



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HİPOTİROİDİ OLUŞTURULMUŞ SIÇAN MODELİNDE BULBUS
OLFAKTORYUS'DA OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Duygu Cemre SUNA

Danışman
Prof. Dr. Narin LİMAN

Doktora Tezi

Ocak 2024
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HİPOTİROİDİ OLUŞTURULMUŞ SIÇAN MODELİNDE BULBUS
OLFAKTORYUS'DA OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Hazırlayan
Duygu Cemre SUNA

Danışman
Prof. Dr. Narin LİMAN

Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-
2020-9923 kodlu proje ile desteklenmiştir.

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin araştırmam olduğunu, tüm bilgi ve verilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal, metod ve sonuçları tam olarak yansıttığımı, diğer araştırmacıların makalelerinden alıntı yaptığımda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Duygu Cemre SUNA

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Hipotiroidi Oluşturulmuş Sıçan Modelinde Bulbus Olfactoryus'da Otofajinin Araştırılması" adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Duygu Cemre SUNA

Danışman

Prof. Dr. Narin LİMAN

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

Prof. Dr. Narin LİMAN danışmanlığında **Duygu Cemre SUNA** tarafından hazırlanan “**Hipotiroidi Oluşturulmuş Sıçan Modelinde Bulbus Olfactoryus’da Otofajinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

11.01.2024

JÜRİ

İmza

Danışman: Prof. Dr. Narin LİMAN

Üye: Prof. Dr. Meryem EREN

Üye: Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

Üye: Prof. Dr. Hakan SAĞSÖZ

Üye: Prof. Dr. Sema USLU

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve yazılması konusunda göstermiş olduğu destek ve yardımlarından ötürü tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Narin LİMAN'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca TDK-2020-9923 proje kodu ile tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve Birim Personeline, tezimin deney hayvanı protokolünün tüm aşamalarında ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Aykut GRAM'a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğretim Üyesi Meryem ŞENRÜRK'e, Dr. Veteriner Hekim Ural Kemal KAVRAAL'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Veteriner Hekim Kaan BOZBEK'e çok teşekkür ederim. Ayrıca Doktora eğitimim süresince vermiş oldukları derslerle Histoloji ve Embriyoloji Bilim alanında temel bilgi birikimimin oluşturulmasında katkı sağlayan Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM'a, Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ'a ve Prof. Dr. Emel ALAN'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip destek olan eşim Fatih SUNA'ya ve çocuklarıma en içten duygularla teşekkür ederim.

Duygu Cemre SUNA

Kayseri, Ocak 2024

HİPOTİROİDİ OLUŞTURULMUŞ SIÇAN MODELİNDE BULBUS OLFAKTORYUS'DA OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI

Duygu Cemre SUNA

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Narin LİMAN

ÖZET

Bu tezde hipotiroidizm oluşturulmuş ve hipotiroidizm oluşturulup tedavi edilmiş erişkin sıçan modelinde tiroid bezi disfonksiyonuna bağlı olarak şekillendiği bildirilen olası koku alma bozukluklarında bulbus olfaktoryus (OB) dokusunda otofajinin rolünün olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla OB'de AMPK, mTOR, TSC2, ULK1, Beclin 1, p62 ve LC3 gibi otofajinin çeşitli aşamalarını düzenleyen proteinlerin lokalizasyonları ve göreceli miktarlarının değişip değişmediği ve eğer değişiyorsa bu değişimin otofajinin indüklenmesi veya inhibe olması yönünde olup olmadığı immunohistokimya ve Western blot (WB) analiz teknikleri kullanılarak incelendi. Çalışmada 48 adet erkek erişkin (2-2.5 aylık) Wistar Albino sıçanlara ait OB doku örnekleri kullanıldı. Sıçanlar her grupta 16 adet bulunacak şekilde kontrol, hipotiroidli ve tedavi edilen hipotiroidli grup olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (CON) 1 ml serum fizyolojik, hipotiroidi grubuna (PTU) 10 mg/kg propiltiourasil (PTU) 28 gün süreyle intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı. Tedavi edilen hipotiroidli grupta (PTU+L) öncelikle hipotiroidizm oluşturuldu ve takiben bu gruba 15 gün süreyle 5 µg levotiroksin (LT4) 1 ml serum fizyolojik içinde intraperitoneal olarak enjekte edildi. Denemelerin bitimini takiben koku alma fonksiyonundaki değişiklikleri belirlemek amacıyla hayvanlara gömülü-yiyecek arama testi uygulandı ve sonra yapılacak analizler için doku örnekleri alındı. Koku alma testinde yemi bulma süresinin CON grubunda en kısa, PTU+L grubunda ise en uzun olduğu ve bu sürenin hem CON hem de PTU grubundaki sürelerden önemli ölçüde farklılık taşıdığı belirlendi. WB sonuçları p-AMPK α -1/2(Thr183/Thr172)/AMPK α 1/2, p-ULK1(Ser467)/ULK1, p-TSC2(Thr1462)/TSC2 ve Beclin 1/p62(SQSTM1) oranlarının CON grubunda en düşük, PTU+L grubunda en yüksek olduğunu, mTOR ekspresyonunun ise PTU grubunda en düşük, MAPLC3 α /β ve MAP1LC3A'nın ise bu grupta en yüksek olduğunu, ancak gruplar arası tüm farklılıkların önem taşımadığını (P>0.05) gösterdi. İmmünohistokimyasal analiz sonuçları OB'nin sinir telleri katmanında AMPK α 1/2 ve p-AMPK α -1/2(Thr183/Thr172), glomerüler nöropilde AMPK α 1/2, p-AMPK α -1/2(Thr183/Thr172), ULK1, pULK1(Ser467), p-mTOR, p62/SQSTM1 ve MAP1LC3A'nın, periglomerüler hücrelerde p-AMPK α 1/2(Thr183/Thr172), ULK1, p-ULK1(Ser467) ve mTOR'nin, püsküllü ve mitral hücrelerde Beclin 1 hariç incelenen diğer proteinlerin bulunduğunu gösterdi. Ayrıca periglomerüler nöropildeki, dış pleksiform katman, mitral hücreler katmanındaki

