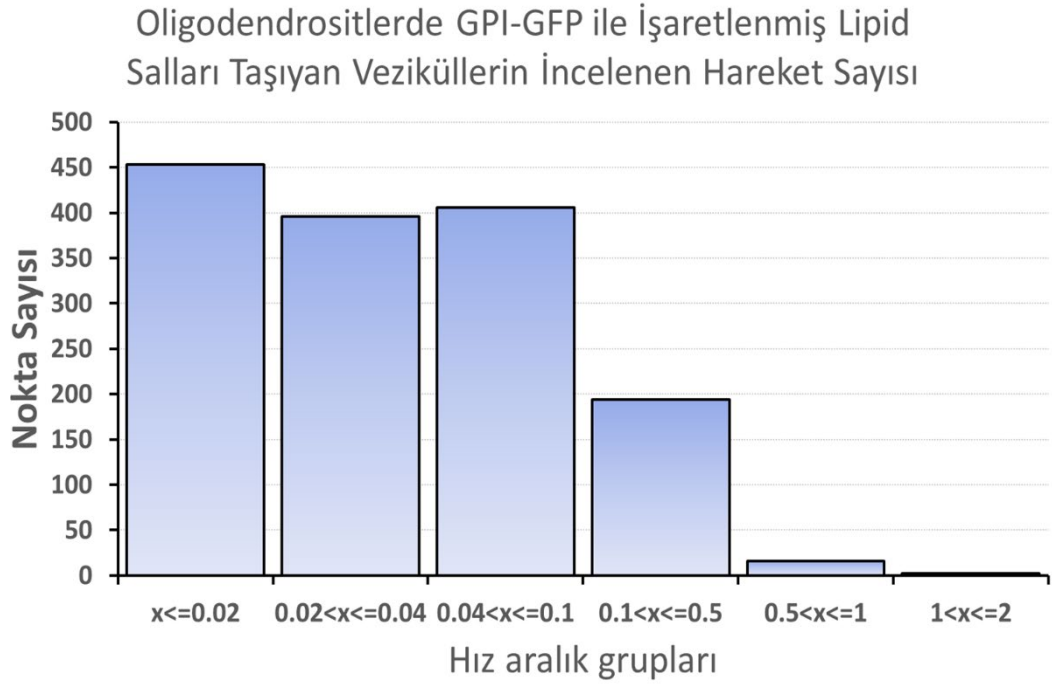
Şekil 6.7.1.2: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli her bir vezikülün anlık hız dağılımı

6.7.2. Oligodendrositlerde GPI-GFP işaretli lipid salları bulunan veziküllerin hareketinin incelenmesi

İlk aşamada incelediğimiz hücrelerde, incelenen 93 veziküle ait toplam 3243 noktadan 2402 nokta hareketli, 841 nokta durağan nokta olarak tespit edilmiştir. Buna göre GPI grubunda noktaların %25,93'ü durağan, %74,07'si belli bir hızla sahip olup hareket ettiği görülmüştür. Yaptığımız analizlere ve incelediğimiz sonuçlara göre hücre temelli baskınlığı sınırlandırmak için her bir hücreden gelecek veriye kısıtlama getirilmiştir. Öncelikle her hücredeki takip edilen veziküller ortalama hızlarına göre sıralanmış ve en hızlı veziküller ve en yavaş veziküller seçilmiştir. Bir hücrede 15'ten fazla takip edilen vezikül varsa 5 en hızlı 5 en yavaş, 10 ve altı vezikül varsa 2-3 en hızlı 2-3 en yavaş, ve 20'den fazla vezikül varsa en hızlı 10 ve en yavaş 10 vezikül seçilmiştir. Bir hücrede eğer 5 ten az vezikül incelenmişse onlar elenmeden değerlendirmeye dahil edilmiştir. Buna göre seçilen veziküllerde toplamda 1467 nokta incelenmiş, bu noktaların %30.88'i durağan kabul edilmiştir (Şekil 6.7.2.1).



Şekil 6.7.2.1: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin hızlarının yüzdesel dağılım grafiği. Bu grupta en hızlı hareketle hareket eden noktaların oranı toplamda %1.23 olarak görülmektedir.



Şekil 6.7.2.2: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin hızlarının sayısal dağılım grafiği.

Tablo 6.7.2.1: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli veziküllerin sayısal hız dağılımları.

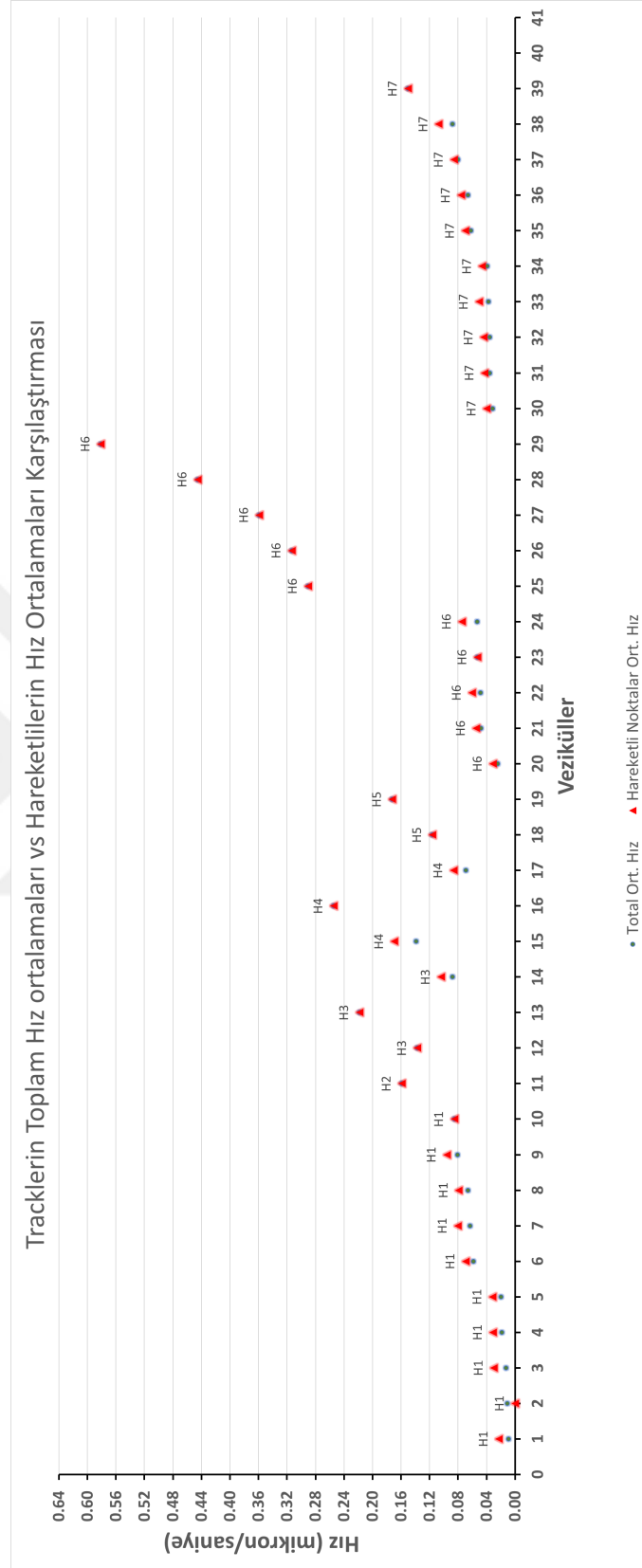
GPI-GFP	Hız Aralık Grupları (mikron/saniye)	Nokta Sayısı	Yüzde (%)
Durağan	$x \leq 0.02$	453	30.88
Hareketli	$0.02 < x \leq 0.04$	396	26.99
	$0.04 < x \leq 0.1$	406	27.68
	$0.1 < x \leq 0.5$	194	13.22
	$0.5 < x \leq 1$	16	1.09
	$1 < x \leq 2$	2	0.14
	Toplam:	1467	100

Bu incelenen noktaların sayısal dağılımları Şekil 6.7.2.2 ve Tablo 6.7.2.1’de görülmektedir. Buna göre incelenen noktaların %1.23’ü (18 nokta) en hızlı hareket eden kategoriye girmiştir. 1 ve 2 mikron/sn arasındaki hıza sahip 2 nokta tespit

edilmiştir. Orta hareketli kabul edilen grupta ise 194 nokta tespit edilmiş, bu da toplam incelenen noktaların %13.22'sine denk gelmektedir.

Bu veziküllerin hareketli noktalarının ortalamaları alınarak her veziküle ait hareket eden noktaların ortalamaları (moving particles mean speed) ve bir veziküle ait bütün noktaların hız ortalamasını veren toplam ortalama hızları (total mean speed) karşılaştırılmıştır (Şekil 6.7.2.3). İncelenen hücrelere bağlı patern değişikliği çok açık bir şekilde görülmektedir.





Şekil 6.7.2.3: Oligodendrosit hücrelerinde incelenen GPI-GFP işaretli her bir vezikülün toplam ortalama hız ve hareketli olduğu hızların karşılaştırılması.

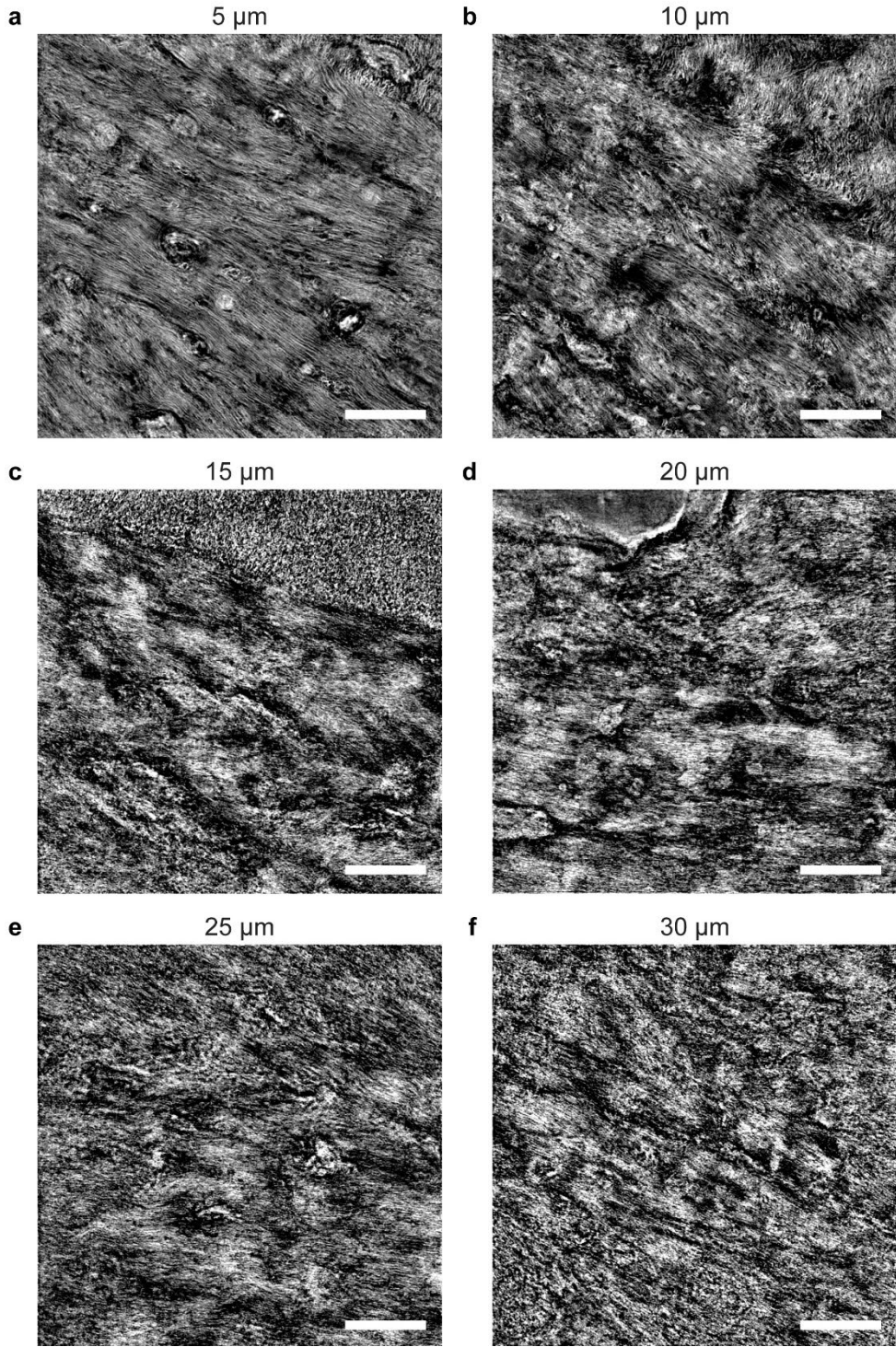
6.8. In vivo Modelde Miyelinizasyonun İncelenmesi

