

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

GLT-1 (GLUTAMAT TRANSPORTER 1) PROMOTORUNUN,
SIRT4 (SIRTUIN 4) SUSTURULMUŞ, GLİA
HÜCRELERİNDE DÜZENLENMESİ

ERKAN USLUER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN

Bu tez TÜBİTAK 1002 projeleri kapsamında 222S687 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve tez çalışmam süresince bilgisiyle, anlayışıyla ve engin tecrübeleri ile her daim yanımda olan, tez çalışmam boyunca her düştüğümde bana destek olan, sürekli bir motivasyon ve enerji kaynağı olan, çok büyük saygı duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Gizem Dönmez Yalçın'a,

Hem ders hem tez döneminde gösterdiği sabır ve hoşgörü ile bana destek olan, tez çalışmam sırasında bilgi birikimini ve tecrübesini benimle paylaşan çok değerli hocam Prof. Dr. Abdullah Yalçın'a,

Yüksek lisansa başlamamı ve bugün bu noktaya gelmemi sağlayan, bu uzun ve zorlu süreç içerisinde her daim hem maddi hem manevi anlamda bana çok büyük destek olan, hayatımda iyi ki tanışmışım dediğim çok sevdiğim iki güzel insan Agit Çetinkaya'ya ve Emre Yeşilören'e,

Çalışmış olduğum laboratuvarı harika zamanlar geçirmemi sağlayan, her ihtiyacım olduğunda yardımına gelen arkadaşlarım Elif Bayrak'a, Yaren Akdoğan'a, Cansel Yıldırım'a ve en önemlisi bütün tez çalışma sürecim boyunca yanımda olan, bildiği her şeyi büyük bir sabır ve hoşgörü içerisinde benimle paylaşan, bütün çalışma süresi boyunca önümdeki yola ışık tutan Ayşenur Akkulak'a,

En içten ve derin teşekkürleri, bu işin başını, ortasını ve sonunu mümkün kılan aileme borçluyum, geri dönüp baktığımda hayatımın değiştiği anları kolaylıkla görebiliyorum, sizler o anların birer parçasıydınız, benim için yaptıkları her şey için sevgili annem Kezban Usluer'e, babam Selim Usluer'e ve kardeşim Nida Usluer'e,

Son olarak hayatıma girdiği günden beri attığım her adımda hayatıma renk ve anlam katan, ne olursa olsun kötü olduğum her anımda bunu hissederek destekçim olan, hayatımda olsun ya da olmasın bu süreçte sevgisine tutunduğum, bana inancını hiçbir zaman yitirmeyerek sevgisi ile yanımda olan, hayatımın köşe taşlarından biri olan arkadaşım, sevdiğim kadın Hacer Ağar'a,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Glutamat	3
2.1.1 Glutamat Metabolizması.....	3
2.1.2. Glutamat Reseptörleri.....	5
2.1.2.1. İyonotropik Reseptörler.....	5
2.1.2.2. Metabotropik Reseptörler	6
2.1.3. Glutamat Taşıyıcıları	6
2.1.3.1. EAAT1-GLAST (Glutamat-Aspartat Taşıyıcısı)	7
2.1.3.2 EAAT2-GLT-1 (Glutamat Taşıyıcısı-1).....	7
2.1.3.3. EAAT3 (Eksitatör Amino Asit Taşıyıcısı 3)	9
2.1.3.4. EAAT4 (Eksitatör Amino Asit Taşıyıcısı 4)	10
2.1.3.5. EAAT5 (Eksitatör Amino Asit Taşıyıcısı 5)	10
2.2. Eksitotoksisite.....	10
2.3. Sirtuinler	11
2.3.1. SIRT4	12

2.4. Transkripsiyon Faktörleri	14
2.4.1. CREB (The cyclic AMP response element (CRE) – binding protein (CREB)).....	15
2.4.2. REST (The Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor).....	15
2.4.3. YY1 (Yin-Yang 1).....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Gereç.....	17
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	17
3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	18
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Hücre Kültürü Uygulamaları	20
3.2.1.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi.....	20
3.2.1.2. Hücre Pasajlama	20
3.2.1.3. Hücre Dondurulması	21
3.2.1.4. Hücre Sayımı ve Ekilmesi	21
3.2.1.5. SIRT4'ün SIRT4-shRNA İçeren Lentiviral Partikül ile Susturulması.....	22
3.2.1.6. Hücreden Protein İzolasyonu	22
3.2.2. Bradford Assay	23
3.2.3. Western Blot.....	23
3.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	24
3.2.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi.....	25
3.2.6. Real Time PCR (RT-PCR)	25
3.2.7. Kromatin İmmünopresipitasyon (CHIP)	26
3.2.8. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR	28
4.1. Hücrelerdeki SIRT4 Protein İfadesinin Belirlenmesi.....	28

4.2. GLT-1 mRNA Seviyesinin Belirlenmesi	29
4.3. GLT-1 Promotoru ve Transkripsiyon Faktörlerinin (CREB, REST ve YY1) Etkileşiminin CHIP Metodu ile Gösterilmesi	29
5. TARTIŞMA.....	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR.....	35
BİLİMSEL ETİK BEYANI	40
ÖZ GEÇMİŞ.....	41



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	: α -amino-3-hidroksil-5-metil-4-izoazoleproponik asit
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Ca⁺²	: Kalsiyum
CHIP	: Chromatin Immunoprecipitation
CNS	: Central Nervous System
CRE	: The cyclic AMP response element
CREB	: The cyclic AMP response element – binding protein
dH₂O	: Distile su
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EAAT	: Eksitator amino asit taşıyıcı
EAAT1	: Eksitator amino asit taşıyıcı 1
EAAT2	: Eksitator amino asit taşıyıcı 2
EAAT3	: Eksitator amino asit taşıyıcı 3
EAAT4	: Eksitator amino asit taşıyıcı 4
EAAT5	: Eksitator amino asit taşıyıcı 5
GBM	: Glioblastoma
GDH	: Glutamat dehidrojenaz
GLT-1	: Glutamat taşıyıcı 1
GluR	: Glutamat reseptörleri
GS	: Glutamin sentetaz
H	: Hidrojen

IHA	: Immortalize human astrocyte
iGluR	: İyonotropik reseptörler
KAR	: Kainat reseptörü
MSS	: Merkezi sinir sistemi
mGLUR	: Metabotropik reseptörler
mRNA	: Mesajcı RNA
Na	: Sodyum
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat-reseptörü
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NRSF	: Neuron- Restrictive Silencer Factor
P	: Fosfor
REST	: The Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon assay
RNA	: Ribonükleik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SIRT	: Sirtüin
SIRT1	: Sirtüin 1
SIRT2	: Sirtüin 2
SIRT3	: Sirtüin 3
SIRT4	: Sirtüin 4
SIRT5	: Sirtüin 5
SIRT6	: Sirtüin 6
SIRT7	: Sirtüin 7
Sir2	: Silent information regulator 2
SLC1A2	: Solute carrier family member 2

SLC1A3	: Solute carrier family member 3
SLC1A6	: Solute carrier family member 6
SLC1A7	: Solute carrier family member 7
TCA	: Sitrik asit
TEMED	: Tetrametiletildiamin
YY1	: Yin-Yang 1



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Glutamat Metabolizması	4
Şekil 2. Glutamat Döngüsü	5
Şekil 3. Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması	6
Şekil 4. Glutamat Taşıyıcısı 1	9
Şekil 5. Amyotrofik lateral sklerozda (ALS) eksitotoksisite durumunun şematik gösterimi	11
Şekil 6. Memeli Sirtuinlerin katalitik kapasitesi ve hücre içi lokalizasyonu	12
Şekil 7. IHA Hücre Hattında SIRT4 Geninin Susturulması.....	28
Şekil 8. IHA Kontrol ve SIRT4 Susturulmuş Hücre Hattında qPCR Yöntemi ile Belirlenen GLT-1 mRNA İfadesinin Gösterilmesi.....	29
Şekil 9. GLT-1 Promotoru Üzerinde Bulunan Transkripsiyon Faktörleri	30
Şekil 10. Kromatin İmmünopresipitasyon Sonrası Gerçekleştirilen qPCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	31

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Memeli glutamat taşıyıcılarının ve bunların insan homologlarının dağılımı (Maragakis ve ark, 2001'den modifiye edilmiştir..... 7	7
Tablo 2. Sirtuinlerin Sınıflandırılması (Min ve ark, 2019(36)) 13	13
Tablo 3. Deneyde kullanılan primer baz dizileri 26	26
Tablo 4. qPCR reaksiyon şartları 26	26
Tablo 5. CHIP tekniğinde kullanılacak olan genlerin Forward primer baz dizileri..... 27	27
Tablo 6. CHIP tekniğinde kullanılacak olan genlerin Reverse primer baz dizileri 27	27

ÖZET

GLT-1 (GLUTAMAT TAŞIYICI 1) PROMOTORUNUN, SIRT4 (SIRTUIN 4) SUSTURULMUŞ GLİA HÜCRELERİNDE DÜZENLENMESİ

Usluer E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2023.

Amaç: Glutamat Taşıyıcı 1 (GLT-1), sinaptik boşlukta bulunan fazla glutamata toplayan eksitatör amino asit taşıyıcı (EAAT) protein ailesinin bir üyesidir. SIRT4 (Sirtuin 4), beyindeki glia hücrelerinde eksprese olan ve çeşitli proteinleri deasetile ya da ADP-ribozile edebilen mitokondriyal bir sirtuindir. SIRT4, GLT-1 protein ekspresyonunu düzenleyerek eksitotoksisiteye karşı koruma sağlar. Bu nedenle çalışmada SIRT4'ün GLT-1 geninin transkripsiyonel regülasyonunda etkili olup olmadığını araştırmak amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: İlk olarak IHA (Immortalized Human Astrocytes) hücre hattında SIRT4'ü susturmak için dizayn edilmiş olan shRNA genini içeren lentiviral partiküller kullanılarak SIRT4 geni susturulmuş olan IHA hücreleri elde edildi. Kontrol ve SIRT4-susturulmuş IHA hücrelerindeki GLT-1 mRNA seviyeleri qPCR yöntemi kullanılarak belirlendi. SIRT4'ün susturulduğunu göstermek için SIRT4 protein ifadesine Western Blot yöntemi kullanılarak bakıldı. GLT-1 promotoru ve transkripsiyon faktörlerinin (CREB, REST ve YY1) etkileşimi CHIP (Kromatin İmmünopresipitasyon) metodu ile kontrol ve SIRT4-susturulmuş IHA hücrelerinde gösterildi.

Bulgular: SIRT4, SIRT4'ü susturmak için dizayn edilmiş olan shRNA genini içeren lentiviral partiküller ile IHA hücrelerinde susturulduktan sonra IHA kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri olarak iki deney grubu elde edilmiştir. Kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücrelerinden protein izole edilerek, SIRT4 protein seviyeleri western blot ile incelenmiş ve SIRT4 geninin susturma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Daha sonrasında, her iki hücre grubundan total RNA izole edilmiş, cDNA yapılmış ve GLT-1 mRNA seviyesini belirlemek için qPCR analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, her iki gruptaki GLT-1 mRNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği ortaya çıkmıştır. CREB, REST ve YY1 transkripsiyon faktörlerinin, GLT-1 promotorunda

yer aldığı yapılan CHIP deneyleri ile gösterilmiştir. CHIP analizinde, transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı DNA bölgeleri qPCR ile çoğaltılmaktadır. SIRT4 susturulmuş hücre grubunda da CREB, REST ve YY1 transkripsiyon faktörleri GLT-1 promotoruna bağlanmıştır. SIRT4'ün susturulması, CHIP analizinde anlamlı bir fark yaratmamıştır.

Sonuç: Bu çalışmada, SIRT4'ün GLT-1'i transkripsiyonel düzeyde regüle ettiği düşünülerek araştırmalar yapılmış ve çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. IHA hücrelerinde, SIRT4 geninin susturulması, GLT-1 mRNA seviyesini değiştirmemiştir. SIRT4 geninin susturulmasının, CREB, REST ve YY1 transkripsiyon faktörlerinin, GLT-1 promotoruna bağlanmasına etkisi olmamıştır.

Anahtar Kelimeler: CREB, GLT-1, REST, SIRT4, YY1.

ABSTRACT

REGULATION OF THE GLUTAMATE TRANSPORTER 1 (GLT-1) PROMOTER IN SIRTUIN 4 (SIRT4) SILENCED GLIAL CELLS

Usluer E. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Medical Biology Program, Master Thesis, Aydın, 2023.

Objective: Glutamate Transporter 1 (GLT-1) is a member of the excitatory amino acid transporter (EAAT) protein family that collects excess glutamate present in the synaptic cleft. SIRT4 (Sirtuin 4) is a mitochondrial sirtuin expressed in glial cells in the brain and can deacetylate or ADP-ribosylate various proteins. SIRT4 protects against excitotoxicity by regulating GLT-1 protein expression. Therefore, the study aimed to determine whether SIRT4 is effective in the transcriptional regulation of the GLT-1 gene.

Material and Methods: First, IHA cells with the SIRT4 gene silenced were obtained by using lentiviral particles containing the shRNA gene designed to silence SIRT4 in the IHA (Immortalized Human Astrocytes) cell line. GLT-1 mRNA levels were determined using the qPCR method. To show that SIRT4 was silenced, SIRT4 protein expression was measured using the Western Blot method. The interaction of GLT-1 promoter and transcription factors (CREB, REST and YY1) was demonstrated in both experimental groups by the CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) method.