akson ve dendritler ile granül hücreler katmanındaki sinir tellerinde de incelenen tüm proteinlerin varlığı saptandı. Sonuç olarak birlikte değerlendirildiğinde bu bulgular hipotiroidizmden ziyade levotiroksin tedavisini takiben koku fonksiyonunun bozulduğunu ve tiroid disfonksiyonunda otofaji biyobelirteçlerinin normal OB'ye kıyasla değiştiğini ve OB'yi olumsuz bir ortama adapte etmek için yüksek düzeyde olmasa bile otofajinin aktive edildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Olfaktör Bulbus; Hipotiroidizm; Otofaji ile ilişkili ptoteinler



INVESTIGATION OF AUTOPHAGY IN THE OLFACTORY BULB IN A RAT MODEL OF HYPOTHYROIDISM

Duygu Cemre SUNA

Erciyes University, Graduate School of Healthy Sciences

Department of Veterinary Histology and Embryology

Ph. D. Thesis, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Narin LİMAN

ABSTRACT

In this thesis, we investigated whether autophagy in the olfactory bulb (OB) tissue plays a role in possible olfactory impairments reported to occur due to thyroid gland dysfunction in hypothyroidism-induced and hypothyroidism-induced and treated adult rat models. For this purpose, we examined whether the localization and relative amounts of proteins regulating various stages of autophagy, such as AMPK, mTOR, TSC2, ULK1, Beclin 1, p62 and LC3 are altered in OB and, if so, whether this alteration is in the direction of induction or inhibition of autophagy using immunohistochemistry and Western blot (WB) analysis technique. OB tissue samples of 48 adult male Wistar Albino rats (2-2.5 months old) were used in the study. The rats were randomly divided into three groups, including control, hypothyroid, and treated hypothyroid groups, with 16 rats in each group. The control group (CON) was treated with 1 ml saline, and the hypothyroid group (PTU) was treated with 10 mg/kg propylthiouracil (PTU) by intraperitoneal injection for 28 days. In the treated hypothyroid group (PTU+L), hypothyroidism was first induced, and then 5 µg levothyroxine (LT4) was injected intraperitoneally in 1 ml saline for 15 days. Following the end of the experiments, animals were subjected to buried food-seeking test to determine changes in olfactory function, and tissue samples were taken for further analysis. In the olfactory test, the time to find the food was the shortest in the CON group and the longest in the PTU+L group, and this time was significantly different from the times in both CON and PTU groups. WB results showed that p-AMPK α -1/2(Thr183/Thr172)/AMPK α 1/2, p-ULK1(Ser467)/ULK1, p-TSC2(Thr1462)/TSC2 and Beclin 1/p62(SQSTM1) ratios were the lowest in the CON group and the highest in the PTU+L group, mTOR expression was lowest in the PTU group, and MAPLC3 α / β and MAP1LC3A were highest in this group, but all differences between groups were not significant ($P>0.05$). Immunohistochemical analysis showed that AMPK α 1/2 and p-AMPK α -1/2(Thr183/Thr172) were localized in the olfactory nerve layer of OB and AMPK α 1/2, p-AMPK α -1/2(Thr183/Thr172), ULK1, pULK1(Ser467), p-mTOR, p62/SQSTM1 and MAP1LC3A, p-AMPK α -1/2(Thr183/Thr172), ULK1, p-ULK1(Ser467), and mTOR were found in periglomerular cells. All proteins except Beclin 1 were present in the tufted and mitral cells. In addition, axons and dendrites in the periglomerular neuropil, outer plexiform layer, and mitral cell layer, and nerve fibers in the granule cell layer showed the

presence of all proteins examined. Taken together, these findings suggest that olfactory function is impaired following levothyroxine treatment rather than hypothyroidism, that autophagy biomarkers are altered in thyroid dysfunction compared to normal OB, and that autophagy is activated, even if not at a high level, to adapt OB to an adverse environment.

KeyWords: Olfactory bulb; Hypothyroidism; Autophagy-related proteins



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇ KAPAK	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR.....	xii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	xxvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tiroid Bezi ve Tiroid Hormonları	4
2.1.1. Tiroid Hormonlarının Biyosentezi ve Salgılanmasının Düzenlenmesi	7
2.1.2. Tiroid Hormonlarının Etki Mekanizmaları.....	12
2.1.3. Tiroid Bezi Fonksiyon Bozuklukları	15
2.1.3.1. Hipotiroidizm	15
2.1.3.2. Hipertiroidizm	19
2.1.4. Tiroid Bezi Fonksiyon Bozukluklarının Merkezi Sinir Sistemindeki Klinik Etkileri	26
2.1.5. Tiroid Hormonlarının Nörogenez Aktivitesi Üzerine Etkisi	28
2.2. Olfaktör Sistem (Koku Alma Sistemi)	31
2.2.1. Ana Olfaktör Sistem	33
2.2.1.1. Periferik Olfaktör Sistem	33
2.2.1.2. Olfaktör Mukoza	34
2.2.1.3. Grueneberg (Grüneberg) Gangliyonu	49
2.2.1.4. Masera'nın Septal Organı	50