6.8.1. Kesit kalınlığının optimize edilmesi

Holotomografi mikroskobu ile miyelinin katmanlı yapısının ışığı farklı kırmasından yararlanarak miyelini işaretli görüntüleyebilmek için öncelikle farklı doku kalınlıklarını deneyerek miyelinin en iyi görüntüleyebildiğimiz kesit kalınlığı belirlenmiştir. Bunun için WT farede 5 μm , 10 μm , 15 μm , 20 μm , 25 μm ve 30 μm kalınlıklarındaki beyin doku kesitleri Bölüm 5.6.4'te anlatılan yöntemlerle hazırlanmıştır.

Beyin kesitlerinde miyelince zengin bölge olan korpus kallosum bölgesinden en az üç, miyelinin daha az miktarda ya da dağınık bulunduğu beynin diğer bölgelerinden (korteks ve striatum gibi) birer görüş alanı (field of view, FOV) 3 boyutlu nicel faz ve floresan mikroskobunda tomografik görüntüleme ile görüntülenmiştir.

Her bir görüş alanında çekilen ham görüntünün işlenmesi sonunda kırılma indisi bilgisini içeren görüntü katmanı elde edilmiştir. Her bir görüntü katmanında miyelin uzantılarının daha net görüldüğü seviye seçilmiştir. Farklı kalınlıklardaki doku kesitlerinden elde edilen görüntüler aynı şekilde incelenmiştir. Karşılaştırma yapabilmek için kırılma indisi aralığı bütün görüntülerde eşitlenerek alt ve üst sınırları 1.34 ve 1.45 olarak belirlenmiştir. 5 μm (a), 10 μm (b), 15 μm (c), 20 μm (d), 25 μm (e) ve 30 μm (f) kalınlıklarındaki doku kesitlerinden seçilen, miyelinin en iyi görüldüğü seviyelerin karşılaştırılması Şekil 6.8.1.1'de verilmiştir. Bu görüntülerde derinlik ve netlik olarak miyelinli aksonların en iyi görüldüğü, gözle ayırt edilebilirliği en iyi olduğu en ince kesit kalınlığı 5 μm olarak görülmektedir (Şekil 6.8.1.1.a). 5 μm kalınlıktan sonra en iyi görüntüyü veren kalınlık 10 μm kesit kalınlığı alternatif olarak seçilmiştir (Şekil 6.8.1.1.b).



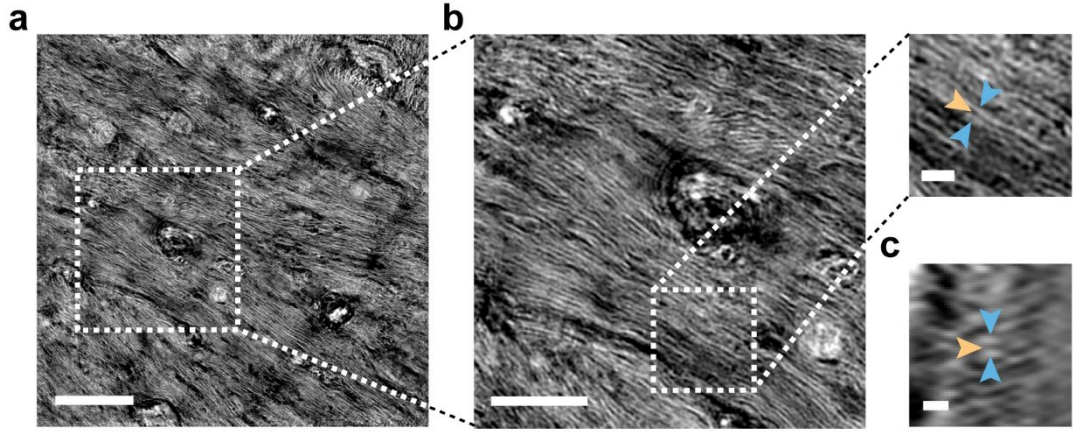
Şekil 6.8.1.1: Optimal kesit kalınlığının belirlenmesi. WT Balb/C fare beyninden 5 μm (a), 10 μm (b), 15 μm (c), 20 μm (d), 25 μm (e) ve 30 μm (f) kalınlıklarda doku kesitleri alınmış ve holotomografi mikroskobunda korpus kallosum bölgesinde miyelin görüntülenmiştir. Karşılaştırma için bütün görüntülerde kırma indisi aralığı 1.34-1.45 olarak ayarlanmıştır. Buna göre farklı kalınlıklardaki kesitlerden elde edilen görüntülerde miyelinin daha net ve daha az parçalı görüntülediği kesit kalınlığı 5 μm (a) olarak seçilmiştir. Ölçek: 20 μm.

6.8.2. 3D Holotomografi mikroskopuyla miyelinli aksonların görüntülenmesi

Beyindeki korpus kallosum bölgesi kompakt ve yoğun yapısı ile uzunlamasına uzanan sayıca çok fazla miyelinli akson içermesi nedeniyle holotomografik görüntüleme için çok iyi bir bölgedir.

Her bir bileşenin kalınlığı çözünürlük sınırından çok daha ince olduğu için, holotomografi ile elde edilen yeniden yapılandırılmış görüntülerde bireysel miyelin katmanları görülememektedir. “Ölçülen n değerleri” başlığı altında gösterildiği gibi kırınım sınırından kaynaklanan etkili (ortalama) bir kırılma indeksinin ölçülebilmesi mümkündür. Buradaki örnekte, kırılma indeksleri aynı 3 katmanlı sarma senaryosu gösterilmiştir. Çift tepeye sahip bu çok belirgin kırılma indeksi profili (miyeline özgü imza) miyelinli bir aksonu miyelinsiz bir aksondan doğrudan ayırt etmiştir. Ayrıca, ölçülen kırılma indeksleri, optik olarak çözilemeyen miyelin katmanları hakkında yapısal bilgi taşımıştır. Miyelin katmanı bileşenlerinin iyi tanımlanmış kalınlıkları ve kırılma indeksleri sayesinde, bir akson etrafında sarılı miyelin katmanlarının sayısını tepe kırılma indeksi değerlerinden tahmin etmek mümkündür. Sarılmış katmanların tahmini sayısını veya miyelinli bölgenin toplam kalınlığını kullanarak, g-ratio’yu hesaplamak da mümkündür. g-ratio tahminine dayalı sonuçlar, sonraki bölümlerde incelenmiştir.

Yapılan optimizasyonlarla belirlenen optimal kesit kalınlığında (5 μm) beyin kesitleri hazırlanarak holotomografi mikroskobu ile görüntülenmiştir. 100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ görüş alanında, miyelin ve aksonların uzunlamasına görünümü görüntüleme sistemimiz ile gözlemlenmiştir (Şekil 6.8.2.1.a). Yüksek-düşük-yüksek kırılma indekslerinden oluşan tek bir profil, bir miyelinli akson oluşturmaktadır ve yakınlştırılmış görüntüde mavi ok başları miyelin kılıfını ve sarı ok başı aksonu göstermektedir (Şekil 6.8.2.1.b). Kırılma indeksi hacminde, XZ düzlemi miyelinli aksonların kesitini göstermekte olup, miyeline özgü bir imza olarak görünmektedir (mavi ok başları) (Şekil 6.8.2.1.c). Dolayısıyla, görüntüleme sistemimizde, korpus kallosumun yoğun ve kalabalık ortamında aksonlar etrafındaki kompakt miyelin, farklı kırılma indeksi özellikleri nedeniyle ayırt edilebilmektedir.



Şekil 6.8.2.1: Miyelinli aksonların uzunlamasına görünümü. a. Korpus kallosum bölgesinden 5 µm kalınlığındaki doku kesitinin holotomografik görüntülenmesi (ölçek çubuğu: 20 µm). b. Yakınlaştırılmış görüntüler, miyeline özgü imzaları net bir şekilde göstermiştir. Mavi ve sarı ok başları sırasıyla "ölçülen n değerleri"ndeki tepe ve çukuru göstermektedir (ölçek çubukları: 10 µm ve 2 µm). c. XZ düzleminde, aksonu (sarı ok başı) çevreleyen miyeline özgü bir imza (mavi ok başları) görünmektedir (Ölçek: 1 µm).