Results: After SIRT4 was silenced in IHA cells with lentiviral particles containing the shRNA gene designed to silence SIRT4, two experimental groups were obtained: IHA control and SIRT4 silenced IHA cells. By isolating protein from control and SIRT4 silenced IHA cells, SIRT4 protein levels were examined by western blot and it was shown that the silencing of the SIRT4 gene was successfully carried out. Subsequently, total RNA was isolated from both cell groups, cDNA was made and qPCR analysis was performed to determine the GLT-1 mRNA level. As a result of the analysis, it was revealed that there was no statistically significant difference between GLT-1 mRNA levels in both groups. CHIP experiments have shown that CREB, REST and YY1 transcription factors are located in the GLT-1 promoter. In CHIP analysis, DNA regions to which transcription factors bind are amplified by qPCR.

In the SIRT4 silenced cell group, CREB, REST and YY1 transcription factors bound to the GLT-1 promoter. Silencing SIRT4 did not make a significant difference in the CHIP analysis.

Conclusion: In this study, research was conducted considering that SIRT4 regulates GLT-1 at the transcriptional level and various results were obtained. In IHA cells, silencing the SIRT4 gene did not alter the GLT-1 mRNA level. Silencing the SIRT4 gene had no effect on the binding of CREB, REST and YY1 transcription factors to the GLT-1 promoter.

Keywords: CREB, GLT-1, REST, SIRT4, YY1.



1. GİRİŞ

Nörotransmitterler, sinir sistemi boyunca bilgi aktarımında önemli bir role sahip olan, hücrelerdeki sinyalleri ileten, güçlendiren ve dönüştüren moleküllerdir. Geçtiğimiz yüzyılda bu tür yüzlerce kimyasal keşfedilmiştir. Bunların beyin hastalıkları üzerindeki etkileri belirlenmeye ve incelenmeye devam etmektedir (Teleanu, Raluca Ioana ve ark, 2022). Glutamat insan beyinde bulunan önemli bir uyarıcı nörotransmitterdir. Beyinde öğrenme, hafıza ve nöronal gelişim gibi birçok süreçte önemli bir rol oynamaktadır (Nisar ve ark, 2022). Eksitotoksiste sinaptik yarıktaki aşırı glutamat birikimi ile indüklenen ve nörodejenerasyon, epilepsi, travma gibi bütün beyin rahatsızlıklarının altında yatan temel moleküler yollardan bir tanesidir (Sarı ve ark, 2020).

Sinir hücreleri arasında bulunan sinaptik yarıktaki glutamat konsantrasyonunun dengede kalması glutamat taşıyıcıları ile sağlanmaktadır. Glutamat Taşıyıcısı 1 (GLT-1), “SLC1A2” geni tarafından kodlanan eksitator amino asit taşıyıcı (EAAT) protein ailesinin bir üyesidir (Simonin ve ark, 2015). Aşırı glutamat birikimine dayalı eksitotoksiste durumunda GLT-1 sinaptik yarıktaki bulunan glutamatın %90’ını toplayarak eksitotoksisteye karşı koruyucu bir etki oluşturur (Karace ve ark, 2011).

Sirtuinler, post-translasyonel modifikasyonlar için hücre içerisindeki çeşitli proteinleri hedef alan, çekirdekte, sitozolde ya da hücrenin mitokondrisinde bulunan bir protein ailesidir. Sirtuin protein ailesinin 7 homoloğu bulunmaktadır. Hücre içerisinde farklı kompartmanlarda lokalize olabilen sirtuin ailesinin bir üyesi de Sirtuin 4 (SIRT4) proteinidir. Sirtuin 4 (SIRT4), büyük ölçüde beyindeki glia hücrelerinde eksprese olan mitokondriyal bir sirtuindir (Shih ve ark, 2014). Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda SIRT4’ün doğrudan eksitotoksisteye karşı koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Dönmez Yalçın ve Çolak, 2020).

Sekans spesifik transkripsiyon faktörleri, transkripsiyonel düzenleyici bölgelere bağlanarak fonksiyon gösteren biyolojik süreçlerin anahtar düzenleyicileridir (Inukai ve ark, 2017). Bazı transkripsiyon faktörleri transkripsiyon başlangıç bölgesinin yakınında bulunan promotor bölgeye bağlanarak transkripsiyon başlangıç kompleksinin oluşmasına yardımcı olurken bazıları güçlendirici diziler gibi transkripsiyon başlangıç noktasına daha uzak dizilere bağlanarak transkripsiyonu güçlendirebilir ya da baskılayabilir (Gilbert, 2000).

CREB (The cyclic AMP response element (CRE) – binding protein (CREB)) aktivatör ailesi, hücresel metabolizmanın kontrolü ve büyüme faktörlerine bağlı hücresel hayatta kalma

gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan ve çeşitli protein kinazlar vasıtasıyla hücre içi Ca^{+2} akışına yanıt veren bir transkripsiyon faktörüdür (Mayr ve ark, 2001). “Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF)” olarak da bilinen, REST (The Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor), iyon kanalları, nörotransmitter reseptörler, sinaptik vezikül proteinleri ve adhezyon molekülleri ile ilişkili çeşitli genleri düzenleyen çinko-parmak transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir (Pajarillo ve ark, 2022). YY1 (Yin-Yang 1), mevcut kofaktörler ile etkileşimine bağlı olarak gen transkripsiyonunu aktive edip, durdurabileceği gibi embriyogenez, farklılaşma, replikasyon ve proliferasyon sırasında merkezi sinir sisteminde rol alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Karki ve ark, 2014).

Bu çalışmada SIRT4 proteininin GLT-1 geninin transkripsiyonel regülasyonunda etkili olup olmadığını araştırmak amaçlandı. SIRT4, SIRT4’ü susturmak için dizayn edilmiş olan shRNA genini içeren lentiviral partiküller ile IHA hücrelerinde susturulduktan sonra IHA kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri olarak iki deney grubu elde edilmiştir. Kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücrelerinden protein izole edilerek, SIRT4 protein seviyeleri western blot ile incelenmiş ve SIRT4 geninin susturma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Daha sonrasında, her iki hücre grubundan total RNA izole edilmiş, cDNA yapılmış ve GLT-1 mRNA seviyesini belirlemek için qPCR analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, her iki gruptaki GLT-1 mRNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği ortaya çıkmıştır. CREB, REST ve YY1 transkripsiyon faktörlerinin, GLT-1 promotorunda yer aldığı yapılan CHIP (Kromatin Immunopresipitasyon) deneyleri ile gösterilmiştir. CHIP analizinde, transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı DNA bölgeleri qPCR ile çoğaltılmaktadır. SIRT4 susturulmuş hücre grubunda da CREB, REST ve YY1 transkripsiyon faktörleri GLT-1 promotoruna bağlanmıştır. SIRT4’ün susturulması, CHIP analizinde anlamlı bir fark yaratmamıştır.

Sonuç olarak; IHA hücrelerinde, SIRT4 geninin susturulması, GLT-1 mRNA seviyesini değiştirmemiştir. SIRT4 geninin susturulmasının, CREB, REST ve YY1 transkripsiyon faktörlerinin, GLT-1 promotoruna bağlanmasına etkisi olmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glutamat

Glutamat, memeli merkezi sinir sistemindeki (CNS) birincil uyarıcı nörotransmitterdir. Beyinde glutamat; hafıza, öğrenme, sinir sistemi gelişimi, hücrel göç, hücrel farklılaşma ve nöron ölümü gibi çok sayıda fizyolojik fonksiyonda rol oynar (Magi ve ark, 2019). Beyin de çok büyük miktarlarda glutamat bulunur. Fakat bu glutamatın sadece küçük bir kısmı hücrelerin dışında veya arasında yer alır. Hücre dışı sıvıdaki ve beyin omurilik sıvısındaki (BOS) konsantrasyonlar normalde sırasıyla 3-4 μM ve 10 μM civarındadır (Danbolt, 2001).

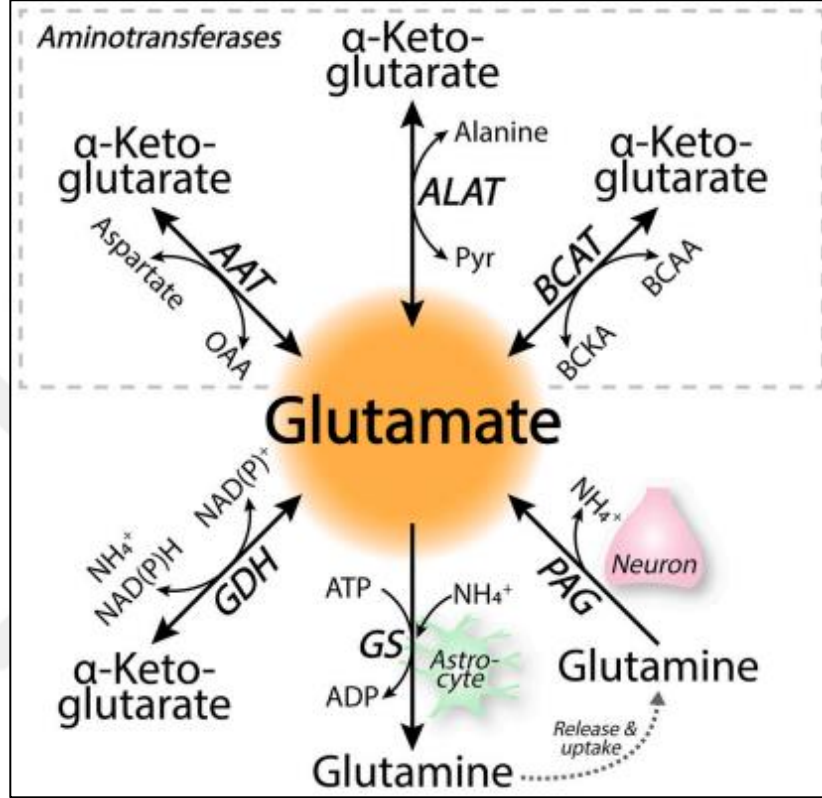
Glutamat, hücre yüzeyindeki reseptörler ile etkileşime girebilir. Glutamat için iki ana reseptör sınıfı tanımlanmıştır ve glutamat bu reseptörler aracılığıyla etkisini gösterir. Bu reseptör sınıflarının ilki glutamat ile uyarılma sonucu akımlar üreten ligand kapılı iyon kanalları olan iyonotropik glutamat reseptörleri ve G protein sinyal yolları ile hücrel süreçleri kontrol eden G proteinine bağlı metabotropik glutamat reseptörleridir (Magi ve ark, 2019).

2.1.1. Glutamat Metabolizması

Nörotransmitter glutamatın hücrel homeostazisi normal beyin fonksiyonu için gereklidir. Glutamat sadece beynin ana uyarıcı nörotransmitteri değildir. Glutamat, glikoz ve amino asit metabolizmasını birbirine bağlayan bir metabolik merkezi temsil eder. Bu önemli nörotransmitter molekül, glutamat-glutamin döngüsü olarak bilinen bir süreçte nöronlar ve astrositler arasında kapsamlı bir şekilde geri dönüştürülür (Andersen ve ark, 2021).

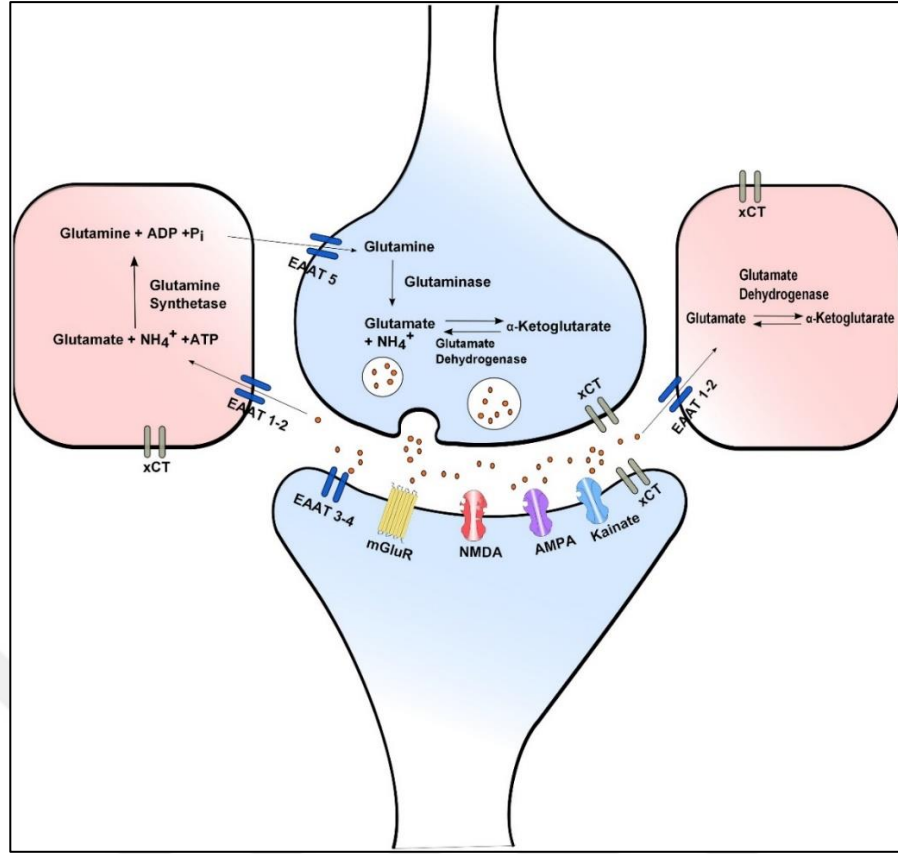
Sinaptik iletim sırasında, glutamat esas olarak ekzositoz yoluyla salınır; burada tek bir vezikülün salınması, sinaptik yarıktaki glutamatın hızlı bir şekilde yükselmesine neden olur. Çeşitli enzimatik reaksiyonlar glutamatı hücrel metabolizmaya ve glutamaterjik sinaptaki nörotransmitter geri dönüşümüne bağlar (Atwell ve Laughlin, 2001). Glutamatın karbon iskeleti, üç aminotransferaz reaksiyonuyla; aspartat aminotransferaz (AAT), alanin aminotransferaz (ALAT) ve dallanmış zincirli amino asit aminotransferaz (BCAT) yoluyla

TCA siklusunun ara maddesi olan α -ketoglutarata (α -KG) dönüştürülür. Glutamat ayrıca hem nöronlarda hem de astrositlerde anaplerotik bir yol görevi gören glutamat dehidrojenaz (GDH) enzimi yoluyla α -ketoglutarata oksidatif deaminasyona uğrayabilir (Andersen ve ark, 2021).