2.2.2. Merkezi Olfaktör Sistem	51
2.3. Koku Alma İşlevinin Düzenlenmesinin Özet Gösterimi.....	79
2.3.1. Koku Alma Fonksiyon Bozuklukları.....	82
2.3.2. Bulbus Olfactoryusda Nörogenez ve Tiroid Hormonları Arasındaki İlişkiler.....	84
2.3.3. Otofaji, Nöronal ve Metabolik Hastalıklar İlişkisi	88
3. GEREÇ VE YÖNTEM	156
3.1. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması	156
3.2. Koku Testinin Yapılması.....	157
3.3. Doku Örneklerinin Alınması	158
3.3.1. Olfaktör Bulbus Doku Örneklerinin Histolojik ve İmmünohistokimyasal Boyama Teknikleri İçin Hazırlanması.....	160
3.3.1.1. Krezil Viyolet Asetat Boyama Yöntemi	160
3.3.1.2. İmmünohistokimyasal Analiz	160
3.3.2. Western Blot Analizi	163
3.4. İmmünohistokimyasal Boyamaların Semikantitatif Değerlendirilmesi	164
3.5. Kantitatif Değerlendirmeler ve İstatiksel Analiz.....	164
4. BULGULAR.....	166
4.1. Tiroid Bezindeki Morfolojik Değişiklikler	166
4.2. Koku Deneyi Sonuçları	167
4.3. Olfaktör Bulbus'un Genel Yapısı.....	168
4.4. Otofaji İle İlişkili Proteinlerin Ekspresyonları ve İmmüno lokalizasyonları ..	170
4.4.1. AMPK α 1/2 ve Fosfo-AMPK α 1/2 (Thr183/Thr172) Ekspresyonu ve İmmüno lokalizasyonu	171
4.4.2. ULK1 ve Fosfo-ULK1 (Ser467) Ekspresyonu ve İmmüno lokalizasyonu	175
4.4.3. mTOR ve Fosfo-mTOR (Ser2448) Ekspresyonu ve İmmüno lokalizasyonu	179

4.4.4. TSC2 ve Fosfo-TSC2 (Thr1462) İmmünlökalizasyonu ve Ekspresyonu	184
4.4.5. Beclin 1 ve p62/SQSTM1'in Ekspresyonu ve İmmünlökalizasyonu....	188
4.4.6. MAPLC3 α/β ve MAP1LC3A'nın İmmünlökalizasyonu ve Ekspresyonu	192
5. TARTIŞMA	197
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	220
7. KAYNAKLAR	222
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ABD	: Amerika birleşik devletleri
ark.	: Arkadaşları
AC	: Adenilsiklaz
ACIII	: Adenilsiklaz tip III
AD	: Alzheimer hastalığı
ADP	: Adenozin difosfat
AICAR	: 5-aminoimidazol-4-karboksamid-1-β-D-ribofuranosid
AKT	: Protein kinaz B
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
ALFY	: Otofaji bağlantılı FYVE proteini
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
AMBRA1	: Beclin1 tarafından düzenlenen otofajiyi aktive edici molekül 1
AMD	: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu
AMP	: Adenozin monofosfat
AMPK	: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
AMPKα1	: Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz alfa1
AOB	: Aksesuar bulbus olfaktoryus
AON	: Ön koku alma çekirdeği
AONpE	: Ön koku alma çekirdeğinin pars eksternası
AOS	: Aksesuar olfaktör sistem
ATF	: Aktive edici transkripsiyon faktörü
ATG	: Otofaji ile ilişkili gen
ATG1	: Otofaji ile ilişkili gen 1
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
AV	: Otofajik vakuol

AVi	: Başlangıç otofajik vakuolleri
AVi/d	: Ara otofajik vakuolleri
AVd	: Bozunan otofajik vakuolleri
Barkor	: mTORC1 inhibe eden protein
BC	: Blanes hücresi
Bcl-2	: B hücreli lenfoma 2
BECLIN-1	: PtdIns3K-CI kompleks proteini
4E-BP1	: Ökaryotik başlatma faktörü 4E-bağlayıcı protein 1
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BNIP3	: BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa proteinle etkileşen protein 3
BNIP3L	: BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa proteinle etkileşen protein 3-benzeri
Ca	: Kalsiyum
C9orf72	: Rab1 efektörü
CA	: Kornuammonis
CACC	: Ca ²⁺ ile aktive olan Cl- kanalları
CaMKKβ	: Ca ²⁺ /kalmodulin-bağımlı kinaz kinaz beta
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CEBP β	: CCAAT-artırıcı-bağlayıcı protein beta
CGRP	: Kalsitonin geni ile ilişkili peptit
CHMP	: ESRT-III'ün alt birimi
CHOP	: C/EBP homolog protein
cm	: Santimetre
CMA	: Şaperon aracılı otofaji
Cl	: Klor
CNG	: Siklik nükleotid kapılı
COPII	: Kaplama proteini kompleksi II
CON	: Kontrol grubu
Cullin3	: S. cerevisiae cdc 53 genine homolog olan dolaylı otofaji insan
genleri	
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAG	: Diaçilgliserol