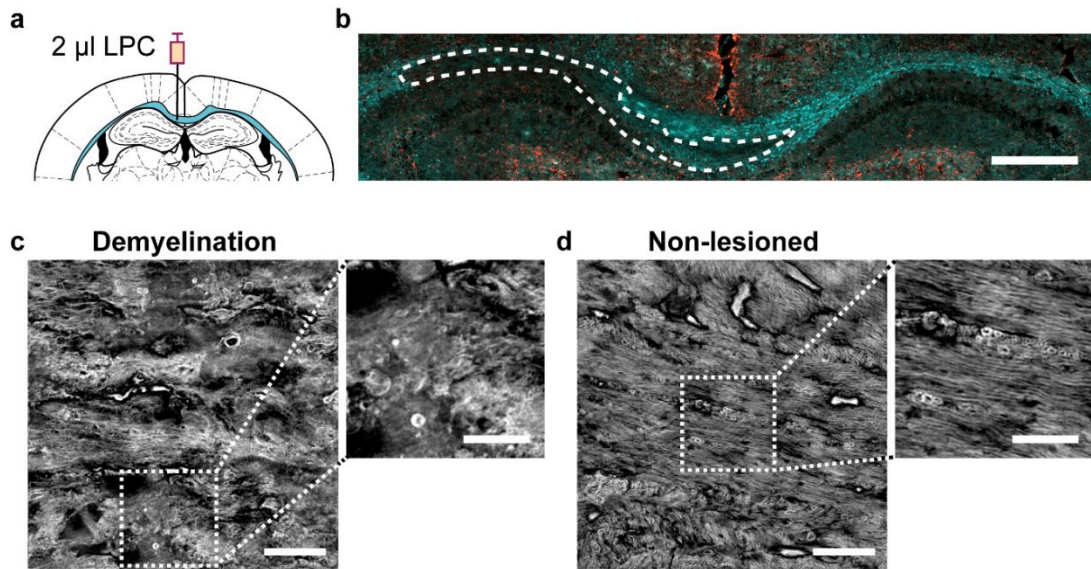
6.8.3. Demiyelinizasyon modelinin oluşturulması

Prizma farede oligodendrositler ve oligodendrositlerin bir uzantısı olan miyelin ile sarılı aksonların düzenli ve yoğun olarak bulunduğu korpus kallosum bölgesi gök mavisi floresan proteinin ifadesinden dolayı floresan mikroskop ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Şekil 6.8.2.1.b). Prizma farede bu bölgeye yapılan lizolesitin enjeksiyonu ile miyelin yapısı bozularak lokal demiyelinizasyon modeli oluşturulmuştur (Şekil 6.8.2.1.a-b). Prizma farede astrositler kırmızı floresan proteini, oligodendrositler gök mavisi floresan proteini ifade etmektedir. Şekil 6.8.2.1.b’de kesik çizgi içerisinde gösterilen bölge, mavi sinyaldeki bölgesel azalmalar dolayısıyla demiyelinizasyon bölgeleri olarak belirlenmiştir. Demiyelinizasyon bölgesi içerisinde seçilen yerler 3D holotomografi mikroskobu ile görüntülenmiş ve miyelin durumu incelenmiştir.

6.8.4. Demiyelinizasyon modelinin 3D holotomografi mikroskobuyla görüntülenmesi

Şekil 6.8.2.1’de gösterdiğimiz miyeline özgü imzaların, aksonların düzenli yapısından kaynaklanması ve miyeline özgü olmaması ihtimalini bertaraf etmek için miyelini bozarak miyeline özgü imzaların kaybolup kaybolmadığı incelenmiştir. Kırılma indekslerinde gözlemlenen değişikliklerin gerçekten miyelinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını test etmek için demiyelinize olmuş korpus kallosum bölgesi

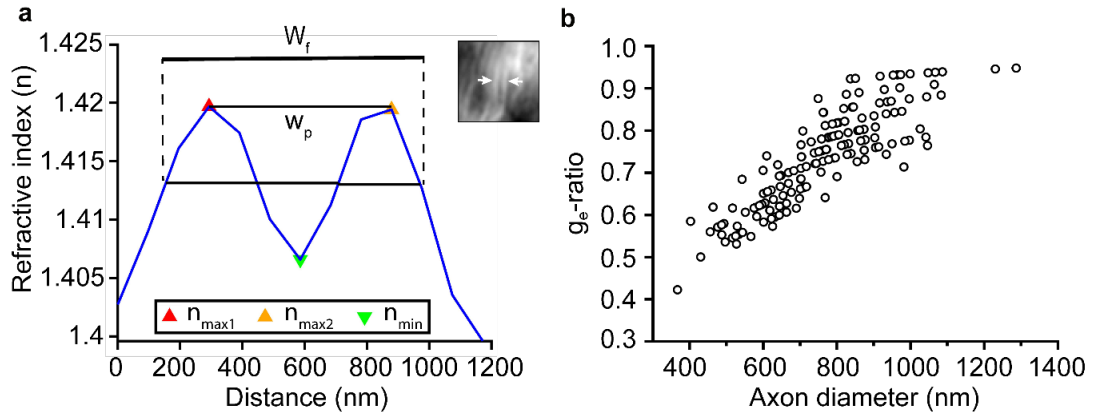
holotomografi mikroskobu ile görüntülenmiştir. Korpus kallosum bölgesine lizolesitin enjeksiyonu ile miyelin yapısı bozulmakta ve deforme olan miyelin kılıf makrofajlar yardımı ile temizlenmektedir. Demiyelinizasyonu oluşturmak için, prizma farenin korpus kallosumuna LPC enjekte edilmiştir (Şekil 6.8.4.1.a-b). Prizma farede, korpus kallosumda miyelin, oligodendrositlerin yoğun cerulean floresan protein (CFP) ifadesi ile kolayca ayırt edilebilmektedir. LPC ile gerçekleştirilen demiyelinizasyonda, korpus kallosumdaki CFP sinyalinde azalma ile gözlemlenmiştir (Şekil 6.8.4.1.b; kesik çizgili bölge). Aynı demiyelinize bölge holotomografik görüntüleme ile incelendiğinde, miyeline özgü imzanın kaybolduğu görülmüştür (Şekil 6.8.4.1.c). İmza, lezyon olmayan bölgede net bir şekilde görülmektedir (Şekil 6.8.4.1.d). Bu nedenle, miyeline özgü imzaların, incelenen bölgedeki miyelinin varlığından kaynaklandığı anlaşılmıştır.



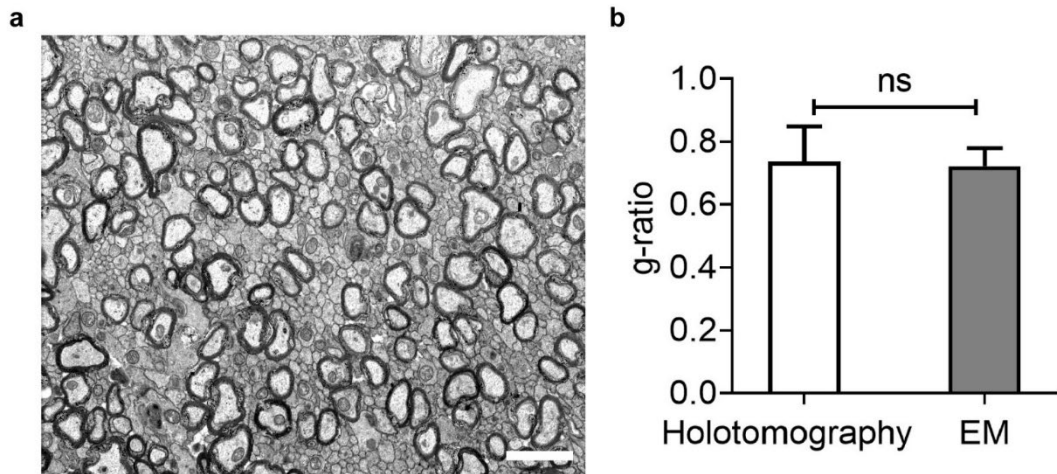
Şekil 6.8.4.1: Demiyelinizasyon sonrası miyeline özgü imzanın kaybı. a. Demiyelinizasyonu gerçekleştirmek için prizma faresinin korpus kallosum bölgesine LPC (2 μ l) enjekte edilmiştir ve enjeksiyondan üç gün sonra korpus kallosum görüntülenmiştir. b. Oligodendrositlerin yoğun bir şekilde cerulean floresan proteinini (CFP, cyan) ifade etmesiyle miyeline zengin korpus kallosum bölgesi de cyan floresan proteini ile ayırt edilmektedir. Astrositler DsRED-Max ifadesi ile kırmızı renkte görülmektedir. Kesik çizgili bölge, CFP sinyalindeki azalma ile demiyelinizasyon bölgesini göstermektedir (ölçek: 500 μ m). c. Demiyelinize bölgenin holotomografik görüntüsünde, miyeline özgü imza kaybolmuştur (ölçek: 20 μ m ve 10 μ m). d. Lezyon olmayan bölgede, miyeline özgü imzalar net bir şekilde görülmektedir (ölçek: 20 μ m ve 10 μ m).

6.8.5. Miyelinin sayısallaştırılması

g-ratio, miyeline bağlı sinir sistemi hastalıklarında miyelin sağlığını değerlendirmek, hastalık derecesi hakkında bilgi sahibi olmak ve aksonların miyelin miktarını tanımlamak için yaygın kullanılan bir metriktir (134, 135). Holotomografik görüntüleme, miyelin özelliklerinin çözünürlüğün ötesinde hesaplanmasına izin verdiği için, elde ettiğimiz holotomografik görüntülerde g_e -ratio'nun hesaplanıp hesaplanamayacağı test edilmiştir. Miyelinli aksonların kırılma indeksi profilleri MATLAB'de analiz edilmiş ve örnek çıktı Şekil 6.8.5.1.a'da gösterilmiştir. Elde edilen bu profil, hipotezimizde öne sürdüğümüz teorik profile benzerlik göstermektedir (Şekil 4.6.2.1.1). Kırılma indeksi grafiklerinde tam genişlikteki yarı maksimumda (FWHM) mesafe (W_f) ve iki maksimum (n_{max1} ve n_{max2}) arasındaki mesafe (w_p), D_e 'yi (tahmini miyelin + akson çapı, denklemler 1-5) hesaplamak için kullanılmıştır. İki maksimum kırılma indeksinin ortalaması, sarılmış miyelin tabakalarının sayısını hesaplamak için kullanılmış ve bu sayı tahmini miyelin kalınlığı ve d_e 'yi (tahmini akson çapı, denklemler 1-5) hesaplamak için kullanılmıştır. Tahmini g-ratio (g_e -ratio) d_e/D_e olarak hesaplanmıştır (denklemler 4-5). Analiz edilen 160 kırılma indeksi profilinden medyan g_e -ratio 0.745 ve ortalama $\pm$ SD g_e -ratio ise 0.736 ± 0.112 olarak hesaplanmıştır (Şekil 6.8.5.1.b). Bu bulduğumuz değerler, elektron mikroskobu ile görüntülediğimiz korpus kallosum bölgesinden yaptığımız g-ratio ölçümlerinden elde ettiğimiz ortalama g-ratio 0.721 ± 0.06 ($n=133$) değerinden istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir ($p=0.18$) (Şekil 6.8.5.2). Literatürde korpus kallosumdan elde edilen EM görüntülerinden yapılan ölçümler 0.72 ve 0.81 arasında değişmektedir (134, 136, 137). Bizim her iki yöntemle de elde ettiğimiz değerler literatürde verilen değerler arasındadır. Bu nedenle, holotomografik görüntüleme, g-ratio hesaplamalarında daha yavaş ve daha pahalı olan TEM'e göre daha uygun ve erişilebilir alternatif olarak gösterilebilir.