Şekil 1. Glutamat Metabolizması (Andersen ve ark, 2021)

Astrositlerde glutamat, yalnızca astrositlerde eksprese edilen bir enzim olan glutamin sentetaz (GS) enzimi aracılığıyla glutamine dönüştürülür. Glial glutamin, Na^+ 'ya bağımlı glutamin alım sistemleri yoluyla presinaptik nörona alınır ve burada glutaminaz tarafından glutamata dönüştürülür (Kritis ve ark, 2015).



Şekil 2. Glutamat Döngüsü (Kritis ve ark, 2015)

2.1.2. Glutamat Reseptörleri

Glutamat, G proteinine bağlı reseptörler olan metabotropik glutamat reseptörlerine (mGluR) ve katyon geçirgen ligand kapılı iyon kanalları olan iyonotropik glutamat reseptörlerine (iGluR) bağlanarak memeli merkezi sinir sistemindeki (CNS) çoğu uyarıcı nörotransmisyona aracılık eder. Metabotropik glutamat reseptörlerinin ve iyonotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu, çok farklı zaman ölçeklerinde farklı hücresel tepkiler üretir (Hansen ve ark, 2021).

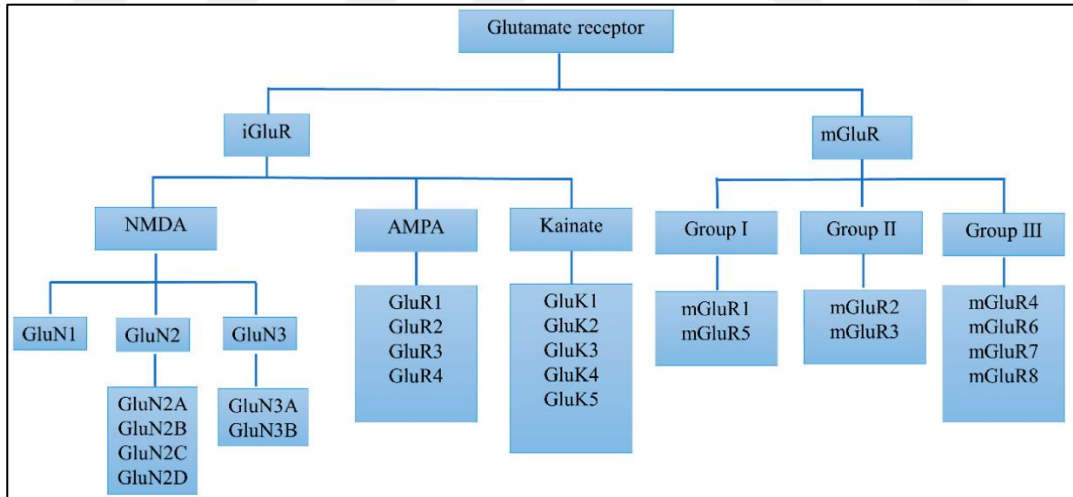
2.1.2.1. İyonotropik Reseptörler

İyonotropik glutamat reseptörleri multimerik iyon kanallarıdır ve memeli merkezi sinir sisteminde hızlı uyarıcı iletimden sorumludur. Presinaptik olarak salınan glutamati

iyonotropik glutamat reseptörleri bağlayarak, sinyalleri milisaniyelik bir zaman ölçeğinde postsinaptik nöronların uyarılmasına dönüştürür. Bu süreç, beyin fonksiyonu için hayati öneme sahip bir sinaptik akım üretir. Aynı zamanda öğrenmeyi ve hafızayı düzenler. İyonotropik glutamat reseptörleri ayrıca N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptörleri, a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit (AMPA) reseptörleri ve kainat reseptörleri olarak sınıflandırılabilir (Zhang Z. ve ark, 2019).

2.1.2.2. Metabotropik Reseptörler

Metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR), hücre içi G-proteinine bağlı, tek peptitli transmembran zar proteinleridir. G-protein reseptörleri ailesinin üyeleri olan mGluR'ler, sinaptik aktivitede uzun süreli değişikliklere katkıda bulunan yavaş glutamat yanıtlarına aracılık eder. mGluR ailesi ayrıca sekiz reseptör alt tipine bölünebilir. Bu alt tipler sekans homolojilerine, sinyal iletim mekanizmalarına ve farmakolojik profillerine göre üç alt tipe ayrılır (Lau ve ark, 2010).



Şekil 3. Glutamat reseptörlerinin sınıflandırılması (Zhang Z. ve ark, 2019)

2.1.3. Glutamat Taşıyıcıları

Glutamat baskın uyarıcı nörotransmitter olduğundan, çoğu beyin fonksiyonunda ve ayrıca birçok nörolojik bozuklukta yer alır. Aynı zamanda glutamat konsantrasyonlarının

düzenlenmesi oldukça zordur. Glutamat taşıyıcıları, dinamik sinaptik sinyalleşme süreçlerini sürdürmek için hücre dışı glutamat konsantrasyonlarını düzenlemede önemli bir rol oynar (Vandenberg ve ark, 2013). Hem nöronlar hem de astroglialar yüksek afiniteli, sodyuma bağımlı glutamat taşıma kapasitesine sahiptir. Bugüne kadar memeli ve insan dokusundan 5 adet yüksek afiniteli, sodyuma bağımlı glutamat taşıyıcı klonlanmıştır: Astrosit-spesifik glutamat taşıyıcısı (GLAST [eksitator amino asit taşıyıcısı 1]), glutamat taşıyıcısı 1 (GLT-1 [eksitator amino asit taşıyıcısı 2 (EAAT2)]), eksitator amino asit taşıyıcısı 3 (EAAT3), eksitator amino asit taşıyıcısı 4 (EAAT4) ve eksitator amino asit taşıyıcısı 5 (EAAT5) (Maragakis ve ark, 2001).

Tablo 1. Memeli glutamat taşıyıcılarının ve bunların insan homologlarının dağılımı (Maragakis ve ark, 2001'den modifiye edilmiştir).

Glutamate Transporter	Human Homologue	Cell Type	Distribution
GLAST	EAAT1	Astrocytes	High expression of cerebellum; less in brain and spinal cord
GLT-1	EAAT2	Astrocytes	Widespread throughout brain and spinal cord
EAAC1	EAAT3	Neurons	Hippocampus, cerebellum, basal ganglia
EAAT4	EAAT4	Neurons	Purkinje cells of cerebellum
EAAT5	EAAT5	Neurons	Retina

2.1.3.1. EAAT1-GLAST (Glutamat-Aspartat Taşıyıcısı)

EAAT1'i kodlayan SLC1A3 geni, kromozom 5 (5p13.2) üzerinde yer alır ve 81980 baz çiftinden oluşur. SLC1A3'ün 16 varyantı tanımlanmış olup bunlardan bazıları epilepsi ve şizofreni gibi nörolojik bozukluklarla ilişkilidir. Translasyondan sonra, EAAT1 glikozilasyona uğrayarak 64 kDa ve 70 kDa glikoprotein üretir. GLAST (EAAT1) öncelikle beyincik ve serebral neokortekste eksprese edilir (Pajarillo E. ve ark, 2019).

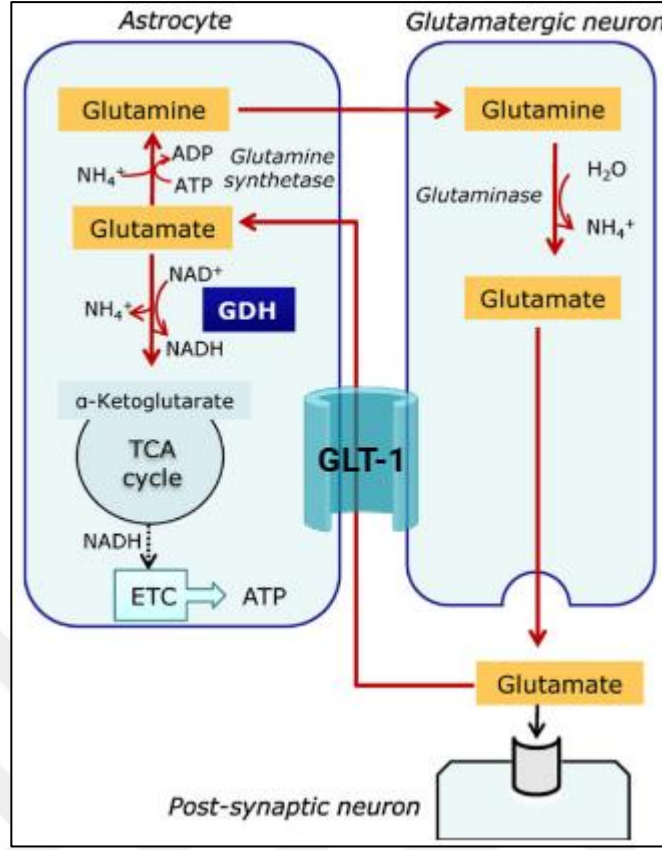
2.1.3.2 EAAT2-GLT-1 (Glutamat Taşıyıcısı-1)

EAAT2, "SLC1A2" geni tarafından kodlanır. Astrositlerin presinaptik tarafında yer alan SLC1A2 (GLT-1, EAAT1), memeli merkezi sinir sistemindeki glutamat alımının %90'ından sorumludur. Yüksek hücre dışı glutamat konsantrasyonu eksitotoksisiteye neden

olduğundan, SLC1A2 disfonksiyonu amiotrofik lateral skleroz, epilepsi veya Alzheimer hastalığı gibi çok sayıda nörolojik hastalıkla ilişkilidir (Simonin ve ark, 2015). Ayrıca tam uzunluktaki EAAT2'e ek olarak iki fonksiyonel ekleme varyantı, EAAT2b ve EAAT2c tanımlanmıştır. Tam uzunluktaki EAAT2 insan beyinde baskın olsa da her iki ekleme varyantı da işlevi henüz anlaşılamayan benzersiz C-terminal alanları içerir (Pajarillo E. ve ark, 2019).

GLT-1 yetişkin beyindeki sinaptik glutamat gradyanının kritik bir aracısıdır. EAAT2, normal koşullar altında ağırlıklı olarak astrositlerde eksprese edilir, ancak aynı zamanda oligodendrositler ve nöronlarda da tespit edilir. EAAT2, beyin ve omurilikte yüksek düzeyde eksprese edilir (Kim K. ve ark, 2011).

Perisinaptik astrositik süreçler (PAP), yüksek düzeyde GLT-1 eksprese eder ve toplam GLT-1 protein ekspresyonunun yaklaşık %80'i astrositlerde bulunur. Nöronal GLT-1 ekspresyonu toplam GLT-1 protein ekspresyonunun yalnızca %5-10 unu oluşturur. Ayrıca GLT-1 protein ekspresyonundaki in vivo ve in vitro farklılıklar, hastalık modellerinde GLT-1 düzensizliğini keşfetmeden önce dikkate alınması gereken, glutamat taşıyıcı düzenlemesinin bir yönüdür (Peterson A.R. ve Binder D.K., 2019).



Şekil 4. Glutamat Taşıyıcısı 1 (Karaca ve ark, 2011'den modifiye edilmiştir.)

Beynin normal işleyişini sürdürmedeki önemli rolüne dayanarak, çok sayıda çalışma insan EAAT2'nin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaları ele almıştır. İnsan EAAT2 geninin promotor bölgesini tanımlamaya yönelik ilk girişimler, ekson 1'i ekson 2'den ayıran çok büyük bir intronun (~100kb) varlığı nedeniyle başarısız olmuştur (Kim K. ve ark, 2011).

2.1.3.3. EAAT3 (Eksitator Amino Asit Taşıyıcısı 3)

EAAT3, "SLC1A1" geni tarafından kodlanır ve diğer EAAT alt tipleriyle karşılaştırıldığında korteksin erken gelişimi sırasında yüksek düzeyde eksprese edilir. Yetişkin beyinde, EAAT3'ün glutamat temizlenmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu görülmemektedir. Ancak bir sistein taşıyıcısı olarak görev yaptığı gösterilmiştir. EAAT3 öncelikle nöronlarda, özellikle de sinaptik sonrası terminallerde bulunur ve beyinin her yerinde eksprese edilebilir (Pajarillo E. ve ark, 2019).