DAPK	: Ölümle ilişkili protein kinaz
DEKAM	: Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
DEPTO	: mTOR ile etkileşen protein içeren inhibitör DEP alanı
DEPTOR	: DEP-domain içeren mTOR ile etkileşen protein
DFCP1	: Çinko parmak FYVE alanı içeren protein 1
DISC1	: Akıl hastalıkları için bir duyarlılık geni olan şizofrenide bozulmuş 1
DIO	: Deiyodinaz
DIO1	: Tip 1 iyodo-tironindeiyodinaz enzimi
DIO2	: Tip 2 iyodo-tironindeiyodinaz enzimi
DIO3	: Tip 3 iyodo-tironindeiyodinaz enzimi
DIT	: Diiyodotirozin
dk	: Dakika
d-EPL	: Derin dış pleksiform tabaka
dET	: Derin püsküllü hücre
dL	: Desilitre
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNM2	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
DRG	: Dorsal kök ganglionları
Dvl2	: Darmadağın segment polarite proteini 2
EAT	: ULK1 proteini üzerinde bir bölge
ECL	: Kemilüminesans substratı
EF1 α	: Uzama faktörü-1 kompleksinin alfa alt birimi
E2F1	: E2F Transkripsiyon Faktörü 1
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü
EPL	: Dış pleksiform katman
EPSP	: Uyarıcı postsinaptik potansiyelleri
EP300	: E1A bağlayıcı protein 300/p300
ER	: Endoplazmik retikulum
ERES	: ER çıkış bölgeleri
ERGIC	: ER-Golgi ara bölmesi
ERK	: Hücre dışındaki sinyallerle düzenlenen kinaz
ERÜ	: Erciyes Üniversitesi

ESCRT	: Endozomal ayırma kompleksleri
ETC/eT	: Dış püsküllü (tufted) hücre
FBXL20	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
FIP200	: 200 kDa'lık fokal adezyon kinaz ailesi etkileşimli protein
FOXO	: Forkhead box O transkripsiyon faktörleri
FTLD	: Frontotemporal Lobar Dejenerasyon
FUNDC1	: Fun14 alanı içeren protein 1
FYCO1	: FYVE ve sarmal-sarmal alanı içeren protein 1
g	: Glial hücre
g	: Gram
G	: Glomerül
G	: Gravite, yoğunluk
G protein	: İntegral membran proteini
Gs	: Adenilat siklaz kontrolünde uyarıcı G proteini
$\alpha\beta\gamma$ G-protein	: Alfa beta gama G proteini
GABA	: Gama amino bütirik asit
GABARAP	: GABA tip aminobütirik asit reseptörü ilişkili protein ailesinin üyeleri
GAD	: Glutamik asit dekarboksilaz
GAD67	: Glutamik asit dekarboksilaz 67
GAG	: Glikozaminoglikan
GAP	: GTPaz aktive edici protein
GATA1	: GATA Bağlayıcı Protein 1 veya Globin Transkripsiyon Faktörü 1
GATE-16	: 16 kDa'lık Golgi ile ilişkili ATPase arttırıcı
GBC	: Küresel bazal hücre
GBH	: Küresel bazal hücre
GC	: Granüler hücre (Gc)
GCL	: Granüler hücre katmanı
GDP	: Guanin di fosfat
GFAP	: Gliyal fibriler asidik proteini
GFP	: Yeşil floresan proteini
GG	: Grueneberg gangliyonu
GLUT	: Glikoz taşıyıcı

GM130	: 130 kDa'lık Golgi matriks proteini
GNAL	: Golf, G alfa olf alfa alt birimi
GNB1	: G Beta alt birimi
GNG13	: G gama alt birimi
GL	: Glomerüler katman
GRAMD1A	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein (Kolesterol transfer proteini)
GPCR	: G-protein eşleşmiş reseptör
GTP	: Guanin tri fosfat
GSK3	: Glikojen sentez kinaz
G α	: G alfa
G β	: G beta
G γ	: G gama birimi
G α olf	: Galfaolf birimi
Golf	: Golf birimi
GI	: Tip-I granül hücresi
GII	: Tip-II granül hücresi
HBC	: Horizontal bazal hücre
HD	: Huntington hastalığı
HE	: Hematoksilen eozin
HEK	: İnsan embriyonik böbrek
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HOPS	: Homotipik füzyon ve vakuol protein sıralaması
HRE	: Hormon yanıt elementleri
HRP	: Horseradish peroxidase
HSC70	: Isı şok-kognat proteini
I	: İyot
I-	: İyodür
I+	: İyodinyum
IAS	: İntrabulbar birleşme sistemi
ICC	: İmmünohistokimya
IF	: İmmunofloresan
IGF-1	: İnsülin büyüme faktörü 1

IgA	: İmmünglobülin A birimi
IgG	: İmmünglobülin G birimi
IgM	: İmmünglobülin M birimi
IHC	: İmmünohistokimya
IL-1 β	: İnterkökin-1beta
IL-6	: İnterlökin-6
INP	: Ara nöral progenitör hücre
IPL	: İç pleksiform katman
IP3	: İnositol trifosfat
IR	: İnsülin reseptörü
IS	: İmmün boyanma yoğunluğu skoru
i-EPL	: Ara dış pleksiform tabaka
iET	: İç püsküllü hücresi (iT)
JG	: Jukstaglomerül hücreler
JNK	: Jun N-terminal kinaz
K	: Potasyum
kDa	: Kilodalton
KEAP1	: Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1
KFERQ	: Pentapeptit motifli protein
Kg	: Kilogram
KIR	: Keap1 etkileşimli bölge
KLHL20	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
L	: Litre
LAMP-2A	: Lizozomla ilişkili membran proteini tip 2A
LAP	: LC3-ilişkili fagositoz
LC3	: Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3
LC3A	: Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 ek varyantı
LC3-I	: LC3'ün sitozolik formu
LC3-II	: LC3-PE konjugatı
LE	: Geç endozom
LH	: Luteinleştirici hormon
LIR	: LC3 ile etkileşen bölge