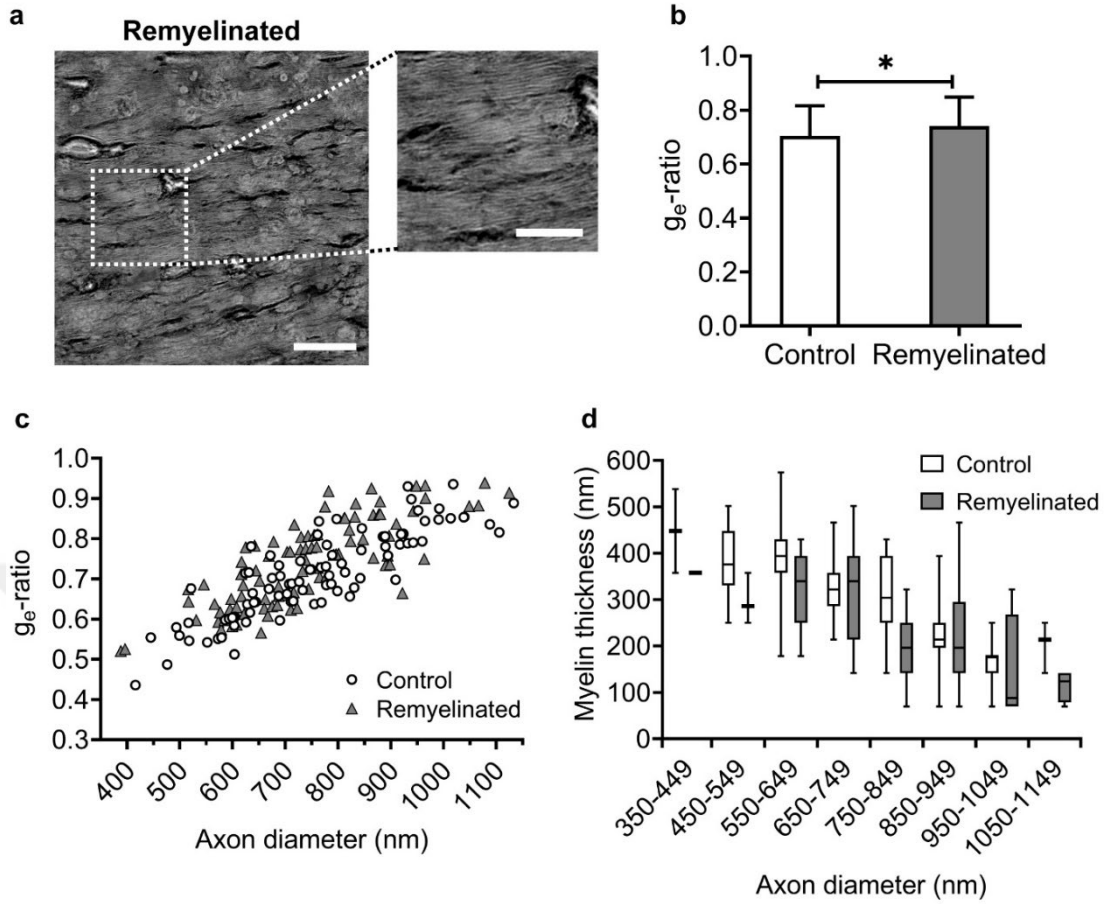
Şekil 6.8.5.1: Holotomografik görüntüleme ile g_e -ratio hesaplaması. a. MATLAB ile elde edilen grafik sağ üst köşede bulunan holotomografik görüntüdeki miyelinli aksonun deneysel kırılma indeksi profilini göstermektedir. W_f , $n_{\max1}$, $n_{\max2}$ ve $n_{\min}$ 'e göre FWHM'deki mesafeyi vermektedir. w_p iki maksimum arasındaki mesafeyi vermektedir. W_f , w_p , $n_{\max1}$ ve $n_{\max2}$ g_e -ratio'nun hesaplanmasında kullanılmıştır. $n_{\max1}$ ve $n_{\max2}$ değerleri, aksonun miyelinleşme seviyesine bağlıdır. b. Korpus kallosumda incelenen miyelinli aksonlara ait ($n=160$) g_e -ratio vs. akson çapı dağılım grafiği. Ortalama $\pm$ SD g_e -ratio 0.736 ± 0.112 ve medyan g_e -ratio 0.745 bulunmuştur.



Şekil 6.8.5.2: Holotomografi ve elektron mikroskobu görüntülerinden elde edilen g -ratio ölçümlerinin karşılaştırılması. a. WT BALB/c fare beyin korpus kallosumunun transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü (ölçek: 2 μ m). b. (a)'daki EM görüntüsündeki miyelinli aksonların g -ratio'ları AxonDeepSeg2 yazılımı kullanılarak otomatik olarak hesaplanmıştır. Holotomografik görüntülerden elde edilen ortalama g_e -ratio ölçümleri, EM'den elde edilen g -ratio ölçümleri ile yakınlık göstermektedir ($p=0.18$; ortalama $\pm$ SD g_e -ratio= 0.736 ± 0.112 , $n=160$; ortalama $\pm$ SD g -ratio= 0.721 ± 0.06 , $n=133$). (a) panelindeki EM görüntüsü Mehmet Şerif Aydın tarafından çekilmiştir.

6.8.6. Remiyelinize olmuş aksonların holotomografik görüntülenmesi

Holotomografi mikroskobuyla görüntüleyebildiğimiz miyeline özgü imzanın gerçekten miyelin yapısından geldiğini demiyelinize olmuş bölgelerde gösterdikten sonraki aşamada, g_e -ratio hesaplama yöntemimizin tekrar uygulanabilir olduğunu ve ölçüm hassasiyetini test etmek amacıyla remiyelinize olmuş korpus kallosum bölgesindeki aksonlar incelenmiştir. Demiyelinize olmuş bölgede 5-7 gün sonrasında iyileşme başlangıcı görülür ve remiyelinizasyon 21 günde tamamlanır (138, 139). Remiyelinizasyon durumunda demiyelinize olmuş bölgede tam iyileşme sağlansa bile yeni üretilen miyelin kılıfları daha incedir (yani, g -ratio daha yüksektir) ve bu remiyelinizasyona özgü bir durumdur (135, 140). Bu nedenle, LPC ile demiyelinizasyon yapıldıktan sonra fareler 21 gün iyileşme sürecine bırakılmış ve süreç sonunda beyin kesitleri hazırlanarak holotomografi mikroskobuyla görüntülenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, kullandığımız hesaplama yönteminin birbirine yakın fakat farklı olan kırılma indekslerini ve miyelin spesifik imzalarını niteliksel olarak tespit edebilir olduğunu göstermiştir (Şekil 6.8.6.1). Hesaplanan g_e -ratio değerleri, remiyelinize olmuş aksonlarda ortalama $\pm$ SD 0.740 ± 0.11 ($n=93$), aynı beyin kesitindeki karşıt hemisferdeki kontrol aksonlarında 0.704 ± 0.111 olarak bulunmuştur. Bu hesaplanan değerlere göre, remiyelinize olan aksonların g_e -ratio değeri kontrol aksonlarının g_e -ratio değerinden istatistiksel olarak daha yüksektir ($p=0.0270$; Şekil 6.8.6.1.b). Her iki gruba ait g_e -ratio değerlerinin dağılımına ve miyelin kalınlıklarının karşılaştırmasına baktığımızda, yeni üretilen miyelinin kontrolden daha ince olduğu görülmektedir (Şekil 6.8.6.1.c-d). Sonuç olarak geliştirdiğimiz bu yöntem, remiyelinizasyon ile oluşan yeni miyelin ve doğal miyelin arasındaki farklılığı tespit edebilmiş ve holotomografik görüntüleme ve g_e -ratio hesabı ile CNS demiyelinizasyonu ve remiyelinizasyonunun analizinde uygulanabilir bir yöntem olabileceği gösterilmiştir.



Şekil 6.8.6.1: Holotomografik görüntülere uygulanan g_e -ratio hesaplama yönteminin, remiyelinize olmuş aksonlarda daha ince miyelini tespit edecek hassasiyette olduğunun gösterilmesi. a. Remyelinize olmuş aksonlarda miyelin spesifik imzalar 21 günlük iyileşme süreci sonunda tekrar tespit edilebilmiştir. (ölçek: 20 μ m ve 10 μ m). b. Kontrol bölgesindeki miyelinli aksonlarla karşılaştırıldığında, remiyelinize olmuş aksonların g_e -ratio'ları istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur, bu da remiyelinizasyon ile daha ince miyelin kılıfı oluştuğunu göstermektedir. Ortalama $\pm$ SD g_e -ratio'lar: kontrol= 0.704 ± 0.111 (n=91), remiyelinize= 0.740 ± 0.11 (n=93), ve $p=0.0270$. c. Kontrol ve remiyelinize olmuş aksonların g_e -ratio vs akson çapı dağılım grafiği. Dağılım, remiyelinize olmuş aksonların çeşitli akson çapları boyunca daha yüksek g_e -ratio'lara sahip olduğunu göstermiştir. d. Kontrol grubuna benzer bir durum gösteren remiyelinizasyon grubunda, daha ince miyelinin üretildiğini gösteren miyelin kalınlığı vs akson çapı grafiği (Kontrol, n=91; Remyelinize, n=93).

7. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, merkezi sinir sisteminde miyelinleşme süreci normal ve hastalıklı durumda incelenmiş, membranın oluşumu, genişleme süreci ve bir bütün olarak işaretli şekilde holotomografik yöntemle miyelin membranı görüntüleme konularında detaylı çalışmalar yapılmıştır. Merkezi sinir sisteminde miyelinleşme sürecini incelemek için nöronal kök hücrelerden farklılaştırılan nöron-oligodendrosit ortak kültürleri elde edilmiş, miyelin membran oluşumu ve genişleme sürecinde gerçekleşen kargo veziküllerinin taşıma dinamiği incelenmiştir. Kargo veziküllerinin işaretlenmesinde, iki farklı yöntem kullanılmıştır. Oligodendrosit spesifik promotör ile oligodendrosit hücrelerinde lentivirüs yardımıyla GFP floresanlığına bağlı GPI çapası ifade ettirilerek üzerinde lipid salları bulunan kargo vezikülleri böylelikle takip edilebilmiş ve normalde GPI çapasına bağlı bulunan proteinlerin taşınmasıyla ilgili fikir edinilmiştir. Yine oligodendrosit spesifik promotör ile oligodendrosit hücrelerinde lentivirüs yardımıyla VSVG proteini ifade edilerek, kargo veziküllerinin genel taşınması ile ilgili genel bilgi elde edilmiştir. Bunlara ek olarak, membrana yönelen LckN sinyalini taşıyan TdTomato floresan proteini de lentivirüs yardımıyla ifade ettirilerek oligodendrositlerde alternatif taşıma mekanizmaları incelenmiştir.