2.1.3.4. EAAT4 (Eksitatör Amino Asit Taşıyıcısı 4)

EAAT4 ekspresyonu beyincikteki Purkinje hücrelerinde zengindir ancak beyindeki diğer hücrelerde de daha düşük seviyelerde bulunur. EAAT4 oldukça büyük Cl^- akımlarına geçit verir. EAAT4'ün glutamat kapılı klorür kanallarının özelliklerine sahip olması ve büyük Cl^- akımları göz önüne alındığında glutamati temizleme mekanizmaları yerine inhibitör reseptörler olarak işlev görür (Rodriguez-Campuzano ve ark, 2021; Robinson MB ve Jackson JG, 2016).

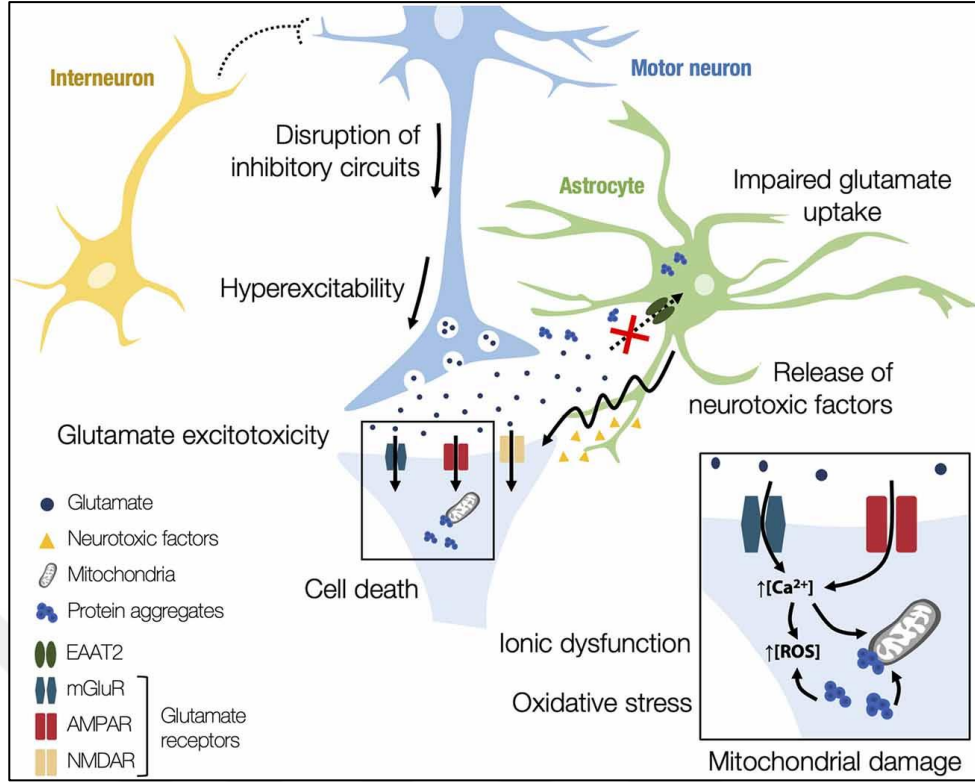
2.1.3.5. EAAT5 (Eksitatör Amino Asit Taşıyıcısı 5)

EAAT5 fotoreseptörlerde, bipolar ve amakrin hücrelerde eksprese edilir. Düşük glutamat taşıma hızları ve büyük anyon iletkenlikleri sergilediği bilinmektedir. Bu nedenle esas olarak retinal nöronların uyarılabilirliğini kontrol etmek için EAAT4 gibi glutamatla aktiveleştirilen klorür kanalı olarak görev yapar (Shneider ve ark, 2014).

2.2. Eksitotoksisite

Eksitotoksisite terimi ilk kez 1969 yılında Olney tarafından yapılan bir çalışmada ortaya atılmış ve burada glutamat ve aspartata maruz kalmanın bir sonucu olarak hücre ölümünün gerçekleştiği ilk kez gözlemlenmiştir (Olney, 1969). Glutamaterjik düzensizliğin önemli bir yönü olan bu fenomen, uyarıcı nörotransmitterlerin, özellikle de glutamatın nöron ölümüne yol açan toksik etkilerini açıklar. Glutamat doğrudan nöronları öldürmese de glutamat reseptörlerinin şiddetli ve uzun süreli aktivasyonu, katyonik akışı, mitokondriyal disfonksiyonu, enerjik ve oksidatif stresi ve reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimini içeren bir nörotoksisite çağlayanını başlatır (Armada-Moreira ve ark, 2020).

Glutamatın aşırı birikimine bağlı olan eksitotoksisite birçok beyin hastalığının altında yatan temel mekanizmalardan birisidir. Bu hastalıklar; Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, İnme, Epilepsi, Multipl Skleroz, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) (Sarı ve ark, 2020).



Şekil 5. Amyotrofik lateral sklerozda (ALS) eksitotoksisite durumunun şematik gösterimi (Armada-Moreira ve ark, 2020)

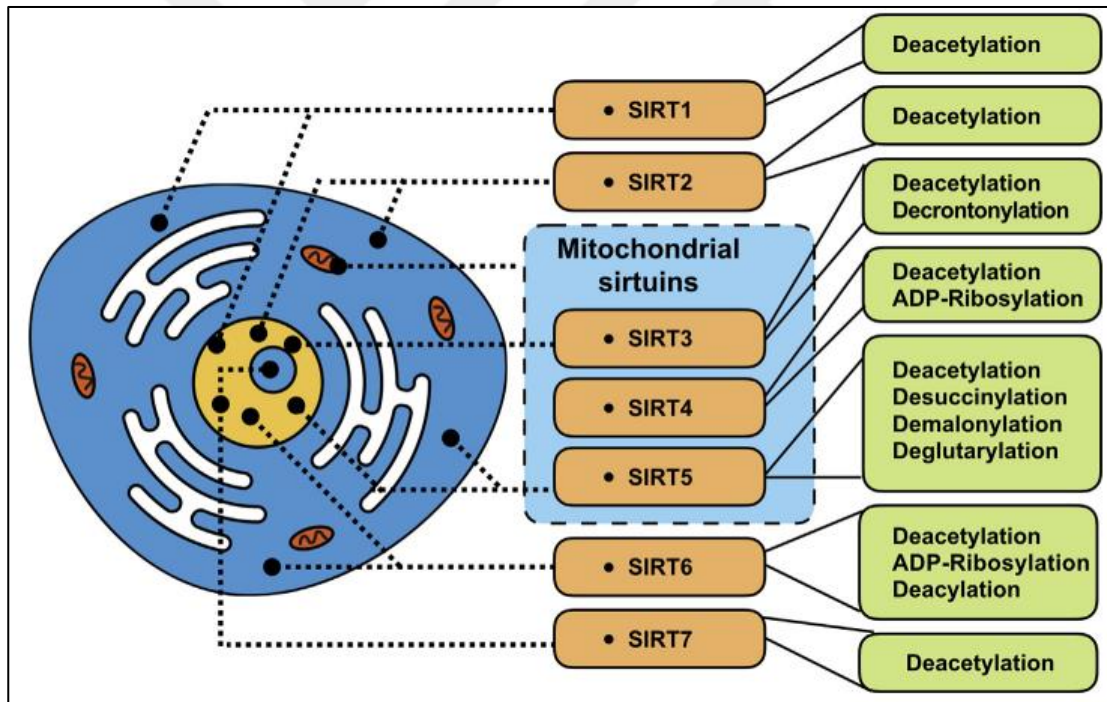
Akson terminallerinden aşırı glutamat salınımına bağlı olan eksitotoksisitenin önceden belirlenmiş sinyal yolları dışında hücre içerisindeki artan Ca^{+2} akışı ve birikimi, eksitotoksisiteye neden olan temel faktörlerden birisidir. Ca^{+2} da glutamaterjik sinaptik iletimin neden olduğu artış öncelikle şunlara atfedilebilir: NMDA reseptörlerinin aktivasyonu; AMPA reseptörlerinin aktivasyonu ile indüklenen membran depolarizasyonunu takiben voltaja bağlı Ca^{+2} kanallarının aktivasyonu ve metabotropik glutamat reseptörlerinin aktivasyonu ile hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımının kolaylaştırılması (Guo C. ve Ma YY., 2021).

2.3. Sirtuinler

Sirtuinler çeşitli proteinleri deasetile edebilen ya da ADP-ribolize edebilen enzimlerdir. İlk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de tanımlanmış ve sınıf III histon deasetilazlar (HDAC) olarak gruplandırılmışlardır. Sirtuinler, hem histonlarda hem de histon olmayan proteinlerde

hidroliz yoluyla asetil gruplarını lizinlerden uzaklaştırır ve bu nedenle daha genel olarak lizin deasetilazlar (KDAC) olarak bilinirler. Bir protein substratından çıkardıkları her asetil grubu veya aktardıkları her ADP-ribosil grubu için bir (NAD^+) tüketirler (Dönmez G., 2012; Vaquero ve Presgue, 2014).

Sirtuinler, metabolik kontrol ve epigenetik modifikasyon gibi çeşitli hücresel düzenleyici işlemlerde yer alan bir protein ailesi olarak bilinir. Özellikle sirtuinler yaşam süresinin uzatılmasında da kritik rol oynar. Dolayısıyla metabolizma ile yaşlanma arasında güçlü bir bağlantı görevi görürler. Sirtuin ailesi 7 üyeden oluşur: SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7. Bunlardan SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 ağırlıklı olarak hücre içindeki enerji metabolizması için gerekli organel olan mitokondride lokalize olur. Bu nedenle SIRT3, SIRT4 ve SIRT5'e genel olarak mitokondriyal sirtuinler denir ve yaşlanma ile metabolizma arasında bir bağlantı olarak işlev görürler (Ji ve ark, 2022).



Şekil 6. Memeli Sirtuinlerin katalitik kapasitesi ve hücre içi lokalizasyonu (Ji ve ark, 2022)

2.3.1. SIRT4

Mitokondriyal sirtuinler metabolik düzenlemede ve antioksidan savunmasında rol alırlar. SIRT4, mitokondride hücresel metabolizma ve DNA hasarı tepkileri için kritik bir öneme sahiptir. SIRT4 yapısında lokalizasyonunu mitokondriye yönlendiren bir N-terminal

mitokondriyal sinyal dizisi içerir. SIRT4, deasetilaz reaksiyonlarına katılabilmek için gerekli olan amino asitlere, yani homolog bir sirtuin deasetilaz alanına, korunmuş bir katalitik histidin ve bir Rossman fold/NAD⁺ bağlanma motifine sahiptir (Min ve ark, 2019).

SIRT4'ün çoğu mitokondriyal matraste bulunur ve az miktarda SIRT4 sitozol ve çekirdekte gözlenir. Deasetilaz aktivitesine rağmen, SIRT4 öncelikle NAD ye bağımlı bir ADP-riboziltransferaz olarak işlev görür. Dikkat çekici şekilde, SIRT4, glutamin katabolizması, yağ asidi oksidasyonu ve amino asit katabolizması dahil olmak üzere birçok metabolik yolu düzenleyen SIRT3 ve SIRT5'in tersi yönde hareket eder (Ji ve ark, 2022).

Daha önce gerçekleştirilen çalışmalar Sirtuinleri dört sınıfa ayırmıştır. SIRT4, sınıf II insan sirtuinleri sınıfına aittir. SIRT4 mRNA ve SIRT4 proteini insan kasında, böbreklerinde, testislerinde ve karaciğer hücrelerinde tespit edilmiştir. Bu ekspresyon modeli SIRT4'ün işlevleri ile tutarlıdır (Min ve ark, 2019).

Tablo 2. Sirtuinlerin Sınıflandırılması (Min ve ark, 2019)

Class I	SIRT1/SIRT2/SIRT3
Class II	SIRT4
Class III	SIRT5
Class IV	SIRT6/SIRT7

Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada, SIRT4'ün glutamat metabolizmasında rol alan GLT-1, GDH (Glutamat Dehidrojenaz) ve GS (Glutamin Sentetaz) proteinlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesi yoluyla eksitotoksisiteye karşı koruma sağladığı ve GLT-1'in protein seviyesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Dönmez Yalçın ve Çolak, 2020). Aynı zamanda daha öncesinde gerçekleştirilen bir başka çalışmada SIRT4'ün yokluğunda GLT-1 proteininin hücre yüzeyindeki ekspresyonunun azaldığı ve buna bağlı olarak beyindeki glutamat alımının azaldığı gösterilmiştir (Shih J. ve ark, 2014).

2.4. Transkripsiyon Faktörleri

Sekans spesifik transkripsiyon faktörleri, transkripsiyonel düzenleyici bölgelere bağlanarak fonksiyon gösteren biyolojik süreçlerin anahtar düzenleyicileridir. Her transkripsiyon faktörü tipik olarak, position weight matrices (PWM) gibi modeller kullanılarak bağlanma bölgesi motifleri olarak temsil edilebilen benzer DNA dizilerinin bir koleksiyonunu tanıır (Inukai ve ark, 2017). Bazı transkripsiyon faktörleri transkripsiyon başlangıç bölgesinin yakınında bulunan promotor bölgeye bağlanarak transkripsiyon başlangıç kompleksinin oluşmasına yardımcı olurken bazıları güçlendirici diziler gibi transkripsiyon başlangıç noktasına daha uzak dizilere bağlanarak transkripsiyonu güçlendirebilir ya da baskılayabilir (Gilbert S.F., 2000).