LKB	: Liver kinaz B
LNG	: Lateral burun bezleri
LOT	: Lateral koku alma yolu (lateral olfaktör trakt)
LT3	: Liotironin (L-triiodotironin)
LT4	: Levotiroksin
MAPK	: Mitojenle aktifleşen protein kinaz
MAG	: Miyelinle ilişkili glikoprotein
MAP1LC3	: Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3
MAPKAPK2	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
mcg	: Mikrogram
Mc/MC	: Mitral hücre
M:I	: Tip I mitral hücresi
M:II	: Tip II mitral hücresi
MCL	: Mitral hücre katmanı
mGluR	: Metabotropik glutamat reseptörü
MIT	: Monoiodotirozin
mIU	: Mili uluslararası birim
mLST8	: Sec13 protein 8 ile memeli ölümcül veya TORC alt birimi LST8
mM	: Milimolar
MMI	: Metimazol
MOB	: Ana olfaktör bulbus (Ana koku alma soğanı)
MOS	: Ana olfaktör sistem
MSC	: ER aracılı temas bölgeleri
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
M/T	: Mitral/püsküllü hücre
mSIN1	: MAP kinazla etkileşen protein 1
mtTFA	: Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A
mTC	: Orta püsküllü hücre
mTOR	: Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi
mTORC	: Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi

mTORC1	: Rapamisinin memeli/mekanistik hedefi kompleksi 1
mTORC2	: Rapamisinin memeli/mekanistik hedefi kompleksi 2
mTC	: Orta püsküllü (tufted) hücre
MVB'	: Çoklu veziküler cisim
MVC	: Mikrovillar koku hücresinin
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mM	: MiliMolar
mA	: MiliAmper
ml	: Mililitre
N	: Normal
n	: Örneklem sayısı
ng	: Nanogram
nmol	: Nanomol
ns	: İstatiksel olarak önemsiz
Na	: Sodyum
NADPH-d	: Nikotinamidadenindinükleotid fosfat diaforaz
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaCl	: Sodyum Klorür
NBR1	: BRCA1 geninin komşusu
NDP52	: 52 kDa'lık nükleer nokta proteini
NEDD4L	: Beclinle ilişkili ile dolaylı otofajik proteini
NES	: Nükleer Dışa Aktarım Dizisi
NFE2L2	: Nükleer faktör eritroid 2 benzeri 2
NFKB	: B-hücrelerinde kappa hafif polipeptit gen arttırıcı nükleer faktör
NG	: Glomerül dizileri
NIS	: Sodyum iyodür simporter
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Dizisi
NMDA	: N-Metil-D-aspartat
NoLS	: Nükleolar Lokalizasyon Dizisi
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NPAL	: Nazopalatin kanalı

NPC	: Nöronal kök hücresi öncüleri
NSC	: Nöral kök hücreler
NSPC	: Nöral kök hücre öncüleri
OB	: Bulbus olfaktoryus
OBV	: Olfaktör bulbus ventrikülü
OC	: Olfaktör korteks
OE	: Olfaktör epiteli
OEC	: Olfaktör gliya hücreleri
OECs	: Olfactory ven sheathing v hücreleri
OFC	: Orbitofrontal korteks
OM	: Olfaktör mukoza
OMP	: Koku işaretleyici protein
ON	: Olfaktör çekirdek (nükleus)
ONL	: Olfaktör sinir katmanı
OP	: Olfaktör pedinkül
OR	: Olfaktör reseptör
ORN	: Olfaktör reseptör nöronları
OSN	: Olfaktör duyu nöronları
OV	: Olfaktör Ventrikül
P	: Probability (anlamlılık)
p	: Fosfo
p70S6K	: Ribozomal protein S6 kinaz beta-1 (S6K1 olarak da bilinir)
PAS	: Periodik asit Schiff
PBS	: Fosfat buffersalın
PB1	: Phox ve Bem1 alanı
PC	: Piriform korteks
PD	: Parkinson hastalığı
PE	: Fosfatidiletanolamin
pE	: Pars eksterna
PGC	: Periglomerüler hücre (Pg)
PGC-1 α	: Peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör gama koaktivatör 1
alfa	

pH	: Hidrojen potansiyeli
PI	: Fosfatidilinositol
PIKK	: Fosfatidilinositol 3-kinaz ilişkili kinazlar
PI3K	: Fosfatidilinositid 3-kinaz
PI3KC3-C1	: Sınıf III PI3K kompleksi 1
PI4K2A	: Fosfatidilinositol 4-kinaz tip 2 alfa (PI4KII α)
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PKA	: Protein kinaz A
PKB	: Protein kinaz B
PKC	: Protein kinaz C
PLEKHM1	: Pleckstrin homoloji alanı içeren protein ailesi üyesi 1
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
PtdIns3K	: Sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz
PtdIns3P	: Fosfatidilinositol-3-fosfat
PRAS40	: 40 kDa'lık prolin bakımından zengin AKT substratı
PPAR	: Peroksizom proliferatörle aktive olan reseptörü
PRL	: Prolaktin
PTU	: 6-n-propil tiourasil
PTU grubu	: Deneysel hipotiroidizm oluşturulmuş grup
PTU+L	: Deneysel hipotiroidizm oluşturulduktan sonra LT4 ile tedavi edilmiş grup
PV	: Parvalbumin
PVDF	: Polivinilidenflorid
PVN	: Parvalbumin eksprese eden EPL nöronu
R	: Reseptör proteini
RAR	: Retinoik asit reseptörü
Rab7	: Geç endositik membranın küçük GTPaz düzenleyicisi
RAPTOR	: mTOR'un düzenleyici-ilşkili proteini
RGC	: Radyal glia hücreleri
rT3	: Reverse T3
Rheb	: Beyinde zenginleştirilmiş Ras homoloğu
Rictor	: mTOR'un rapamisine duyarsız tipi