İlk etapta bu proteinlerin hücre içindeki dinamiklerini anlamak için öncelikle uzun süreli (>1 gün) ve uzun aralıklı (10 dakika) ve orta süreli (10-16 saate kadar) ve orta aralıklı (5-7 dakika) çekimler yapılmıştır. Bu çekimlerde her incelenen grupta oligodendrositler 3 genel morfolojide gözlemlenmiştir. Membrana kargo veziküllerinin ve lipidlerin taşınmasını daha iyi açıklayabilmek için gözlemlenen morfolojilere göre oligodendrositler 3 farklı gruba ayrılmıştır. İnce uzantılarla yayılmış oligodendrositlere tip A oligodendrosit (Şekil 6.5.1.a ve Şekil 6.6.1), gövdeden kalın, tüpü andıran bir yapıda uzantıları olan ve uzantılarının hafif yayılma/genişleme potansiyeli gösterdiği oligodendrositlere tip B oligodendrosit (Şekil 6.5.1.b ve Şekil 6.6.2), tamamen yayılmış morfolojide olan oligodendrositlere tip C oligodendrosit (Şekil 6.5.1.c ve Şekil 6.6.3) adı verilmiştir. Tip A, olgun, miyelinlemek için ince uzantılarıyla ortamı tarayan, SARAPE modeline göre keşif aşamasındaki oligodendrositi; Tip B, MBP'nin kompakt miyelin oluşturmak için polimerize olduğu aşamada olan oligodendrositi, tip C ise bu ikisi arasındaki seviyede olan ve keşif ve sarma aşamalarında olan oligodendrositi göstermektedir. Kargo

veziküllerinin ve lipitlerin taşınmasında incelenen bütün gruplarda ve morfolojilerde hem oligodendrosit uzantılarında (Tip A ve Tip B hücrelerde), hem de yayılmış oligodendrosit boyunca (Tip C hücrelerde) sürekli bir dinamik gözlenmiştir. Bu büyütme seviyesinde (40x) yaptığımız gözlemlerimizde gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir.

Hücre içerisinde hareket eden veziküllerin oldukça hızlı olduğunu düşünerek canlı görüntülemelerde görüntü çekme aralığı 1 dakikaya indirilerek zamansal çözünürlük arttırılmıştır. Böylelikle yapılan görüntülemelerde hücre içinde incelemek istediğimiz moleküllerin (kargo vezikülleri, lipitler ve lipit sallarını) takibi kolaylaşmış ve bir takip yöntemi geliştirilmiştir. Fiji programının TrackMate eklentisini kullanarak çekilen her bir resimdeki veziküllerin anlık konumu işaretlenebilmiş ve moleküllerin hareketi, hızı, yer değiştirmesi ile ilgili sayısal veriler elde edilebilmiştir. GPI-GFP grubunda toplam 8 vezikül, Venus-VSVG grubunda ise 15 vezikül takibi yapılmıştır. Bu takip aralığında yapılan analizlerde GPI-GFP işaretli veziküllerin (%80.21 durağan), Venus-VSVG işaretli veziküllerden (%56.08) daha durağan olduğu tespit edilmiştir. Bu aşamaya kadar olan görüntülemelerde bazı kısıtlayıcı etkenler karşımıza çıkmıştır. Bu zamana kadar Spinning Disk Konfokal Mikroskobu'nun spinning disk modülü ve lazer sistemi kullanılmıştır. Görüntüleme aralığının 1 dakikaya indirilmiş olmasıyla, 1 dakika aralıklarla hücrelere gelen lazer ışınlarından kaynaklı ortaya çıkan fototoksiteden ve ışığın daha dar bir alana odaklanmış olmasından dolayı hücrelerin zarar görüyor olmaları nedeniyle daha az sayıda hücre görüntülenebilmiştir. Bunu aşmak için lazer gücü en düşüğe tutulmuş, fakat bu durumda sadece normalden daha parlak olan veziküller takip edilebilmiş, zayıf parlaklıkta olanlar kaybolmuştur. Bu nedenle takip incelenen hücre sayısı azalmıştır. Bu aşamaya kadar yapılan analizlerde elde edilen iki kazanım olmuştur. İlki, C tipi oligodendrositlerde aktif kargo trafiği gözlemlenmiştir. C tipi oligodendrositler, miyelin kılıf sarma aşamasında gözlemlenen oligodendrositlere örnektir ve bu hücrelerde aktif kargo trafiğinin gözlemlenmesi, miyelinin kompaktlaşmasından sonra da membrana lipit ve proteinlerin taşınmasının sürebildiğini ifade etmektedir. İkincisi, membranın genişlemesi sırasında, eklenen lipit ve proteinlerin sadece uç noktalardan değil gövdeye yakın bölgelerden de gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu tarz bir genişleme SARAPE modelinde tahmin ettiğimize daha

uygun olup, başka modellerde, mesela sıvı kruvasan, önerildiği gibi genişlemenin sadece uçtan olmasından farklıdır.

Bir sonraki aşamada, lazer ışığı kaynaklı fototoksisiteyi azaltmak amacıyla, fototoksisitesi daha az olan Spinning Disk Mikroskopunun LED ışık kaynağını kullanarak ön kamera ile çekimlere devam edilmiştir. Yeni alınan görüntülerde, veziküllerin hareketlerini daha iyi yakalayabilmek adına, çekim aralığı 5 saniyeye indirilmiş, toplam çekim süresi 10 dakika ile sınırlandırılmıştır. Oligodendrosit hücreleri içindeki veziküllerin hücre hareketine göre relativ hareketini tespit edebilmek amacıyla hücre üzerinde sabit noktalar alınıp, lokal hareket hızı değerlendirilmiş ve bu değer vezikül analizlerinde durağan vezikül olarak kabul edilecek grubu oluşturmuştur.

Bu yeni ayarlamalarla her iki gruptaki hücrelerin görüntülemeleri yapılmış olup, GPI-GFP ifade ettirilen grupta 93 vezikül incelenmiştir. İlk yapılan analizlerden sonra hücreler arasındaki baskınlığı azaltmak için her bir hücreden ortalaması en hızlı ve en yavaş olan hücreler seçilerek analize alınmıştır. Yaptığımız incelemelerde, GPI-GFP ile işaretlenmiş veziküllerin %31'inin durağan olduğu tespit edilmiş, %68'inin orta hızlarda olduğu, %1.23'ünün ise hızlı Hareket ettiği görülmüştür.

Hela hücrelerinde yapılan karşılaştırmada ise, GPI-GFP işaretli lipid sallarını taşıyan veziküllerin hemen hemen yarısının düşük hızda hareket ettiği gözlemlenmektedir ve bu oran VSVG işaretli veziküllerden %8 daha yüksek bir orandadır. Fakat, VSVG grubuna bakıldığında, durağan kabul edilen hızda daha çok nokta olduğunu görülmektedir. Ayrıca, hızlı kabul ettiğimiz grupta nokta tespit edilmemişken, buna en yakın olan grupta %5'e yakın bir oranla GPI'nın 2 katı daha fazla nokta tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, VSVG işaretli veziküllerin daha çok duraklama göstermelerine karşın, hareketli oldukları dönemlerde daha hızlı hareket ettiklerini ifade etmektedir.

GPI ve VSVG ile işaretlenmiş kargo veziküllerinden farklı olarak membrana yönlendirme sinyali olan LckN taşıyan TdTomato proteinin taşınmasıyla GPI ve VSVG işaretli kargo veziküllerinin taşınmaları karşılaştırıldığında aynı kargo sistemi üzerinden taşınmadıkları görülmüştür. Bu da bize hücre içerisinde taşınma mekanizmasında çeşitliliğin olduğunu, olası bir hastalık durumunda farklı mekanizmaların devreye girebileceğini göstermektedir.

Miyelin membranı aksonların sağlığı, doğru ve devamlı sinyal iletimi ve dış etkenlerden korunması açısından büyük önem taşımaktadır (1). Miyelin bozukluklarından kaynaklı hastalıkları anlamak, miyelin hasar remiyelinizasyon süreçlerini anlamak ve remiyelinizasyonu tekrar indükleyebilmek ve miyelin onarım süreçlerini destekleyebilmek adına, bu süreçler ve bağlı hastalıklar üzerine çalışmalar yıllardır yapılmaktadır. Özellikle miyelin kılıfın katlı yapısını, katmanlar arası ve katman-akson arasındaki protein ilişkilerini çözebilmek, miyelinizasyon sürecini ve miyelinin sağlığının devamlılığını anlamak açısından çok önemlidir. Bunun için uzun yıllardır çalışmalar yapılmakta, miyelinin aksonu sarma süreci detaylı incelenmektedir. Fakat, bu süreci açıklama çalışmaları ya tümüyle immünohistokimyasal ve elektron mikroskobu kaynaklı statik görüntülere dayanmış ya da kısa gerçek zamanlı görüntüleme ile statik bulguların birleşmesi ile sınırlı kalmıştır (2–7). Miyelinizasyonun ilk evrelerinde, seri-dilim 3-boyutlu elektron mikroskopisi (3BEM) ile yapılan gözlemlerde oligodendrosit membranının tek bir internod boyunca homojen olmadığı ve aksonu saran tabaka sayısının değiştiği gözlenmiştir (60, 141). İncelenen görüntülerden öne sürülen/tanımlanan birçok miyelinleşme modelinde ortak nokta oligodendrosit uzantısının en uç kenarının sürekli büyümesi ve hareket halinde olmasıdır (2–7, 60, 61). Alternatif olarak öne sürülen yo-yo modelinde akson ve oligodendrosit arasındaki ilk dokunma ile oluşan bağ miyelinizasyonun sonuna kadar ayrılmadan devam etmektedir (4). Bu kadar çeşitli ve anahtar noktalarda birbirlerinden farklı modellerin olmasının nedenlerinden biri miyelin oluşum sürecinin gerçek zamanlı takibinin çok kısıtlı yapılabilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Miyelinleşme sırasında miyelin membranının hem büyümesi hem de genişlemesi için gerekli lipid ve proteinlerin hızlı ve sürekli bir şekilde sağlanması gerekmektedir. Bu taşıma olaylarını ve hangi hızda ve sıklıkta miyelin membrana lipid ve proteinlerin katıldığını gözlemleyebilmek miyelinleşme sürecini aydınlatacağına inanılmaktadır. Miyelin membranının bileşen oranları diğer hücre membranlarındaki orandan farklı olduğu için taşınan bu protein ve lipid kargoları dikkatli bir şekilde düzenlenmektedir. Miyelinin kuru ağırlığını %70 oranında lipidler, %30 oranında ise proteinler oluşturmaktadır (142). Geçmişte yapılan çalışmalarda, membran transportu veziküller somatit virüs G glikoproteini (VSV-G) kullanarak elektron mikroskobu ile gözlemlenmiş, kargonun oligodendrosit membranına miyelinizasyonun evrelerine

göre farklı yerlerden eklendiği gösterilmiştir (3). Fakat, miyelin oluşumu tamamlanmış 60 günlük farede ise büyük oranda miyelin membranının dış ucundan eklendiği gözlemlenmiştir (3). Bu örneklerde görüldüğü gibi, miyelin membran oluşum süresince yapılan incelemeler, gözlemler büyük oranda miyelin membrana gelen veziküllerin nasıl eklendiği üzerine olup, veziküllerin taşınma hızı açısından kayda değer bir çalışmaya denk gelinmemiştir.

Yapılan bu moleküler gözlemlerin devamında, miyelinizasyon sürecini morfolojik olarak incelemek için hücre kültüründe işaretli bir şekilde miyelinli aksonlar holotomografik olarak görüntülenmiştir. Aynı zamanda daha karmaşık ortamda holotomografik görüntüleme ile tespit edilebilirliği test edilmiştir.