Tarihsel olarak, transkripsiyon faktörü terimi, transkripsiyonda yer alan veya gen ekspresyon düzeylerini değiştirebilen herhangi bir proteini tanımlamak için kullanılmıştır. Bu terim zamanla, DNA'yı diziye özgü bir şekilde bağlayabilen ve transkripsiyonu düzenleyebilen proteinler için kullanılmıştır. Transkripsiyon faktörleri, diğer dizilere göre spesifik bağlanma dizileri için 1000 kat veya daha fazla tercihe sahip olabilir. Transkripsiyon faktörleri diğer proteinlerin DNA Bağlanma bölgelerini tıkayarak etki gösterebildiğinden, spesifik DNA dizilerine tek başına bağlanma yeteneği genellikle transkripsiyonu düzenleme yeteneğinin bir göstergesi olarak bilinir (Lambert ve ark, 2018).

Transkripsiyon faktörleri genomu doğrudan yorumlayarak DNA dizisinin kodunun çözülmesinde ilk adımı gerçekleştirir. Birçoğu “ana düzenleyiciler” ve “seçici genler” olarak işlev görür. Hücre tiplerini ve gelişimsel modeli belirleyen süreçler üzerinde kontrol uygular ve bağışıklık tepkileri gibi spesifik yolları kontrol ederler. Genomdaki deneysel olarak belirlenen bağlanma bölgeleri ile motifle eşleşen diziler arasında tipik olarak yalnızca kısmi bir örtüşme vardır; dahası, deneysel olarak belirlenen bağlanma bölgeleri bile Transkripsiyon Faktörlerinin gerçekte düzenlediği genlerin nispeten zayıf belirleyicileridir (Lambert ve ark, 2018). Motif eşleşmeleri genellikle ChIP-seq (kromatin immünopresipitasyon dizilimi) veri kümesindeki en zengin diziler arasındadır. Bu durum in vivo transkripsiyon faktörü bağlanması için içsel DNA bağlanma spesifikliğinin önemli olduğunu gösterir. Ancak bir transkripsiyon faktörü farklı hücrelerde bulunan birbirinden farklı birden fazla geni düzenleyebilir (Lambert ve ark, 2018; (Inukai ve ark, 2017).

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

CREB (The cyclic AMP response element (CRE) – binding protein (CREB)) aktivator ailesi, hücresel metabolizmanın kontrolü ve büyüme faktörlerine bağlı hücresel hayatta kalma gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan ve çeşitli protein kinazlar aracılığıyla hücre içi Ca^{+2} akışına yanıt veren bir transkripsiyon faktörüdür (Mayr B. ve Montminy M., 2001).

Daha önce astrositler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda CREB'in GLT-1 promotoruna bağlanıp bağlanmadığını göstermek için CHIP (Kromatin İmmünopresipitasyon) gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu GLT-1 promotorunun bir adet CRE konsensüs bölgesi (-308.sekans) içerdiği bulunmuştur (Lee E. ve ark. 2012; Karki P. ve ark. 2013). Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda CREB'in PKA ile aktive olduğunu ve CRE konsensüs dizisinde meydana getirilen mutasyonların GLT-1 promotor aktivitesini azalttığını göstermiştir. Bu sonuçlar ile birlikte aşırı eksprese olan CREB'in GLT-1 promotor aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı da gözlemlenmiştir (Karki P. ve ark. 2013).

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

“Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF)” olarak da bilinen, REST (The Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor), iyon kanalları, nörotransmitter reseptörler, sinaptik vezikül proteinleri ve adhezyon molekülleri ile ilişkili çeşitli genleri düzenleyen çinko-parmak transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir (Pajarillo ve ark, 2022). REST 2000 den fazla hedef geni düzenlemek için “repressor element 1/neuron-restrictive silencer element (RE1/NRSE)” olarak bilinen 21 bp uzunluğunda bir cis-regülatör bölgeye (-663. ve -131.sekans) bağlanmaktadır (Bruce ve ark, 2019; Pajarillo ve ark, 2021).

REST'in ayrıca astrositlerde doğrudan GLT-1 promotoruna bağlanarak GLT-1 protein ekspresyon seviyesini arttırdığı gözlemlenmiştir. GLT-1'in ekspresyon seviyesindeki artışa istinaden astrositlerde artan glutamat alım fonksiyonu gözlemlenmiştir (Pajarillo ve ark, 2022; Pajarillo ve ark, 2021).

2.4.3. YY1 (Yin-Yang 1)

YY1 (Yin-Yang 1), mevcut kofaktörler ile etkileşimine bağlı olarak gen transkripsiyonunu aktive edip, durdurabileceği gibi embriyogenez farklılaşma, replikasyon ve proliferasyon sırasında merkezi sinir sisteminde rol alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Karki ve ark, 2014).

Önceki çalışmalarda astrosit yükseltilmiş gen-1 (AEG-1), GLT-1'i bastırmak için bir DNA bağlama kompleksi oluşturmak üzere YY1'i indüklediği ve YY1'in GLT-1'in gen ekspresyonunu düzenlediği rapor edilmiştir (Lee ve ark, 2011). Çalışmalar manganın astrositlerde GLT-1 ve GLAST promotorlarındaki YY1 konsensüs bölgelerini (GLT-1 promotorunda +32.sekans) bağlayarak GLAST ve GLT-1'i baskılamak için epigenetik değiştirici HDAC (Histon deasetilaz) lerin alınmasıyla YY1 ekspresyonunu arttırdığı ve GLT-1 promotor aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (Pajarillo ve ark, 2021; Pajarillo ve ark, 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (Nüve)
- Mini santrifüj (Nüve)
- Hücre Kabini (Nüve)
- Su banyosu (Mipro)
- Vorteks (Velb Scientifica)
- Sheaker (Miu)
- Isı Bloğu (Dizge)
- Manyetik karıştırıcı (Weightlab)
- pH ölçer (AZ)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- İnkübatör (Nuaire)
- -80°C buzdolabı (WiseCryo)
- Spektrofotometre (BioTek)
- Western görüntüleme cihazı (Syngene GBox)
- Floresan Mikroskobu (Zeiss)
- Nanodrop (Nabi)
- Western Blot sistemi (Biorad)
- Rotator (Biosan)
- Magnet (invitrogen)
- -20 ve +4°C dolaplar (Vestel, Samsung, Uğur)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Otoklav (Hirayama)
- Distile su cihazı (Nüve)
- Hücre kültürü kabini (Nüve)

- Buz cihazı (Uğur buzaL60)
- Real-Time PCR (Bio-Rad)
- Pipet seti (10 µl, 100 µl, 1000 µl, Eppendorf)
- Sonikatör (Bandaline Elektronik)

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- DMEM high glucose (Capricorn, Serox)
- Fetal sıgır serumu (FBS, 500 ml, Gibco)
- L-glutamin solüsyonu (200 mM, 100 mL, Capricorn)
- Penisilin/Streptomisin (100 mL, Capricorn)
- 10 cm'lik petri kabı (Biofil)
- Tek kullanımlık serolojik pipet (5 mL, 10 mL, 25 mL, Nest)
- Pastör pipeti (Isolab)
- Sodyum piruvat (Gibco)
- Tripsin-EDTA (%0.05, Capricorn)
- Dulbecco's PBS (1x, Serox)
- 6 well plate (Nest)
- 10 mL şırınga (Risus)
- 15 mL'lik falkon (Isolab, Nest)
- 50 mL'lik steril falkon (Isolab, Nest)
- Cryotube (Biosharp)
- Enjektör filtresi (Isolab)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO, Merck)
- Ethanol (Isolab)
- RNase içermeyen su (ABT)
- RIPA lizis tamponu (ABT)
- 1 mL'lik steril enjektör (Beybi)
- Protein kuantifikasyon kiti (Bradford testi, Sigma)
- Proteaz ve fosfataz inhibitörü (100x, MCE)
- Tripan mavisi (AgriCulture)
- Tris Hidroklorid (Sigma)

- Sodyum Klorür (Merck)
- Tris Base (Nzytech)
- Glisin (Tekkim)
- Yağsız süt tozu (Enka)
- B-Merkaptoetanol (Merck)
- Metanol (Isolab)
- SDS-Page yükleme boyası (5x, ABT)
- SDS-PAGE jeli (Biorad, Criterion midi)
- Whatman kağıdı (Filtre kağıdı, Whatman)
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (Carlo Erba)
- PVDF membran (Poli-viniliden florür) (Biorad)
- Tween 20 (Sigma)
- Protein marker (Genedirex)
- ECL (Biorad)
- qPCR mastermix (SYBR) (SUGENOMICS)
- Tubulin antikoru (Elabscience)
- shRNA lentiviral partikülü (OriGene)

3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

- DNA Kolon Yıkama Tamponu: 6 ml DNA Kolon Yıkama Solüsyonu + 24 ml (%96-100) ethanol
- Membran Ekstraksiyon Tamponu: 200 µl tampon + 2 µl halt coctail
- MNase Digestion Tampon Çalışma Solüsyonu: 210 µl MNase Digestion Buffer + 0,21 µl 1 M DTT
- 1X IP Dilution Buffer: 395µl Nuclease Free Water + 100 µl IP Dilution Buffer (5X) + 5 µl halt coctail
- IP Yıkama Tamponu 1: 600 µl IP Dilution Buffer/Wash Buffer (5X) + 2,4 ml nuclease free water
- IP Yıkama Tamponu 2: 200 µl IP Dilution Buffer/Wash Buffer (5X) + 70 µl NaCl (5M) + 730 µl nuclease free water
- 1X IP Elüsyon Tamponu: 75 µl IP Elüsyon Tamponu + 75 µl nuclease free water

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

3.2.1.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Immortalized Human Astrocyte (IHA) hücrelerinin, %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) penisilin/streptomisin, %1 (v/v) sodyum pirüvat, 15 ml L-glutamin ve yüksek glikoz içerikli DMEM besiyeri ortamında 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatör ortamında gelişimi ve çoğalması sağlanmıştır. Hücreler ilk olarak 10cm² 'lik petrilere ekilmiş, petri yüzeyine tutunabilmeleri için 24 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin kültür ortamı ortalama 1-2 günde bir değiştirilmiş ve hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında alt kültürleme yapılmıştır.

3.2.1.2. Hücre Pasajlama

Belirli bir yoğunluğa ulaşan IHA hücrelerinin alt kültürlenmesi için öncelikle ortamdan hücre besiyeri uzaklaştırılmıştır. Sonrasında 1X PBS ile yıkanmıştır ve 1 ml Trypsin-EDTA

eklenerek 37°C'de 3 dakika inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon bitiminde tripsin inaktivasyonu için 5 ml besiyeri eklenerek hücreler petri yüzeyinden toplanarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet üzerinde taze besiyeri eklenmiş, pipetaj işlemi yapılarak hücre homojenize edilmiş ve petrilere eşit miktarda paylaştırılmıştır. Daha sonra hücreler, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.3. Hücre Dondurulması

Yeterli yoğunluğa ulaşan IHA hücrelerinin her biri için 2 ml dondurma besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri için %20 FBS, %10 DMSO ve 1,2 ml serumsuz besiyeri falkon tüp içerisine alındı. Hazırlanan besiyeri filtreden geçirilerek yeni bir tüp içerisine alındı. Hücrelerin bulunduğu petrilere besiyeri ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine 1 ml tripsin-EDTA eklendi ve 37°C inkübatörde 3 dakika bekletildi. Petrilerin üzerine 7 ml besiyeri eklendikten sonra hücreler toplanarak tüp içerisine alındı. Daha sonra 1200 rpm ve +4°C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra tüpteki süpernatant atıldı. Hazırlanmış olan dondurma besiyeri pelet üzerine eklenerek çözündürülmesi sağlandı ve cryotüp içerisine alındı. Cryotüpler ilk önce -20°C'de 20 dakika bekletildi, sonrasında -80°C'de saklandı.

3.2.1.4. Hücre Sayımı ve Ekilmesi

Kurulacak olan deneyler için 6-well plate kullanılmıştır ve her bir kuyucuk için 300.000 adet hücre ekilmesi kararlaştırılmıştır. IHA hücrelerinin üzerine 1 ml tripsin-EDTA eklendikten sonra 37°C inkübatörde 3 dakika bekletilmiştir. Sonrasında petrilerin içerisine 7 ml besiyeri eklenmiş ve hücreler tüp içerisine toplanmıştır. Toplanan IHA hücreleri 1200 rpm ve +4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerindeki süpernatant atıldıktan sonra 10 ml taze besiyeri içerisinde çözündürülmüştür. Tüpten 1 ml alınarak ependorf tüp içerisine konmuş ve daha sonra yeni bir ependorf tüp içerisine 10 µl alınmıştır. Elimizde 10 µl hücre bulunan ependorf tüpüne 10 µl tripan mavisi eklenmiştir. Hücre sayım lamı üzerindeki bölgelere 10'ar µl hazırlanan 1:1 (hücre:tripan mavi) karışımından eklendi. Hücre sayımı tamamlandıktan sonra 300.000 hücre içerecek şekilde kuyucuklara ekim yapıldı ve toplamda 2 ml besiyeri olacak şekilde taze besiyeri eklendi.

3.2.1.5. SIRT4'ün shRNA İçeren Lentiviral Partikül ile Susturulması

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

Origene'den alınan SIRT4 virüsünün konsantrasyonu $2,37 \times 10^7$ 'dir. Kullanılacak olan hücre miktarı 300.000 hücredir.

$$300.000 \text{ hücre} \times 5 \text{ MOI} = 1.500.000$$

Elde edilen konsantrasyon miktarı, virüs konsantrasyonuna bölündü;

$1.500.000 / 2,37 \times 10^7 = 63 \mu\text{l}$ virüs kullanılacağı hesaplandı. Bu hesaba göre her bir kuyu içerisine $63 \mu\text{l}$ SIRT4 virüs, $16 \mu\text{l}$ polybren ve toplamda $2000 \mu\text{l}$ 'ye tamamlanması için 1921 ml besiyeri eklenmiştir.

Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve üzerlerine 2 ml taze besiyeri eklenerek 37°C inkübatöre konuldu. 48 saat beklemenin ardından hücreler protein izolasyonuna hazır hale geldi.

3.2.1.6. Hücreden Protein İzolasyonu

37°C su banyosunda ısıtılan PBS ve tripsin-EDTA %70 etil alkol ile sterilize edildikten sonra kabin içerisine alındı. 6-well plate üzerindeki besiyeri çekildikten sonra her bir kuyu üzerine $250 \mu\text{l}$ tripsin-EDTA eklendi ve 37°C inkübatörde 3 dakika bekletildi. Kabin içerisine alınan plate de bulunan her bir kuyuya $750 \mu\text{l}$ PBS konularak gruplara göre toplandı ve 15 ml'lik tüp içerisine alındı. 2000 rpm ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pelet üzerine 1 ml PBS eklendi ve hücreler pipetajla çözdürüldükten sonra ependorf tüp içerisine alındı. Bu sırada tüp başına $200 \mu\text{l}$ olacak şekilde %1 fosfataz ve %1 proteaz içeren RIPA hazırlandı ve buz üstünde tutuldu. Ependorf tüpler 2000 rpm ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılarak geriye kalan pelet üzerine hazırlanan RIPA'dan $200 \mu\text{l}$ eklenerek pipetaj yapıldı ve 10-15 kez iğneden geçirildikten

sonra -80C’de 20 dakika bekletildi. Her 20 dakikanın sonunda pipetaj yapıldı ve bu işlem 4 kez tekrarlandı. Daha sonra 14.000 rpm ve +4°C’de 25 dakika santrifüj işleminin ardından tüp içerisindeki süpernatant etiketlenmiş olan yeni ependorf tüpe alınarak -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.2. Bradford Assay

Hücrelerden izole edilen total protein distile su ile yeni ependorf tüp içerisinde 1:5 oranında seyreltilir. Bu orana göre seyreltme işlemi için 20 µl distile su ve 5 µl protein kullanıldı. Bradford ölçümü sonucunda protein konsantrasyonun hesaplanması için BSA’nın farklı konsantrasyonlara ait standartları kullanıldı. 96 well plate içerisinde 200 µl Bradford solüsyonu eklendi. Her bir kuyucuğa sırasıyla 2 tekrar halinde hazırlanan standartlar ve seyreltilmiş protein grupları 5 µl miktarında konuldu. 30 saniye hafif bir şekilde çalkalanan 96-well plate ışıktan korunacak şekilde 5 dakika inkübe edildi.

Ölçüme hazır olan plate spektrofotometre içerisine yerleştirildikten sonra 595 nm’de ölçüldü. Elde edilen ölçüm değerleri ile çizilen grafik eğrisinden elde edilen denklem aracılığıyla her bir gruba ait protein miktarı µg/ml olarak hesaplandı.

3.2.3. Western Blot

Bradford Assay sonrasında belirlenen konsantrasyonlara göre ependorf tüpler içerisine örneklerden konuldu ve üzerlerine 6 µl Loading Dye eklendi. Hazırlanan tüpler 2000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra 96°C’de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra 2000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra örnekler yüklemeye hazır hale getirildi. Yürütmenin yapılacağı tank içerisine yürütme tamponu konulduktan sonra yapılan plana göre jelde bulunan kuyucuklara örnekler ve marker yüklendi. Tank güç kaynağına bağlandı ve 90V’da yürütme işlemi başlatıldı. Yürütmenin ilk 30 dakikasından sonra örnekler 100V’da yürümeye devam etti.

Yürütmenin sonunda transfer için jel tanktan çıkartıldı. Kullanılacak olan PVDF membranın aktifleştirilmesi için membran metanol içerisinde 5 dakika bekletildi ve transfer için gerekli sandviç sistemi kuruldu. Sandviçin üst kapağı kapatılmadan önce sünger

üzerinden roller aracılığıyla roll-on işlemi gerçekleştirildi ve hava kabarcıklarının kalması engellendi. Sonrasında kapak kapatıldı ve sandviç sistemi transfer tankına konuldu. Tank içerisine buz aküsü ve transfer tamponu eklendi. Transfer işlemi +4°C'de 70V'da 2 saat süreyle gerçekleştirildi.

Transfer işlemi sonrasında sistemden alınan membran plastik kap içerisine konuldu ve üzerine bloklama solüsyonu eklendi. Membran 1 saat oda sıcaklığında sheaker üzerinde inkübasyona bırakıldıktan sonra taze süt ile 1:1000 (antikor:skim milk) oranında antikör konuldu ve +4°C'de bir gece sheaker üzerinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda membran 5'er dakika yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Üzerine 1:5000(antikör:skim milk) oranında sekonder antikör konuldu ve oda sıcaklığında sheaker üzerinde 2 saat inkübe edildi. Daha sonra membran yıkama tamponu ile 10'ar dakika 3 kez yıkandı ve membran görüntüye hazır hale getirildi.

Membran asetat üzerine alındı ve 500 µl ECL solüsyonu konulduktan sonra western görüntüleme cihazı içerisine alınarak karanlıkta 5 dakika bekletildi ve sonrasında görüntü alındı. Görüntüleme işlemi sonrasında membran tekrar kap içerisine alınarak üzerine strip tamponu konuldu ve 40 dakika oda sıcaklığında sheaker üzerinde inkübe edildi. 3 tekrar halinde 5'er dakika yıkama tamponuyla yapılan yıkama işlemi sonrasında membran tekrar blok edilmek üzere hazır hale getirildi ve önceki aşamaların tekrarı sağlanarak housekeeping protein görüntülenmesi sağlandı. Hedef antikordan farklı olarak kontrol antikoru (Tubulin) 1:5000 oranında eklendi.

3.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

RNA izolasyonu yapılacak olan hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra 6-well plate içerisine ekildi. Ekim sonrası bir gün 37°C'de inkübatörde bekletilen hücrelerin üzerine hücre sayısına oranla SIRT4 virüs transfeksiyonu yapıldı ve plate inkübatör içerisine konuldu. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve taze besiyeri eklenerek 48 saat 37°C inkübatörde bekletildi. 48 saat sonra kabin içerisine alınan plate de bulunan besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuk içerisine 250 µl trizol konuldu ve 5 dakika bekletildi. Kuyucukların içerişi hücre kazıyıcı ile kazındı ve kuyucukların içeriği ependorf tüp içerisine aktarıldı. 12.000 rcf ve +4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Tüp içerisindeki süpernatant yeni bir ependorf tüpe alındı ve üzerine 200 µl kloroform koyuldu. 15 saniye vortekslendi ve 2

dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12.000 rcf ve +4°C’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Tüp içerisinde oluşan 3 fazdan en üstteki faz kısmı yeni ependorf tüpe alındı. Her ependorf tüp içerisine 500 µl izopropanol eklendi ve pipetaj yapıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12.000 rcf ve +4°C’de 10 dakika santrifüj işleminden sonra tüp içerisindeki süpernatant atıldı. Pelet üzerine 1 ml %75 etanol konuldu ve -20°C’de 20 dakika bekletildi. 7.500 rcf ve +4°C’de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı atıldı. Tüp içerisindeki etanol tamamen uçurulduktan sonra tüp içerisine 50 µl RNase içermeyen su eklendi ve 56°C’de 15 dakika tutuldu.

Elde edilen RNA örneklerinin her birinde 1 µl alınarak nanodrop cihazından ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlarda A260:A280 ve A260:A230 dalga boylarındaki ölçümler ile RNA’nın saflık ve kalitesi belirlendi ve konsantrasyon miktarı belirlendi.

3.2.5. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Belirlenen RNA konsantrasyonlarına göre 100 ng/µl olacak şekilde miktarlar belirlenmiştir. Her bir grubun cDNA sentezi için 10 µl master mix hazırlanmıştır. Master mix içerisinde 10X reaksiyon tamponu, 20X dNTP karışımı, random hekzamer primer, revers transkriptaz, RNAaz inhibitörü ve RNAaz free su bulunmaktadır. Hazırlanan master mix mikrosantrifüj tüp içerisine alınarak üzerlerine 10 µl RNA örnekleri eklenmiştir. Tüm bu işlemler buz üstünde yapılmıştır. cDNA sentez reaksiyonu termal cycle cihazı ile sırasıyla 25°C (10 dakika), 37°C (85 dakika), 85°C (5 dakika) adımları ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen cDNA örnekleri -20°C’de saklanmıştır.

3.2.6. Real Time PCR (RT-PCR)

RT-PCR reaksiyonu SUGENOMICS qPCR kiti ile gerçekleştirilmiştir. Kit içerisinde bulunan syber master mix ve RNaz içermeyen su oda sıcaklığında çözülmüş, santrifüj edilmiş ve buz üzerine konulmuştur.

Reaksiyonda kullanılacak olan primerler üretici firma tarafından belirtilen hacimlerde nükleaz içermeyen su ile çözdürülerek 100 µM konsantrasyona sahip stoklar hazırlanmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılacak olan primerlerin baz dizileri aşağıda verilmiştir.

Tablo 3. Deneyde kullanılan primer baz dizileri

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

20 μ l reaksiyon hazırlamak için 96'lık qPCR plate'lerinde sırasıyla; qPCR SYBR master mix (1 örnek için: 10 μ l), 10 uM forward primer (1 örnek için: 1 μ l), 10 uM reverse primer (1 örnek için: 1 μ l), RNaz içermeyen su (1 örnek için: 3 μ l) ve cDNA (1 örnek için: 5 μ l) reaktifleri hazırlanır. Reaktifler hazırlandıktan sonra yavaşça pipetaj yapılarak karıştırılır. Daha sonra hızlı bir şekilde santrifüj gerçekleştirilir. Santrifüjden sonra 96'lık qPCR plate'i RT-PCR cihazına konulmuştur ve qPCR döngüleri aşağıdaki gibi ayarlanarak reaksiyon başlatılmıştır.

Tablo 4. qPCR reaksiyon şartları

Sıcaklık	Zaman	Döngü
95 °C	10 dakika	1
90 °C	20 saniye	50
58 °C	20 saniye	50
72 °C	30 saniye	50
4 °C	∞	

mRNA ifadeleri, β -aktin mRNA seviyelerine oranlanarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Kromatin İmmünopresipitasyon

CREB, REST ve YY1 proteinlerinin, GLT-1 promotorundaki konsensus dizilerine bağlanıp bağlanmadığını belirlemek için gerçekleştirilen kromatin immünopresipitasyon (CHIP) tekniği Thermofischer Scientific'ten Pierce™ Magnetic ChIP (Catalog no: 26157) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney basamakları kitede bulunan protokole göre uygulanmıştır. Kısaca, %16 Formaldehit ile DNA-protein komplekslerini oluşturmak için kabin içerisinde krosslinking yaptıktan sonra, kitede bulunan solüsyonlar ile hücreler parçalandı ve kroslink olmuş olan DNA-protein kompleksleri, solubilize edildi. Daha sonra, kompleksler CREB, REST ve YY1 antikorları ile inkübe edildi ve Pierce CHIP-grade Protein A/G Magnetic Beads (Manyetik Boncuklar) ile izole edildi. Kitedeki protokole göre, krosslink tersine çevrildikten ve protein-DNA kompleksleri mikro tip sonikatör ile parçalandıktan

sonra, DNA fragmanları qPCR ile tespit edildi. GLT-1 promotorundaki transkripsiyon faktörlerinin dizileri, daha önceki yayınlarda in siliko analiz ve CHIP tekniği ile belirlenmişti. Bu analizlere göre, GLT-1 promotorunda bulunan transkripsiyon faktörlerinin primer dizileri aşağıda gösterilmiştir.

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

Gen	Forward (5'-3')
CREB	GCG GCG GTT AAA GGA GTT
REST 1. Bölge	GAG CTG AAG CGG GTG CTC
REST 2. Bölge	TGA TGT CAG CTC TCG ACG AA
YY1	CTC CTG CAG CCC TGG GCG CAT

Tablo 6. CHIP tekniğinde kullanılacak olan genlerin Reverse primer baz dizileri

Gen	Reverse (5'-3')
CREB	GGC TAA ACC TTG CAA TCC CT
REST 1. Bölge	AAT TAG CCA AAT AAG AAA AGA GG
REST 2. Bölge	AGA GAG TGG TGG CAG AGG AC
YY1	GAG GCG CTA AAG GGC TTA CC

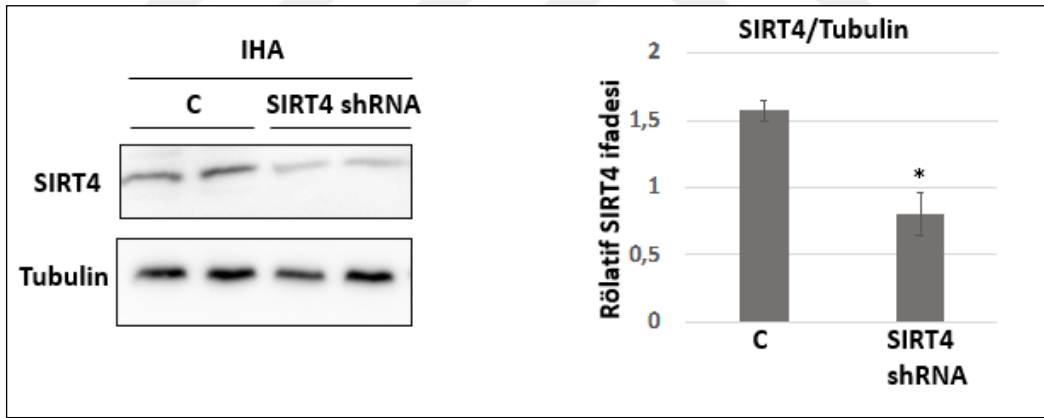
3.2.8. İstatistiksel Analiz

İstatistik, yazılım programları kullanılarak gerçekleştirildi. İki örnek grubun ortalamaları arasındaki fark için “Unpaired, two-tailed, Student’s test” kullanıldı. $p < 0.05$ değerini taşıyanlar anlamlı farklılık olarak değerlendirildi. Hata çubukları (error bar) SEM’i temsil etmektedir.