RIPA Buffer	: Radyoimmünopresipitasyon deney tampon solüsyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RNF216	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
RMS	: Rostral göç yolu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Rsk	: Ribozomal S6 kinaz
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
RXR	: Retinoid X reseptörü
SAC	: Kısa aksonlu hücre
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez
SeCys	: Selenosistein
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
Ser	: Serin proteini
s-EPL	: Yüzeysel dış pleksiform tabaka
sET	: Süperfisiyal (dış) püsküllü hücre
SEZ	: Subependimal katman
SGA	: Subgranüler alan
SGK-1	: Serum ve glikokortikoid ile indüklenen protein kinaz 1
SGZ	: Subgranüler bölge
Sirt1	: Sirtuin 1
SLC1A5	: Nötr aminoasit taşıyıcı, Çözünen taşıyıcı aile 1 üye 5
SNARE	: Çözünür NSF bağlanma protein reseptörü
SNX18	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
SOM	: Maseraseptal organı
SO	: Masera'nın septal organı
SREBF2	: Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2 (SREBP2)
SRIF-ir	: Somatostatin-immünoreaktif
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences (Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi)
sSA	: Yüzeysel kısa aksonlu hücre
STK	: Serin-treonin kinaz
STK36	: Serin/treonin kinaz 36

Strept-ABC	: Strep-Avidin Biotin Kompleks
SUMO	: Küçük Ubiquitin benzeri düzenleyici
SUS	: Sustentakular hücre
STX17	: ER'de yerleşik protein (sintaksin 17)
SQSTM1/p62	: Sekestozom 1 proteini
SVZ	: Subventriküler alan (SVA)
T2	: 3,3'-diiodotironin
T3	: Triiodotironin
T4	: Tiroksin
TAC	: Transit çoğaltıcı hücreler
TAK1	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta ile aktive olan kinaz 1
TB	: TNF reseptörü ile ilişkili bağlayıcı alan
TBG	: Tiroksin bağlayıcı globulin
TBS	: TrisBufferSalin
TBS-T	: TrisBufferSalin-Tween 20
TC	: Püsküllü (Tufted) hücre
TECPR2	: Tektonin β -pervane içeren protein 2
TFEB	: Transkripsiyon faktörü EB
TH	: Tiroid hormonu
Thr	: Treonin proteini
THR	: Tiroid hormon reseptörü (TR)
THRA	: Tiroid hormon reseptörü A (α , alfa)
THRB	: Tiroid hormon reseptörü B (β , beta)
TIP60	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü alfa
TP53INP2	: p53 indüklenabilir nükleer protein 2
TPO	: Tiroid peroksidaz
TRAF6	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
TRPM5	: Transient Receptor Potential Cation ChannelSubfamily M Member 5
TRE	: Tiroid response element (tiroid yanıt elemanı)
TRH	: Tirotropin salgılatıcı hormon
TRF	: Tirotropin salgılatıcı faktör

TRHR	: Tirotropin salgılatıcı hormon reseptörü
TR α 1	: Tiroid hormon reseptörü alfa 1
TR β 1	: Tiroid hormon reseptörü beta 1
TS	: Tüberoskleroz
TSAb	: Tiroid uyarıcı antikor
TSC	: Tuberoz skleroz kompleksi
TSC1	: Tuberoz skleroz kompleks 1, hamartin
TSC2	: Tuberoz skleroz kompleks 2, tuberin
TSH	: Tiroid stimüle edici hormon
TSHR	: Tiroid stimüle edici hormon reseptörü (tirotropin reseptörü)
TSI	: Tiroid uyarıcı immünoglobulin
TTR	: Transtiretin
UBA	: Ubikuitin bağlayıcı alan
Ubl	: Ubikitin benzeri
ULK	: Unc-51 benzeri kinaz
ULK1	: Unc-51 benzeri kinaz 1
ULK2	: Unc-51 benzeri kinaz 2
UPS	: Ubikuitin-Proteazom Sistemi
UVRAG	: UV ışınlama direnci ile ilişkili gen
W	: Watt
WAC	: Sarmal sarmallı WW alanı içeren adaptör
WB	: Western Blot
WIPI1	: WD tekrar alanı fosfoinozitol etkileşimli protein 1
WIPI2	: WD tekrar alanı fosfoinozitol etkileşimli protein 2
V	: Volt
Vb	: ve benzeri
VDAC1	: Voltaja bağlı anyon seçici kanal 1
VG hücresi	: Van Gehuchten hücresi
VIP	: Vazointestinal peptid
VNS	: Vomeronazal sistem
VNO	: Vomeronazal organ
VPS15	: Vakuolar protein ayırma proteini 15