Holotomografi yöntemi miyelin kılıfı ve aksonların farklı kırılma indislerini kullanarak hacimsel kırılma indisi haritalarını oluşturur. Bu aşamada, fare beyin dokusu kesitlerinde miyelinli aksonların ex vivo görüntülenmesi için holotomografi sistemi geliştirilmiştir ve hem nicel analiz, hem de nitel analiz ile elde ettiğimiz görüntüler incelenmiştir. Miyelin kalınlığı ve sağlığı için önemli bir değer olarak kabul edilen elektron mikroskobu görüntülerinden hesaplamaları yapılan g-ratio değeri, bu incelediğimiz görüntülerden kırılma indisi değerleri kullanılarak hesaplanabilmektedir. G-ratio değeri hem normal miyelinli aksonda hem de hasar görmüş ve yeniden miyelinlenmiş aksonda başarıyla hesaplanabilmektedir. Elde ettiğimiz bu değerler, hem kendi EM görüntülerimizden elde ettiğimiz g-ratio ölçümlerimize benzer olup literatürde yayınlanan değerlerle de uyumludur (134, 136, 137, 143). Bu nedenle, holotomografik görüntüleme, g-rationun hesaplanması için daha yavaş ve daha pahalı olan TEM'e kıyasla daha kolay ve yüksek verimli bir alternatif olabilir.

G-ratio hesaplamasının altın standardı, elektron mikroskobu görüntülerini analiz etmektir. Fakat TEM için örnek hazırlığı ve örneklerin görüntülenmesi uzmanlık, pahalı ekipmanlar ve geniş zaman gerektirir (144, 145). Daha önce, farklı işaretli görüntüleme yöntemleri olan CARS ve THG ile, siyatik sinirlerin büyük aksonlarının (çapı $\geq 1.5 \mu\text{m}$) g-ratio hesaplamaları yapılmıştır (126, 146). Fare beyininde, akson çapı 0.2 ile 2 μm arasında değişmektedir (143, 147). CARS yöntemi ile korpus kallosum bölgesinde yapılan miyelinli akson görüntülemelerinde (148) g-ratio 0.43 olarak bildirilmiş, bu oran TEM ölçümlerinde bildirilen 0.72 ve 0.81'den önemli ölçüde düşüktür (134, 136, 137, 143).

Hayvanlar ile oluşturulan demiyelinizasyon hastalıklarının modelleri, demiyelinizasyon lezyonlarını ve iyileşme süreçlerini araştırmak ve remiyelinizasyonu hızlandırmak için ilaçları test etmek için uzun zamandır kullanılmaktadır (149). LPC, yeri/lokasyonu belirli takip edilebilir demiyelinizasyon modeli oluşturmak için tercih edilen kimyasal yöntemlerden biridir. Aynı zamanda demiyelinizasyon ve ardından gelen remiyelinizasyon süreci bu modelde iyi tanımlanmıştır (149). Yaptığımız görüntülemelerde, korpus kallosum bölgesinde oluşturulan lokal demiyelinizasyon lezyonlarının holotomografik görüntülemesinde, miyelin kılıfının bozulmasından kaynaklanan miyeline özgü imzanın kaybolduğu gözlemlenmiştir. Demiyelinizasyon yapılan bölgede remiyelinizasyon sonrasında miyeline özgü imzanın yeniden ortaya çıkması, gözlenen miyeline özgü imzanın miyelin kılıfının varlığından kaynaklandığını göstermiştir.

Remiyelinizasyon durumunda, miyelin kılıfının iyileşmesinden sonra aksonları çevreleyen yeni oluşan miyelin kılıfları biraz daha incedir ve bu miyelinli aksonlar daha yüksek g-ratio'ya sahiptir (135, 140). Miyelinlenme seviyelerindeki bu ince değişiklikleri tespit etmek ve sistemimizin hassasiyetini doğrulamak için remiyelinize korpus kallosum bölgeleri miyelin seviyeleri açısından analiz edilmiştir. LPC ile yapılan demiyelinizasyonun başlangıcından itibaren fareler yaklaşık bir aylık iyileşme sürecine bırakıldıklarında, farelerde remiyelinizasyon modeli elde edilir (138). Remiyelinize aksonlar, holotomografik görüntüleme sistemimiz ile başarıyla görüntülenmiştir. Remiyelinize aksonlarda görülen miyeline özgü imzalar, hasar almamış miyelinli aksonlardakilerle karşılaştırıldığında gözle görülür bir fark görülmemiştir. Ayrıca, geliştirdiğimiz g_e -ratio hesaplama yöntemi, iyileşme sonrasında daha ince miyelin oluşumunun hesaplanmasına ve tespitine imkân sağlamış, yöntemimizin miyelinin ölçülebilmesi için hassasiyetini ve uygulanabilirliğini göstermiştir.

8. SONUÇ

Sonuç olarak, holotomografik görüntüleme ve g_e -ratio formüllerimiz, fare korpus kallosumunda miyelini görüntülemek ve ölçebilmek için hassas ve başarılıdır. Sinir sisteminin demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon mekanizmalarını nitel ve nicel olarak incelemek için miyelinlenme parametrelerinin ayrıntılı analizlerini sağlayarak, yöntemimizin uygulanabilirliği gösterilmiştir. Ayrıca, bu yöntemler, MS, PMD veya NPD gibi demiyelinizasyon hastalıklarına özgü ilaç taramasını hızlandırmak için diğer araştırma grupları tarafından kolayca uyarlanabilir.



9. KAYNAKLAR

1. Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Iden DL, vd. PLP/DM20 expression and turnover in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Glia* 2010;58(14):1727-38.
2. Bunge RP, Bunge MB, Bates M. Movements of the Schwann cell nucleus implicate progression of the inner (axon-related) Schwann cell process during myelination. *J Cell Biol* 1989;109:273-84.
3. Snaidero N, Mobius W, Czopka T, Hekking LH, Mathisen C, Verkleij D, vd. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 2014;156(1-2):277-90.
4. Pedraza L, Huang JK, Colman D. Disposition of axonal caspr with respect to glial cell membranes: Implications for the process of myelination. *J. Neurosci. Res.* 2009;87(15):3480-91.
5. Bauer NG, Richter-Landsberg C, Ffrench-Constant C. Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia* 2009;57(16):1691-705.
6. Asou H, Hamada K, Sakota T. Visualization of a single myelination process of an oligodendrocyte in culture by video microscopy. *Cell Struct Funct* 1995;20:59-70.
7. Sobottka B, Ziegler U, Kaech A, Becher B, Goebels N. CNS live imaging reveals a new mechanism of myelination: the liquid croissant model. *Glia* 2011;59(12):1841-9.
8. Readhead C, Schneider A, Griffiths I, Nave KA. Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron* 1994;12:583-95.
9. Gow A, Lazzarini RA. A cellular mechanism governing the severity of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Nat. Genet.* 1996;13(4):422-8.
10. Saher G, Rudolphi F, Corthals K, Ruhwedel T, Schmidt KF, Lowel S, vd. Therapy of Pelizaeus-Merzbacher disease in mice by feeding a cholesterol-enriched diet. *Nat. Med.* 2012;18(7):1130-5.
11. Simons M, Kramer EM, Macchi P, Rathke-Hartlieb S, Trotter J, Nave KA, vd. Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. *J. Cell Biol.* 2002;157(2):327-36.
12. Torii T, Miyamoto Y, Yamauchi J, Tanoue A. Pelizaeus-Merzbacher disease: cellular pathogenesis and pharmacologic therapy. *Pediatr. Int.* 2014;56(5):659-66.
13. Kister A, Kister I. Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Front. Chem.* 2023;10:1041961.
14. Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a Novel Transcriptional Modulator in Glial Cells. *J. Neurosci.* 1998;18(1):237-250.

15. Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K, Nabeshima Y. The Basic Helix-Loop-Helix Factor Olig2 Is Essential for the Development of Motoneuron and Oligodendrocyte Lineages. *Curr. Biol.* 2002;12(13):1157-1163.
16. Long KLP, Breton JM, Barraza MK, Perloff OS, Kaufer D. Hormonal Regulation of Oligodendrogenesis I: Effects across the Lifespan. *Biomolecules* 2021;11(2):283.
17. Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Götz M. Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex. *J Neurosci* 2008;28(41):10434-10442.
18. Psachoulia K, Jamen F, Young KM, Richardson WD. Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron Glia Biol.* 2009;5(3-4):57-67.
19. Dawson MRL, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 2003;24(2):476-488.
20. Dimou L, Gallo V. NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia* 2015;63(8):1429-51.
21. Nishiyama A, Yu M, Drazba JA, Tuohy VK. Normal and reactive NG2⁺ glial cells are distinct from resting and activated microglia. *J. Neurosci. Res.* 1997;48(4):299-312.
22. Simon C, Götz M, Dimou L. Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 2011;59(6):869-881.
23. Levine JM, Reynolds R. Activation and Proliferation of Endogenous Oligodendrocyte Precursor Cells during Ethidium Bromide-Induced Demyelination. *Exp. Neurol.* 1999;160(2):333-347.
24. Li H, Lu Y, Smith HK, Richardson WD. Olig1 and Sox10 Interact Synergistically to Drive Myelin Basic Protein Transcription in Oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 2007;27(52):14375-14382.
25. Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 1983;303(5916):390-396.
26. Nishiyama A, Lin X -H., Giese N, Heldin C -H., Stallcup WB. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF α -receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J. Neurosci. Res.* 1996;43(3):299-314.
27. Kamen Y, Pivonkova H, Evans KA, Káradóttir RT. A Matter of State: Diversity in Oligodendrocyte Lineage Cells. *Neurosci.* 2022;28(2):144-162.
28. Gonsalvez DG, Yoo S, Fletcher JL, Wood RJ, Craig GA, Murray SS, vd. Imaging and quantification of myelin integrity after injury with spectral confocal reflectance microscopy. *Front Mol Neurosci* 2019;12:275.
29. Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, vd. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 2012;485(7399):517-521.

30. Graciani AL, Gutierre MU, Coppi AA, Arida RM, Gutierre RC. Myelin, aging, and physical exercise. *Neurobiol. Aging* 2023;127:70-81.
31. Huxley AF, Stämpeli R. Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *J Physiology* 1949;108(3):315-339.
32. Tasaki I, Takeuchi T. Weitere Studien über den Aktionsstrom der markhaltigen Nervenfasern und über die elektrosaltatorische Übertragung des Nervenimpulses. *Pflüger's Arch. für die gesamte Physiol. des Menschen Tiere* 1942;245(5):764-782.
33. Zalc B. Purinergic Signalling in Neuron–Glia Interactions. *Novartis Found. Symp.* 2010;276:15-25.
34. Jarjour AA, Velichkova AN, Boyd A, Lord KM, Torsney C, Henderson DJ, vd. The formation of paranodal spirals at the ends of CNS myelin sheaths requires the planar polarity protein Vangl2. *Glia* 2020;68(9):1840-1858.
35. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev* 2019;99(3):1381-1431.
36. Osanai Y, Yamazaki R, Shinohara Y, Ohno N. Heterogeneity and regulation of oligodendrocyte morphology. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022;10:1030486.
37. Pepper RE, Pitman KA, Cullen CL, Young KM. How Do Cells of the Oligodendrocyte Lineage Affect Neuronal Circuits to Influence Motor Function, Memory and Mood? *Front Cell Neurosci* 2018;12:399.
38. Matthews MA, Duncan D. A quantitative study of morphological changes accompanying the initiation and progress of myelin production in the dorsal funiculus of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 1971;142(1):1-22.
39. Chong SYC, Rosenberg SS, Fancy SPJ, Zhao C, Shen Y-AA, Hahn AT, vd. Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109(4):1299-1304.
40. Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C. Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 1993;40(3):319-384.
41. Simons M, Nave K-A. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016;8(1):a020479.
42. Cayre M, Falque M, Mercier O, Magalon K, Durbec P. Myelin Repair: From Animal Models to Humans. *Front. Cell. Neurosci.* 2021;15:604865.
43. Almeida RG, Lyons DA. On Myelinated Axon Plasticity and Neuronal Circuit Formation and Function. *J. Neurosci.* 2017;37(42):10023-10034.
44. Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, vd. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* 2006;9(12):1506-1511.
45. Hughes EG, Kang SH, Fukaya M, Bergles DE. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci* 2013;16(6):668-676.