4. BULGULAR

4.1. Hücrelerdeki SIRT4 Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

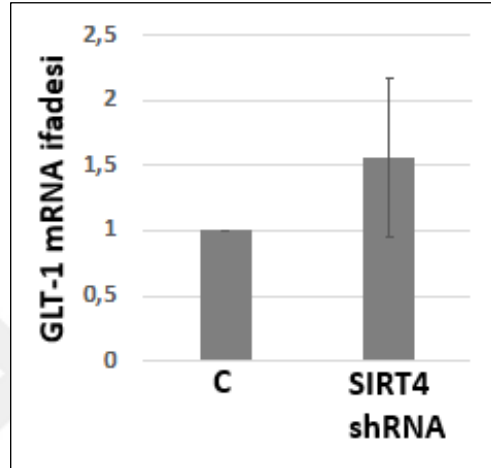
IHA hücre hattında SIRT4-shRNA geni içeren lentiviral partikül muamelesi ile SIRT4 geni susturuldu. Bu uygulama sonucunda IHA kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri olmak üzere iki adet deney grubu oluşturuldu. Bu 2 deney grubunda SIRT4 shRNA lentiviral partikül uygulaması sonrasında SIRT4'ün susturulduğunu göstermek için Western Blot yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre IHA hücre hattında, SIRT4-shRNA içeren lentiviral partiküller ile yapılan susturma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği gösterildi. SIRT4 susturulmuş IHA hücrelerinde, SIRT4 protein seviyesinin kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma göstermektedir (Şekil 7).



Şekil 7. IHA hücrelerinde SIRT4 geninin susturulması. IHA hücrelerinde SIRT4 protein seviyeleri Western Blot yöntemi ile gösterilmiştir. Tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. C: Kontrol, SIRT4 shRNA: SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri. P değerinin 0,05'ten düşük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. *p: 0.0452

4.2. GLT-1 mRNA seviyesinin belirlenmesi

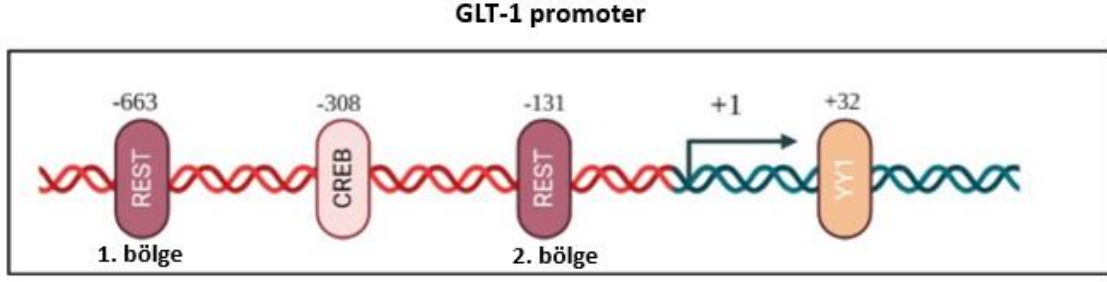
IHA hücrelerinde, GLT-1'in mRNA düzeyinin belirlenmesi için qPCR yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri arasında, GLT-1 mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmedi (Şekil 8).



Şekil 8. Kontrol (C) ve SIRT4 susturulmuş IHA hücrelerinde (SIRT4 shRNA) qPCR yöntemi ile belirlenen GLT-1 mRNA ifadesinin seviyeleri gösterilmiştir. C: Kontrol IHA hücreleri, SIRT4 shRNA: SIRT4 ile susturulmuş IHA hücreleri. P değerinin 0,05'ten düşük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ortalamanın standart sapması hata çubuklarıyla gösterilmiştir. *p: 0.412

4.3. GLT-1 promotoru ve transkripsiyon faktörlerinin (CREB, REST ve YY1) etkileşiminin CHIP metodu ile gösterilmesi

SIRT4 susturulmuş olan IHA hücrelerinde, GLT-1 promotoruna bağlanan transkripsiyon faktörlerinin değişimini göstermek için kromatin immünopresipitasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücrelerinden CHIP yolu ile elde edilen DNA-protein kompleksleri kullanılmıştır.



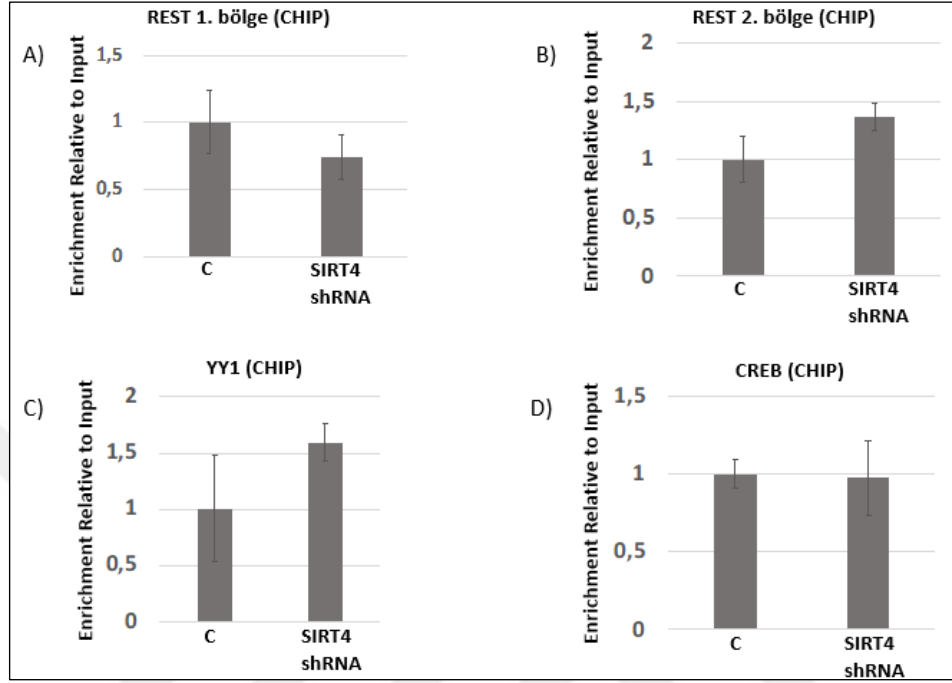
Şekil 9. GLT-1 promotoru üzerinde bulunan transkripsiyon faktörleri

CREB, REST ve YY1 antikorları ile inkübe edilen DNA-protein kompleksleri Pierce CHIP-grade Protein A/G Magnetic Beads (Manyetik Boncuklar) ile izole edildi. Kitte (ThermoFischer Scientific'ten Pierce™ Magnetic ChIP (Catalog no: 26157)) yazılan protokole uygun şekilde oluşturulan krosslink tersine çevrildikten ve protein-DNA kompleksleri mikro tip sonikatör ile parçalandıktan sonra transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı DNA bölgeleri elde edildi. Daha sonrasında bu DNA bölgeleri uygun primerler kullanılarak qPCR ile analiz edildi.

Elde edilen sonuçlara göre GLT-1 promotoruna bağlanabilen transkripsiyon faktörlerinin (CREB, REST, YY1) CHIP analizinde, kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 10). CREB, REST ve YY1 transkripsiyon faktörlerinin, GLT-1 promotorunda yer aldığı yapılan CHIP (Kromatin Immunopresipitasyon) deneyleri ile gösterilmiştir. CHIP analizinde, transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı DNA bölgeleri qPCR ile çoğaltılmaktadır. SIRT4 susturulmuş hücre grubunda da CREB, REST ve YY1 transkripsiyon faktörleri GLT-1 promotoruna bağlanmıştır. SIRT4'ün susturulması, CHIP analizinde anlamlı bir fark yaratmamıştır.

REST transkripsiyon faktörü için gerçekleştirilen deneyler sonrasında REST 1.bölge t-test sonucu 0,3952 olarak belirlenmiştir. REST'in 2.bölgesi için gerçekleştirilen t-test analiz sonucu 0,20739 olarak belirlenmiştir. Bu değerler 0,05'in altında yer almadıklarından dolayı istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 10 A-B). YY1 için gerçekleştirilen deneyler sonrasında gerçekleştirilen t-test analiz sonucu 0,5387 olarak belirlenmiştir. Bu değer 0,05'ten büyük olduğu için anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Şekil 10 C). CREB transkripsiyon faktörü için gerçekleştirilen deneyler sonucunda yapılan

istatistiksel analiz doğrultusunda t-test değeri 0.9481 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemektedir (Şekil 10 D).



Şekil 10. qPCR ile yapılan CHIP Enrichment Test sonuçlarının değerlendirilmesi. **A-B)** qPCR, GLT-1 promotoru üzerinde bulunan 1. REST ve 2. REST bağlanma bölgeleri için kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. **C)** qPCR, GLT-1 promotoru üzerinde bulunan YY1 bağlanma bölgesi için kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. **D)** qPCR, GLT-1 promotoru üzerinde bulunan CREB bağlanma bölgesi için kontrol ve SIRT4 susturulmuş IHA hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. CREB - p: 0.9481, YY1 - p: 0.5387, REST 1.bölge - p: 0,3952, REST 2.bölge - p: 0,20739.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada IHA (Immortalized Human Astrocytes) hücre hattında SIRT4'ün GLT-1 geninin transkripsiyonel regülasyonunda etkili olup olmadığı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda GLT-1 promotoruna bağlandığı bilinen Transkripsiyon Faktörlerinin (CREB, REST ve YY1) SIRT4 tarafından düzenlenip düzenlenmediği belirlenmek istenmiştir. IHA hücre hattında SIRT4 shRNA lentiviral partikülleri aracılığıyla SIRT4 geni susturulmuştur. SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri ve kontrol IHA hücreleri olmak üzere iki hücre grubu elde edilmiştir.

Bu iki deney grubu arasında SIRT4 geninin başarılı bir şekilde susturulduğunu göstermek için Western Blot yöntemi uygulanarak SIRT4 protein ifadesi incelenmiştir. Sonrasında iki hücre grubu içinde GLT-1 mRNA ifadesi qPCR yöntemi ile belirlenmiştir.

EAAT2 olarak da isimlendirilen GLT-1 beyinde sinaptik boşlukta bulunan glutamati toplayan majör taşıyıcıdır ve astrosit hücrelerinde diğer beyin hücrelerine kıyasla daha fazla eksprese olmaktadır (Robinson ve Jackson, 2016). SIRT4, büyük ölçüde beyindeki glia hücrelerinde eksprese olan mitokondriyal bir sirtuindir. SIRT4'ün yokluğunda GLT-1 proteininin hücre yüzeyindeki ekspresyonunun azaldığı ve buna bağlı olarak beyindeki glutamat alımının azaldığı daha önce gösterilmiştir (Shih ve ark, 2014). Bir diğer çalışmada GLT-1 mRNA ekspresyonunun, sağlıklı beyin dokuları ile karşılaştırıldıklarında tüm primer beyin tümörlerinde önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Dönmez ve ark, 2020). Aynı zamanda yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada, SIRT4'ün glutamat metabolizmasında rol alan GLT-1, GDH (Glutamat Dehidrojenaz) ve GS (Glutamin Sentetaz) proteinlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesi yoluyla eksitotoksisteye karşı koruma sağladığı ve GLT-1'in protein seviyesini artırdığı gösterilmiştir (Dönmez ve Çolak, 2020). Sonuçlarımız doğrultusunda IHA hücrelerinin SIRT4 susturulmuş ve kontrol grupları arasında GLT-1 mRNA ifadesi seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç SIRT4'ün IHA hücrelerinde GLT-1 mRNA ifadesini düzenlemediğini göstermektedir.

Transkripsiyon faktörleri, gen ifadesini düzenleyen karmaşık bir ağın anahtar düzenleyicileridir (Inukai ve ark, 2017). Transkripsiyon faktörleri, gen ifadesini düzenleyen iki önemli bölge olan promotor ve enhancer bölgelerine bağlanırlar (Gilbert S.F., 2000). CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) bir transkripsiyon faktörüdür ve hücrel sinyal iletiminin genetik regülasyonunu düzenleyen önemli bir faktördür (Mayr B. ve

Montminy M., 2001). Daha önceki çalışmalarda CREB'in bir transkripsiyon faktörü olarak GLT-1 promotoruna bağlandığı ve aşırı ekspresyonu sonucu GLT-1 promotor aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir (Karki P. ve ark. 2013). Çalışmamızda CHIP (Kromatin İmmünopresipitasyon) yöntemi kullanarak CREB'in GLT-1 promotoruna bağlandığını gösterdik. Oluşturduğumuz iki deney grubu (SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri ve kontrol IHA hücreleri) arasında kromatin immünopresipitasyon sonrası qPCR deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir. Bu sonuçlar bize SIRT4'ün GLT-1 ekspresyonunu CREB transkripsiyon faktörü aracılığıyla etkilemediğini göstermektedir. SIRT4'ün susturulmasının CREB'in GLT-1 promotoruna bağlanmasına etkisi yoktur.