Vps15	: Vakuolar protein ayırma proteini 15 geni
VPS34	: Vakuolar protein ayırma proteini 34
Vps34	: Vakuolar protein ayırma proteini 34 geni
VSE	: Vomeronazal duyuşal epiteli
VZ	: Ventriküler bölge
ZBTB16	: Otofaji ile dolaylı ilişkili protein
ZKSCAN3	: KRAB ve SCAN alanlarına sahip çinko finger proteini 3
μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
μl	: Mikrolitre
%	: Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrad derece
Ω	: Omega

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Kokunun işlenmesi sırasında aktive olan beyin alanları	80
Tablo 3.1. İmmunohistokimya (IHC) ve Western blot (WB) analizinde kullanılan antikorlar ve özellikleri	161
Tablo 4.1. Kontrol (CON), Hipotiroidi (PTU) ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların OB'sinde, AMPK, p-AMPK, ULK1, p-ULK1, mTOR ve p-mTOR proteinlerinin yerleşimleri ve boyanma yoğunlukları.....	183
Tablo 4.2. Kontrol (CON), Hipotiroidi (PTU) ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların OB'sinde, TSC2, pTSC2, Beclin 1, SQSTM1/p62, MAPLC3 α/β ve MAP1LCA, proteinlerinin yerleşimleri ve boyanma yoğunlukları	196
Şekil 2.1. Tiroid bezi aktivitesinin kontrolü	8
Şekil 2.2. Tiroid hormonu sentezi.....	11
Şekil 2.3. Fare olfaktör (koku alma) sistemi.....	33
Şekil 2.4. Olfaktör mukoza ve olfaktör bulbus (OB) bileşenlerinin şematik gösterimi	35
Şekil 2.5. A: Olfaktör mukoza, B: Olfaktör (koku) epitel.	36
Şekil 2.6. Olfaktör mukozanın hücre-mimarisi ve moleküler özellikleri	37
Şekil 2.7. Olfaktör reseptör nöronun transmisyon elektron mikroskopi	39
Şekil 2.8. Fare koku alma sinyal iletim kaskadı	41
Şekil 2.9. Olfaktör reseptör nöronu ve silyumlardaki iyon kanalları.	42
Şekil 2.10. Koku alma nöral yolu	43
Şekil 2.11. Fare olfaktör (koku alma) sistemi.....	45
Şekil 2.12. Fare olfaktör epitelinin mikrovillöz hücrelerinde yeşil floresan protein (GFP) ekspresyonu.....	47
Şekil 2.13. Sıçanda bir mikrovillar koku hücresinin (MVC) ve tipik bir olfaktör reseptör nöronunun (OSN) apikal kutuplarını gösteren elektron mikroskopi.....	48
Şekil 2.14. Sıçanda olfaktör bulbus (OB).....	52
Şekil 2.15. İnsan beyinde Olfaktör Bulbus'un önden ve ventralden görünümü.....	53
Şekil 2.16. Sıçanda beyincik, beyin ve Olfaktör Bulbus'un (OB) horizontal kesiti..	53

Şekil 2.17. On altı günlük bir sıçan beyninin Ana Olfaktör Bulbus (MOB) ve Aksesuar Olfaktör Bulbus'un (AOB) sagittal kesit görünümü.....	54
Şekil 2.18. Farede Olfaktör Bulbus'un yatay kesiti.....	55
Şekil 2.19. Farede periferik ve merkezi koku alma yapılarına histolojik bakış.....	55
Şekil 2.20. Olfaktör bulbus (OB) katmanları.....	56
Şekil 2.21. Olfaktör bulbusda (OB) nöronların lokalizasyonu.	57
Şekil 2.22. Fare OB'sinde olfaktör sinir telleri katmanı, glomerüler katman (GL) ve dış pleksiform katman (EPL).	58
Şekil 2.23. Camk2a-EGFP transgenik farenin OB'sinde ONL (olfaktör sinir telleri) ve GL'de miyelinsiz aksonların immünfloresan boyama ile görünümü.....	59
Şekil 2.24. Glomerüler katmandaki (GL) nöronların alt tipleri.....	60
Şekil 2.25. Yetişkin bir farenin OB'sindeki periglomerüler (A, B) ve mitral (A) nöronların immünfloresan boyama ile görünümü.....	61
Şekil 2.26. Olfaktör bulbus'un sinaptik organizasyonu.....	62
Şekil 2.27. Fare OB'sinin glomerüllerdeki bölmeleri.....	63
Şekil 2.28. Kemirgen OB'sinde projeksiyon nöronlarının alt popülasyonları.....	66
Şekil 2.29. Memeli koku alma sistemi ve olfaktör bulbus (OB) devresi.....	67
Şekil 2.30. Püsküllü hücrelerin ve mitral hücrelerin alt tiplerinin yanı sıra dış pleksiform tabaka (EPL) ve mitral hücre tabakasındaki (MCL) internöronların şematik gösterimi.....	70
Şekil 2.31. Olfaktör Bulbus'un şematik gösterimi	71
Şekil 2.32. Kemirgen OB'sinde temel nöral devre.....	72
Şekil 2.33. Olfaktör bulbus'daki nöronal devre.....	73
Şekil 2.34. Olfaktör bulbus'daki hücre tiplerinin dağılımlarının şematik gösterimi .	75
Şekil 2.35. Mitral ve püsküllü hücrelerin kortikal izdüşümü	75
Şekil 2.36. Granül hücre katmanındaki (GCL) granül hücrelerin 6 alt tipinin (GC) ve 3 alt tip derin kısa aksonlu hücrenin (dSA hücreleri) şematik gösterimi.....	78
Şekil 2.37. Kokunun algılanmasının özet gösterimi	81
Şekil 2.38. Yetişkin kemirgen SVZ ve OB'de nörogenez.....	85
Şekil 2.39. Memeli hücrelerinde görülen otofaji çeşitleri.....	89
Şekil 2.40. Üç çeşit mikrootofajinin şematik gösterimi.....	90
Şekil 2.41. Şaperon aracılı otofajinin (CMA) aşamaları ve fizyolojik işlevleri	91