46. Barres BA, Raff MC. Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron* 1994;12(5):935-942.
47. Miller RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog. Neurobiol.* 2002;67(6):451-467.
48. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol Rev* 2001;81(2):871-927.
49. Watkins TA, Emery B, Mulinyawe S, Barres BA. Distinct Stages of Myelination Regulated by γ -Secretase and Astrocytes in a Rapidly Myelinating CNS Coculture System. *Neuron* 2008;60(4):555-569.
50. Czopka T, ffrench-Constant C, Lyons DA. Individual Oligodendrocytes Have Only a Few Hours in which to Generate New Myelin Sheaths In Vivo. *Dev. Cell* 2013;25(6):599-609.
51. Flores AI, Narayanan SP, Morse EN, Shick HE, Yin X, Kidd G, vd. Constitutively Active Akt Induces Enhanced Myelination in the CNS. *J. Neurosci.* 2008;28(28):7174-7183.
52. Tyler WA, Gangoli N, Gokina P, Kim HA, Covey M, Levison SW, vd. Activation of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Is Essential for Oligodendrocyte Differentiation. *J. Neurosci.* 2009;29(19):6367-6378.
53. Goebbels S, Oltrogge JH, Kemper R, Heilmann I, Bormuth I, Wolfer S, vd. Elevated Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate in Glia Triggers Cell-Autonomous Membrane Wrapping and Myelination. *J. Neurosci.* 2010;30(26):8953-8964.
54. Ishii A, Fyffe-Maricich SL, Furusho M, Miller RH, Bansal R. ERK1/ERK2 MAPK Signaling is Required to Increase Myelin Thickness Independent of Oligodendrocyte Differentiation and Initiation of Myelination. *J. Neurosci.* 2012;32(26):8855-8864.
55. Lee S, Leach MK, Redmond SA, Chong SYC, Mellon SH, Tuck SJ, vd. A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nat. Methods* 2012;9(9):917-922.
56. Bechler ME, Byrne L, ffrench-Constant C. CNS Myelin Sheath Lengths Are an Intrinsic Property of Oligodendrocytes. *Curr Biol* 2015;25(18):2411-2416.
57. Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW, Garratt AN, Müller T, Wende H, vd. Neuregulin-1/ErbB Signaling Serves Distinct Functions in Myelination of the Peripheral and Central Nervous System. *Neuron* 2008;59(4):581-595.
58. Goebbels S, Wieser GL, Pieper A, Spitzer S, Weege B, Yan K, vd. A neuronal PI(3,4,5)P3-dependent program of oligodendrocyte precursor recruitment and myelination. *Nat Neurosci* 2017;20(1):10-15.
59. Umemori H, Satot S, Yagi T, Aizawa S, Yamamoto T. Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* 1994;367(6463):572-576.
60. Knobler RL, Stempak JG, Laurencin M. Nonuniformity of the oligodendroglial ensheathment of axons during myelination in the developing rat central nervous system. A serial section electron microscopical study. *J Ultrastruct Res* 1976;55:417-32.

61. Ioannidou K, Anderson KI, Strachan D, Edgar JM, Barnett SC. Time-lapse imaging of the dynamics of CNS glial-axonal interactions in vitro and ex vivo. *PLoS ONE* 2012;7(1):e30775.
62. Kerman BE, Kim HJ, Padmanabhan K, Mei A, Georges S, Joens MS, vd. In vitro myelin formation using embryonic stem cells. *Development* 2015;142(12):2213-25.
63. Nawaz S, Sánchez P, Schmitt S, Snaidero N, Mitkovski M, Velte C, vd. Actin Filament Turnover Drives Leading Edge Growth during Myelin Sheath Formation in the Central Nervous System. *Dev Cell* 2015;34(2):139-151.
64. Zuchero JB, Fu M-M, Sloan SA, Ibrahim A, Olson A, Zaremba A, vd. CNS Myelin Wrapping Is Driven by Actin Disassembly. *Dev. Cell* 2015;34(2):152-167.
65. Klingseisen A, Lyons DA. Axonal Regulation of Central Nervous System Myelination: Structure and Function. *Neurosci.* 2018;24(1):7-21.
66. Kinoshita T. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. *J. Lipid Res.* 2016;57(1):4-5.
67. Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, Phair RD, vd. Kinetic Analysis of Secretory Protein Traffic and Characterization of Golgi to Plasma Membrane Transport Intermediates in Living Cells. *J. Cell Biol.* 1998;143(6):1485-1503.
68. Keller P, Toomre D, Díaz E, White J, Simons K. Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat. Cell Biol.* 2001;3(2):140-149.
69. Simon J-P, Ivanov IE, Adesnik M, Sabatini DD. In Vitro Generation from the trans-Golgi Network of Coatamer-Coated Vesicles Containing Sialylated Vesicular Stomatitis Virus-G Protein. *Methods* 2000;20(4):437-454.
70. Nishimura N, Plutner H, Hahn K, Balch WE. The δ subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002;99(10):6755-6760.
71. Gould RM, Dawson RM. Incorporation of newly formed lecithin into peripheral nerve myelin. *J. cell Biol.* 1976;68(3):480-496.
72. Gould RM. Incorporation of glycoproteins into peripheral nerve myelin. *J. cell Biol.* 1977;75(2):326-338.
73. Colman DR, Kreibich G, Frey AB, Sabatini DD. Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. cell Biol.* 1982;95(2):598-608.
74. Ainger K, Avossa D, Morgan F, Hill SJ, Barry C, Barbarese E, vd. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. cell Biol.* 1993;123(2):431-441.
75. White R, Gonsior C, Krämer-Albers E-M, Stöhr N, Hüttelmaier S, Trotter J. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J. Cell Biol.* 2008;181(4):579-586.
76. Wake H, Lee PR, Fields RD. Control of Local Protein Synthesis and Initial Events in Myelination by Action Potentials. *Science* 2011;333(6049):1647-1651.

77. Laursen LS, Chan CW, French-Constant C. Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *J. Cell Biol.* 2011;192(5):797-811.
78. Snaidero N, Simons M. Myelination at a glance. *Journal of Cell Science* 2014;(14):2999-3004.
79. Snaidero N, Velte C, Myllykoski M, Raasakka A, Ignatov A, Werner HB, vd. Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Reports* 2017;18(2):314-323.
80. Aggarwal S, Snaidero N, Pähler G, Frey S, Sánchez P, Zweckstetter M, vd. Myelin Membrane Assembly Is Driven by a Phase Transition of Myelin Basic Proteins Into a Cohesive Protein Meshwork. *Plos Biol* 2013;11(6):e1001577.
81. Aggarwal S, Yurlova L, Snaidero N, Reetz C, Frey S, Zimmermann J, vd. A Size Barrier Limits Protein Diffusion at the Cell Surface to Generate Lipid-Rich Myelin-Membrane Sheets. *Dev Cell* 2011;21(3):445-456.
82. Poitelon Y, Kopec AM, Belin S. Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells* 2020;9(4):812.
83. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018;19(5):281-296.
84. Chrast R, Saher G, Nave K-A, Verheijen MHG. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res* 2011;52(3):419-434.
85. Träger J, Widder K, Kerth A, Harauz G, Hinderberger D. Effect of Cholesterol and Myelin Basic Protein (MBP) Content on Lipid Monolayers Mimicking the Cytoplasmic Membrane of Myelin. *Cells* 2020;9(3):529.
86. Ando S, Tanaka Y, Toyoda Y, Kon K. Turnover of Myelin Lipids in Aging Brain. *Neurochem. Res.* 2003;28(1):5-13.
87. Shinoda W. Permeability across lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembr.* 2016;1858(10):2254-2265.
88. Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, Möbius W, Tozawa R, Wehr MC, vd. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 2005;8(4):468-475.
89. Berghoff SA, Spieth L, Sun T, Hosang L, Schlaphoff L, Depp C, vd. Microglia facilitate repair of demyelinated lesions via post-squalene sterol synthesis. *Nat Neurosci* 2021;24(1):47-60.
90. Stoffel W, Bosio A. Myelin glycolipids and their functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1997;7(5):654-661.
91. Montani L. Lipids in regulating oligodendrocyte structure and function. *Semin Cell Dev Biol* 2020. doi:10.1016/j.semcdb.2020.07.016.
92. Barnes-Vélez JA, Yasar FBA, Hu J. Myelin lipid metabolism and its role in myelination and myelin maintenance. *Innovation* 2023;4(1):100360.

93. Luoma AM, Kuo F, Cakici O, Crowther MN, Denninger AR, Avila RL, vd. Plasmalogen phospholipids protect internodal myelin from oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 2015;84:296-310.
94. Rouser G, Yamamoto A. Curvilinear regression course of human brain lipid composition changes with age. *Lipids* 1968;3(3):284-287.
95. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* 2000;61(3):267-304.
96. Roach A, Boylan K, Horvath S, Prusiner SB, Hood LE. Characterization of cloned cDNA representing rat myelin basic protein: Absence of expression in brain of shiverer mutant mice. *Cell* 1983;34(3):799-806.
97. Min Y, Kristiansen K, Boggs JM, Husted C, Zasadzinski JA, Israelachvili J. Interaction forces and adhesion of supported myelin lipid bilayers modulated by myelin basic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106(9):3154-3159.
98. Jahn O, Siems SB, Kusch K, Hesse D, Jung RB, Liepold T, vd. The CNS Myelin Proteome: Deep Profile and Persistence After Post-mortem Delay. *Front. Cell. Neurosci.* 2020;14:239.
99. Spörkel O, Uschkureit T, Büssow H, Stoffel W. Oligodendrocytes expressing exclusively the DM20 isoform of the proteolipid protein gene: Myelination and development. *Glia* 2002;37(1):19-30.
100. Lüders KA, Nessler S, Kusch K, Patzig J, Jung RB, Möbius W, vd. Maintenance of high proteolipid protein level in adult central nervous system myelin is required to preserve the integrity of myelin and axons. *Glia* 2019;67(4):634-649.
101. Inoue K. Pelizaeus-Merzbacher Disease: Molecular and Cellular Pathologies and Associated Phenotypes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1190:201-216.
102. Glatigny S, Bettelli E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2018;8(11):a028977.
103. Boru UT, Alp R, Sur H, Gul L. Prevalence of multiple sclerosis door-to-door survey in Maltepe, Istanbul, Turkey. *Neuroepidemiology* 2006;27(1):17-21.
104. ALP R, PLANCI Y, YAPICI Z, BÖRÜ Ü. The Prevalence of Multiple Sclerosis in the North Caucasus Region of Turkey: Door-to-Door Epidemiological Field Study. *Archives of Neuropsychiatry* 2012;49:4.
105. Eraksoy M. MERKEZ,İ SİNİR SİSTEMİNİN MİYELİN HASTALIKLARI. 2009;2015. [<http://www.itfnoroloji.org/MS/MS.htm>].
106. Chari DM. Remyelination In Multiple Sclerosis. *Int. Rev. Neurobiol.* 2007;79:589-620.
107. Correale J, Marrodan M, Ysraelit MC. Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in Progressive Multiple Sclerosis. *Biomedicines* 2019;7(1):14.
108. Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, vd. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1

Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. *Stem Cell Rep.* 2014;2(5):648-61.