REST (RE-1 Silencing Transkripsiyon Faktörü) transkripsiyon faktörü, sinir sistemi gelişimi ve işleyişi açısından önemli rol oynayan genetik bir transkripsiyon faktörüdür (Pajarillo ve ark, 2022). Daha önceki çalışmalar, REST'in astrositlerde GLT-1 promotoruna bağlanarak GLT-1 protein ekspresyon seviyesini arttırdığını göstermektedir (Pajarillo ve ark, 2021). Çalışmalarımızda REST'in GLT-1 promotoruna bağlandığını CHIP (Kromatin İmmünopresipitasyon) methodu kullanarak gösterdik. CHIP yöntemi sonrası iki deney grubunda (Kontrol IHA hücreleri ve SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri) gerçekleştirilen qPCR sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Bu sonuçlar SIRT4'ün GLT-1'in transkripsiyonel regülasyonunda REST transkripsiyon faktörü aracılığıyla etki etmediğini göstermektedir. SIRT4'ün susuturulmasının REST'in GLT-1 promotoruna bağlanmasına etkisi yoktur.

YY1 (Yin Yang 1), hücrel gen ifadesini düzenleyen, immünoloji, nöroloji, kanser biyolojisi ve embriyoloji gibi birçok farklı alanın araştırmasında rol alan, genetik ifadeyi hem aktive edebilen (artırabilen) hem de baskılayabilen (azaltabilen) bir transkripsiyon faktörüdür (Karki ve ark, 2014). Daha önceki çalışmalarda YY1 ekspresyonunun artması sonucu GLT-1 promotor aktivitesinin baskılandığı gösterilmiştir (Pajarillo ve ark, 2021; Pajarillo ve ark, 2020). YY1'in GLT-1 promotoruna bağlandığını göstermek için Kromatin İmmünopresipitasyon (CHIP) yöntemini kullandık. Bu yöntem ile her iki hücre grubunda (Kontrol IHA hücreleri ve SIRT4 susturulmuş IHA hücreleri) YY1'in GLT-1 promotorunda bir konsensüs bağlanma sekansı bulunduğunu gösterdik. Kromatin immünopresipitasyon sonrası gerçekleştirdiğimiz qPCR analizinde ise her iki hücre grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim yaşanmadığını gözlemledik. Bu sonuçlar bize SIRT4'ün GLT-1'in transkripsiyonel regülasyonunda YY1 ile herhangi bir ilişkisi bulunmadığını göstermektedir. SIRT4'ün susuturulmasının YY1'in GLT-1 promotoruna bağlanmasına etkisi yoktur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, IHA hücreleri kullanılarak, birçok beyin rahatsızlığının altında yatan temel moleküler yollardan birisi olan eksitotoksitenin giderilmesinde etkili GLT-1 proteininin SIRT4 molekülü aracılığı ile transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

IHA hücrelerinde SIRT4 geninin susturulması hedeflenmiş ve bu çalışma sonucunda iki deney grubu (IHA kontrol ve IHA SIRT4 shRNA) elde edilmiştir. İki deney grubundan izole edilen proteinler ile gerçekleştirilen Western Blot çalışmaları sonucu SIRT4 geninin başarılı bir şekilde susturulduğu gösterilmiştir. Daha sonra iki deney grubunda GLT-1 mRNA seviyeleri qPCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki deney grubu arasında, GLT-1 mRNA seviyesinin, istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği gözlemlenmiştir.

Belirlenen transkripsiyon faktörlerinin (CREB, REST ve YY1) GLT-1 promotoruna bağlanıp bağlanmadığını göstermek ve SIRT4'ün susturulmasının bu durum üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla CHIP (Kromatin immünopresipitasyon) deneyi gerçekleştirilmiştir. İki deney grubundan elde edilen DNA-protein kompleksleri CREB, REST ve YY1 antikorları ile izole edilmiş ve sonrasında oluşturulan krosslink yapısı tersine çevrilerek hedeflenen DNA bölgeleri elde edilmiştir. Elde edilen DNA bölgeleri ile gerçekleştirilen qPCR deneylerinin sonucunda söz konusu transkripsiyon faktörlerinin GLT-1 promotoruna bağlandıkları doğrulanmıştır. Ancak her iki deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Genel bir değerlendirme sonrasında SIRT4'ün GLT-1'i belirtilen transkripsiyon faktörleri üzerinden transkripsiyonel düzeyde etkilemediği ve GLT-1 promotoru üzerinde belirlenen transkripsiyon faktörleri ile etkileşiminin bulunmadığını düşünmekteyiz.

Elde edilen sonuçlar, IHA hücrelerinde SIRT4'ün GLT-1 üzerindeki etkisinin farklı bir yoldan gerçekleştirdiğini düşündürmüştür. Bu etkileşimin araştırılması, nöronal aktivitenin düzenlenmesi ve nörotransmitter dengesinin sağlanması açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Alime, S. A. R. I., & YALCIN, G. (2020). The investigation of endoplasmic reticulum stress markers ATF5 and phosphorylated eIF2 α after kainic acid treatment in neuroblastoma cells. *Cukurova Medical Journal*, 45(1), 96-101.3
- Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 196, 108719.15
- Armada-Moreira, A., Gomes, J. I., Pina, C. C., Savchak, O. K., Gonçalves-Ribeiro, J., Rei, N., ... & Vaz, S. H. (2020). Going the extra (synaptic) mile: excitotoxicity as the road toward neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 90.31
- Attwell, D., & Laughlin, S. B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(10), 1133-1145.16
- Bosch-Presegue, L., & Vaquero, A. (2014). Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene*, 33(29), 3764-3775.35
- Bruce, A. W., López-Contreras, A. J., Flicek, P., Down, T. A., Dhami, P., Dillon, S. C., ... & Vetrie, D. (2009). Functional diversity for REST (NRSF) is defined by in vivo binding affinity hierarchies at the DNA sequence level. *Genome research*, 19(6), 994-1005.41
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1), 1-105.14
- Donmez, G. (2012). The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends in pharmacological sciences*, 33(9), 494-501.34
- Gilbert, S. F. (2000). Axis formation in amphibians: the phenomenon of the organizer. In *Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates.9
- Guo, C., & Ma, Y. Y. (2021). Calcium permeable-AMPA receptors and excitotoxicity in neurological disorders. *Frontiers in neural circuits*, 15, 711564.32
- Hansen, K. B., Wollmuth, L. P., Bowie, D., Furukawa, H., Menniti, F. S., Sobolevsky, A. I., ... & Traynelis, S. F. (2021). Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*, 73(4), 1469-1658.18

- Inukai, S., Kock, K. H., & Bulyk, M. L. (2017). Transcription factor–DNA binding: beyond binding site motifs. *Current opinion in genetics & development*, 43, 110-119.8
- Ji, Z., Liu, G. H., & Qu, J. (2022). Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(4), 287-298.33
- Karaca, M., Frigerio, F., & Maechler, P. (2011). From pancreatic islets to central nervous system, the importance of glutamate dehydrogenase for the control of energy homeostasis. *Neurochemistry international*, 59(4), 510-517.5
- Karki, P., Webb, A., Smith, K., Johnson Jr, J., Lee, K., Son, D. S., ... & Lee, E. (2014). Yin Yang 1 is a repressor of glutamate transporter EAAT2, and it mediates manganese-induced decrease of EAAT2 expression in astrocytes. *Molecular and cellular biology*.12
- Karki, P., Webb, A., Smith, K., Lee, K., Son, D. S., Aschner, M., & Lee, E. (2013). cAMP response element-binding protein (CREB) and nuclear factor κ B mediate the tamoxifen-induced up-regulation of glutamate transporter 1 (GLT-1) in rat astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40), 28975-28986.40
- Kim, K., Lee, S. G., Kegelman, T. P., Su, Z. Z., Das, S. K., Dash, R., ... & Fisher, P. B. (2011). Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *Journal of cellular physiology*, 226(10), 2484-2493.25
- Kritis, A. A., Stamoula, E. G., Paniskaki, K. A., & Vavilis, T. D. (2015). Researching glutamate–induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 91.17
- Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., ... & Weirauch, M. T. (2018). The human transcription factors. *Cell*, 172(4), 650-665.38
- Lau, A., & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 460, 525-542.20
- Lee, E., Sidoryk-Wêgrzynowicz, M., Wang, N., Webb, A., Son, D. S., Lee, K., & Aschner, M. (2012). GPR30 regulates glutamate transporter GLT-1 expression in rat primary astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26817-26828.39

- Lee, S. G., Kim, K., Kegelmann, T. P., Dash, R., Das, S. K., Choi, J. K., ... & Fisher, P. B. (2011). Oncogene AEG-1 promotes glioma-induced neurodegeneration by increasing glutamate excitotoxicity. *Cancer research*, 71(20), 6514-6523.43
- Magi, S., Piccirillo, S., Amoroso, S., & Lariccia, V. (2019). Excitatory amino acid transporters (EAATs): Glutamate transport and beyond. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5674.13
- Maragakis, N. J., & Rothstein, J. D. (2001). Glutamate transporters in neurologic disease. *Archives of neurology*, 58(3), 365-370.22
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(8), 599-609.10
- Min, Z., Gao, J., & Yu, Y. (2019). The roles of mitochondrial SIRT4 in cellular metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 783.36
- Nisar, S., Bhat, A. A., Masoodi, T., Hashem, S., Akhtar, S., Ali, T. A., ... & Haris, M. (2022). Genetics of glutamate and its receptors in autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 27(5), 2380-2392.2
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(3880), 719-721.30
- Pajarillo, E., Demayo, M., Digman, A., Nyarko-Danquah, I., Son, D. S., Aschner, M., & Lee, E. (2022). Deletion of RE1-silencing transcription factor in striatal astrocytes exacerbates manganese-induced neurotoxicity in mice. *Glia*, 70(10), 1886-1901.11
- Pajarillo, E., Digman, A., Nyarko-Danquah, I., Son, D. S., Soliman, K. F., Aschner, M., & Lee, E. (2021). Astrocytic transcription factor REST upregulates glutamate transporter EAAT2, protecting dopaminergic neurons from manganese-induced excitotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 297(6).42
- Pajarillo, E., Johnson, J., Rizor, A., Nyarko-Danquah, I., Adinew, G., Bornhorst, J., ... & Lee, E. (2020). Astrocyte-specific deletion of the transcription factor Yin Yang 1 in murine substantia nigra mitigates manganese-induced dopaminergic neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 295(46), 15662-15676.44
- Pajarillo, E., Rizor, A., Lee, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019). The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology*, 161, 107559.23

- Peterson, A. R., & Binder, D. K. (2019). Post-translational regulation of GLT-1 in neurological diseases and its potential as an effective therapeutic target. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 164.26
- Robinson, M. B., & Jackson, J. G. (2016). Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochemistry international*, 98, 56-71.28
- Rodríguez-Campuzano, A. G., Hernández-Kelly, L. C., & Ortega, A. (2021). DNA Methylation-Dependent Translational Control of Glutamate Transporters in Cultured Radial Glia Cells. 27
- Schneider, N., Cordeiro, S., Machtens, J. P., Braams, S., Rauen, T., & Fahlke, C. (2014). Functional properties of the retinal glutamate transporters GLT-1c and EAAT5. *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), 1815-1824.29
- Shih, J., Liu, L., Mason, A., Higashimori, H., & Donmez, G. (2014). Loss of SIRT 4 decreases GLT-1-dependent glutamate uptake and increases sensitivity to kainic acid. *Journal of Neurochemistry*, 131(5), 573-581.6
- Simonin, A., Montalbetti, N., Gyimesi, G., Pujol-Giménez, J., & Hediger, M. A. (2015). The hydroxyl side chain of a highly conserved serine residue is required for cation selectivity and substrate transport in the glial glutamate transporter GLT-1/SLC1A2. *Journal of biological chemistry*, 290(51), 30464-30474.4
- Simonin, A., Montalbetti, N., Gyimesi, G., Pujol-Giménez, J., & Hediger, M. A. (2015). The hydroxyl side chain of a highly conserved serine residue is required for cation selectivity and substrate transport in the glial glutamate transporter GLT-1/SLC1A2. *Journal of biological chemistry*, 290(51), 30464-30474.24
- Teleanu, R. I., Niculescu, A. G., Roza, E., Vladâcenco, O., Grumezescu, A. M., & Teleanu, D. M. (2022). Neurotransmitters—Key Factors in Neurological and Neurodegenerative Disorders of the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5954.1
- Vandenberg, R. J., & Ryan, R. M. (2013). Mechanisms of glutamate transport. *Physiological reviews*, 93(4), 1621-1657.21
- Yalcin, G. D., Oktay, E., Yalcin, A., Diniz, G., Kahraman, D. S., & Senoglu, M. (2020). Glutamate Transporter 1 expression in human glioblastomas. *JBUON*, 25(4), 2051-2058.45

- Yalçın, G. D., & Colak, M. (2020). SIRT4 prevents excitotoxicity via modulating glutamate metabolism in glioma cells. *Human & Experimental Toxicology*, 39(7), 938-947.7
- Zhang, Z., Zhang, S., Fu, P., Zhang, Z., Lin, K., Ko, J. K. S., & Yung, K. K. L. (2019). Roles of glutamate receptors in Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4391.19