109. Simons M, Kramer EM, Thiele C, Stoffel W, Trotter J. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* 2000;151:143-54.

110. Winterstein C, Trotter J, Krämer-Albers E-M. Distinct endocytic recycling of myelin proteins promotes oligodendroglial membrane remodeling. *J Cell Sci* 2008;121(6):834-842.

111. Crawford DK, Mangiardi M, Tiwari-Woodruff SK. Assaying the functional effects of demyelination and remyelination: Revisiting field potential recordings. *J Neurosci Meth* 2009;182(1):25-33.

112. Dai J, Bercury KK, Ahrendsen JT, Macklin WB. Olig1 function is required for oligodendrocyte differentiation in the mouse brain. *J Neurosci* 2015;35(10):4386-4402.

113. Rougon G, Brasselet S, Debarbieux F. Advances in Intravital Non-Linear Optical Imaging of the Central Nervous System in Rodents. *Brain Plast.* 2016;2(1):31-48.

114. Sung Y, Choi W, Fang-Yen C, Badizadegan K, Dasari RR, Feld MS. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging. *Opt Express* 2009;17(1):266.

115. Debailleul M, Georges V, Simon B, Morin R, Haeberlé O. High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples. *Opt. Lett.* 2009;34(1):79.

116. Kwon J, Kim M, Park H, Kang B-M, Jo Y, Kim J-H, vd. Label-free nanoscale optical metrology on myelinated axons in vivo. *Nat Commun* 2017;8(1):1832.

117. Toy MF, Vatandaslar BK, Kerman BE. Refractive index tomography of myelinating glial cells. *Quantitative Phase Imaging V* 2019;10887:1088713-1088713-5.

118. Wang H, Fu Y, Zickmund P, Shi R, Cheng J-X. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Imaging of Axonal Myelin in Live Spinal Tissues. *Biophys J* 2005;89(1):581-591.

119. Fu Y, Huff TB, Wang H-W, Cheng J-X, Wang H. Ex vivo and in vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Opt Express* 2008;16(24):19396.

120. Wang H, Huff TB, Fu Y, Jia KY, Cheng J-X. Increasing the imaging depth of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy with a miniature microscope objective. *Opt. Lett.* 2007;32(15):2212.

121. Bélanger E, Henry FP, Vallée R, Randolph MA, Kochevar IE, Winograd JM, vd. In vivo evaluation of demyelination and remyelination in a nerve crush injury model. *Biomed. Opt. Express* 2011;2(9):2698-2708.

122. Imitola J, Côté D, Rasmussen S, Xie XS, Liu Y, Chitnis T, vd. Multimodal coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy reveals microglia-associated myelin and axonal dysfunction in multiple sclerosis-like lesions in mice. *J. Biomed. Opt.* 2011;16(2):021109-021109-11.

123. Shi Y, Zhang D, Huff TB, Wang X, Shi R, Xu X-M, vd. Longitudinal in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of demyelination and remyelination in injured spinal cord. *J. Biomed. Opt.* 2011;16(10):106012-106012-4.
124. Weigelin B, Bakker G-J, Friedl P. Third harmonic generation microscopy of cells and tissue organization. *J. Cell Sci.* 2016;129(2):245-255.
125. Pallen S, Shetty Y, Das S, Vaz JM, Mazumder N. Advances in nonlinear optical microscopy techniques for in vivo and in vitro neuroimaging. *Biophysical Rev* 2021;13(6):1199-1217.
126. Lim H, Sharoukhov D, Kassim I, Zhang Y, Salzer JL, Melendez-Vasquez CV. Label-free imaging of Schwann cell myelination by third harmonic generation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014;111(50):18025-18030.
127. Farrar MJ, Wise FW, Fetcho JR, Schaffer CB. In Vivo Imaging of Myelin in the Vertebrate Central Nervous System Using Third Harmonic Generation Microscopy. *Biophys. J.* 2011;100(5):1362-1371.
128. Débarre D, Supatto W, Pena A-M, Fabre A, Tordjmann T, Combettes L, vd. Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nat. Methods* 2006;3(1):47-53.
129. Schain AJ, Hill RA, Grutzendler J. Label-free in vivo imaging of myelinated axons in health and disease with spectral confocal reflectance microscopy. *Nat Med* 2014;20(4):443-449.
130. Kwon J, Choi M. Spectral Reflectometric Microscopy on Myelinated Axons In Situ. *J. Vis. Exp.* 2018;(137). doi:10.3791/57965.
131. Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 2006;1(1):241-5.
132. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, vd. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 2012;9(7):676-82.
133. Tinevez JY, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, vd. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* 2017;115:80-90.
134. Chomiak T, Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *Plos One* 2009;4(11):e7754.
135. Franklin RJM, ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(11):839-855.
136. Zheng J, Sun X, Ma C, Li B, Luo F. Voluntary wheel running promotes myelination in the motor cortex through Wnt signaling in mice. *Mol. Brain* 2019;12(1):85.
137. Xiong H, Zhou Z, Wu Z, Feng Y, Xie F. BALB/c mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*: A new model for demyelination in the brain. *Anatomical Rec* 2021;304(5):1084-1093.

138. Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, vd. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 2013;16(9):1211-1218.
139. Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SPJ, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, vd. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 2010;6(6):578-590.
140. Duncan ID, Marik RL, Broman AT, Heidari M. Thin myelin sheaths as the hallmark of remyelination persist over time and preserve axon function. *Proc National Acad Sci* 2017;114(45):E9685-E9691.
141. Remahl S, Hildebrand C. Relations between axons and oligodendroglial cells during initial myelination. II. The individual axon. *J Neurocytol* 1990;19:883-98.
142. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001;81:871-927.
143. Benninger Y, Colognato H, Thurnherr T, Franklin RJM, Leone DP, Atanasoski S, vd. β 1-Integrin signaling mediates premyelinating oligodendrocyte survival but is not required for CNS myelination and remyelination. *J Neurosci* 2006;26(29):7665-7673.
144. Lee AJ, Hugonnet H, Kim YS, Kim J-G, Lee M, Ku T, vd. Volumetric refractive index measurement and quantitative density analysis of mouse brain tissue with sub-micrometer spatial resolution. *Adv. Photonics Res.* 2023. doi:10.1002/adpr.202300112.
145. Stassart RM, Möbius W, Nave K-A, Edgar JM. The axon-myelin unit in development and degenerative disease. *Front Neurosci-switz* 2018;12:467.
146. Hajjar H, Boukhaddaoui H, Rizgui A, Sar C, Berthelot J, Perrin-Tricaud C, vd. Label-free non-linear microscopy to measure myelin outcome in a rodent model of Charcot-Marie-Tooth diseases. *J Biophotonics* 2018;11(12):e201800186.
147. Nave K-A, Werner HB. Ensheatment and myelination of axons: evolution of glial functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 2021;44(1):1-23.
148. Ozsvár A, Szipőcs R, Ozsvár Z, Baka J, Barzó P, Tamás G, vd. Quantitative analysis of lipid debris accumulation caused by cuprizone induced myelin degradation in different CNS areas. *Brain Res. Bull.* 2018;137:277-284.
149. Buttigieg E, Scheller A, Waly BE, Kirchhoff F, Debarbieux F. Contribution of intravital neuroimaging to study animal models of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 2023;20(1):22-38.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.11654
Konu : Etik Kurulu Kararı

05/03/2020

Sayın Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Beyinde demiyelinizasyon tespit yönteminin geliştirilmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYЕК) Başkanı

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 05.03.2020 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 34BBC6B3X2 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto: bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
04/03/2020	26		Doç. Dr. Bilal Ersen KERMAN

“Beyinde demiyelinizasyon tespit yönteminin geliştirilmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi:01/06/2020-1 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-38828770-772.02-835
Konu: Etik Kurulu Kararı

31/01/2023

Sayın Doç. Dr. BİLAL ERSEN KERMAN

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 05/03/2020 tarihli 38828770-604.01.01-E.11654 sayı no ile onay verilen "Beyinde demiyelinizasyon tespit yönteminin geliştirilmesi" isimli çalışmanız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

- Yukarıda detayları verilen çalışmanız için **"8 adet" BALB/cJ (WT) 1,5-2 aylık erkek fare sayısının "20" ye çıkarılması** isteği ve deney grubu olarak **14 ve 21 gün remiyelinizasyon (recovery)** gruplarının eklenmesi isteği.

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evracınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden E732211EX0 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi (Ana Yerleşke Rektörlük)
Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19, Kavacık Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55
E-Posta: bilgi@medipol.edu.tr İnternet Adresi: www.medipol.edu.tr
Kep Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kep.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilge KAYA
Tel: 5461 E-Posta: bilge.kaya@medipol.edu.tr



Sayı : E-38828770-604.02-4750
Konu : Etik Kurul Kararı

05/08/2024

Sayın Doç. Dr. Bilal Ersen Kerman

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Beyinde Demiyelinizasyon Tespit Yönteminin Geliştirilmesi" isimli başvuruza ilişkin değişiklik dilekçeniz incelenmiş olup, aşağıda belirtilen değişikliğin uygun bulunduğu karar verilmiştir.

Bilgilerinize sunarım.

- Projemizde deneysel prosedür olarak sekonder hücre hattında nöron hücrelerinin demiyelinizasyon durumunun incelenmesinin eklenmesi ve araştırma konumuzun hem hücre kültürünü, hem in vivo sistemini kapsıyor olması, hem de beyinle kısıtlı olmayıp genel sinir sisteminin incelenmesi nedeniyle "Beyinde Demiyelinizasyon Tespit Yönteminin Geliştirilmesi" olan proje başlığının "Sinir Sisteminde Miyelin Membran Dinamiğinin İncelenmesi" olarak değiştirilmesi

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed İktbal ALP
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(MED-HADYЕК) Başkanı

EK:
Değişiklik Dilekçesi

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden ABDE93CFX0 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi (Ana Yerleşke Rektörlük)
Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19, Kavacık Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55
E-Posta: bilgi@medipol.edu.tr İnternet Adresi: www.medipol.edu.tr
Kep Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kep.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Fatma GÜZHAN
Tel: 5771 E-Posta: Fatma.guzhan@medipol.edu.tr