Şekil 2.42. Makrotofaji, otofagozomların da novo oluşumu ve otofagozomlar ile lizozomların füzyonu ile karakterize edilir	95
Şekil 2.43. Otofaji süreci dört aşamaya ayrılabilir: (a) Başlama, (b) çekirdeklenme, (c) uzama ve (d) parçalanma	96
Şekil 2.44. mTORC1 ve mTORC2 kompleksi ve bunların otofajiyi düzenlemesi..	100
Şekil 2.45. Memeli hücrelerinde makrotofaji süreci.....	103
Şekil 2.46. AMPK hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre büyümesini modüle eder	106
Şekil 2.47. AMPK kısa ve uzun süreçli mekanizmalarla otofajiyi yönetir.....	107
Şekil 2.48. Açlık ve insülin sinyali ile otofaji modülasyonu	108
Şekil 2.49. Fagoforlar için membran kaynakları	110
Şekil 2.50. Fagofor biyogenezinde ER temas bölgesi rolünün varsayımsal modeli	112
Şekil 2.51. Otofagozom oluşumuna katılan ATG proteinleri ve lokalizasyonları...	114
Şekil 2.52. ATG proteinlerinin koordineli eylemleri ile otofagozom biyogenezinin altında yatan moleküler mekanizma.....	118
Şekil 2.53. Otofaji, mTOR ve AMPK sinyal yolları aracılığıyla besin ve beslenme stresleri tarafından indüklenir	120
Şekil 2.54. Fagofor çekirdeklenmesinde rol oynayan sinyal olaylarına ve protein-protein ve protein-membran etkileşimlerine genel bakış	121
Şekil 2.55. İki önemli otofaji başlatıcı kinaz kompleksi olan ULK1 ve PIK3C3/VPS34 kompleksinin post-translasyonel modifikasyonları ve düzenlemeleri	122
Şekil 2.56. Fagofor membranının genişlemesinde görevli araçlar arasında ayrıca iki ubikuitin benzeri konjugasyon sistemi rol oynar: ATG12-ATG5-ATG16L sistemi ve fosfatidiletanolamin (PE)-hafif zincir 3 (LC3) sistemi	123
Şekil 2.57. ATG4 pro-LC3'ü parçalayarak LC3-II'yi oluşturur ve daha sonra LC3-II'nin oluşumu için ATG7 tarafından PE'ye konjüge edilir	124
Şekil 2.58. Fagofor uzamasında yer alan mekanizmalar modeli	125
Şekil 2.59. Otofagozom kapanması taşıma makineleri için gerekli endozomal ayırma kompleksleri (ESCRT) tarafından kolaylaştırılır	126
Şekil 2.60. Otofaji sırasında LC3 ve GABARAP alt ailelerinin diferansiyel/telaflı edici rolleri.....	129
Şekil 2.61. Otofagozom biyogenezi ve olgunlaşması	134

Şekil 2.62. SQSTM1/p62 alanları, çok yönlü doğası ve yaşa bağlı dejeneratif hastalıklarla ilişkili zararlar üzerindeki etkisi	138
Şekil 2.63. Nöronlarda otofaji mekanizması.....	142
Şekil 2.64. Nörogenez ve nöronal plastisitede otofajinin rolüne ilişkin deneysel kanıtlara genel bakış.....	145
Şekil 2.65. Beyinde AMPK aktivitesi.....	153
Şekil 3.1. Koku testi yapılan akrilik kafes ve deney aşamasındaki bir sıçan.....	157
Şekil 3.2. Histoloji ve immünohistokimyasal analiz için perfüze edilmiş doku örneklerinin alınması.....	159
Şekil 3.3. Sıçanda perfüze edilmemiş sağ ve sol olfaktör bulbus (OB)'sinin (oklar) kafatasındaki lokalizasyonu.....	159
Şekil 4.1. A: Kontrol (CON), B: Hipotiroidili (PTU) ve C: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili (PTU+L) sıçanların tiroid bezlerinin makroskopik görünümü .	166
Şekil 4.2. Kontrol (CON), hipotiroidili (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili (PTU+L) sıçanların koku testi sonuçları. * Gruplar arasındaki farklılığın $P<0.05$ düzeyinde anlamlı olduğunu göstermektedir.....	167
Şekil 4.3. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus dokularının histolojik görünümü	169
Şekil 4.4. Sıçan dokularında pozitif (A-L) ve negatif kontrol (M-N) kesitlerinde immün boyanmalar.....	170
Şekil 4.5. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktör bulbusunda AMPK ve p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172'nin Western blot analizi	172
Şekil 4.6. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde AMPK α 1/2 immünlokalizasyonu	173
Şekil 4.7. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172 immünlokalizasyonu	174

Şekil 4.8. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktör bulbusunda ULK1 ve p-ULK1 (Ser467)'nin Western blot analizi	176
Şekil 4.9. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde ULK1 immünlokalizasyonu	177
Şekil 4.10. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde p-ULK1 (Ser467) immünlokalizasyonu	178
Şekil 4.11. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktör bulbusunda mTOR ve p-mTOR (59.Ser2448)'nin Western blot analizi	180
Şekil 4.12. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde mTOR immünlokalizasyonu	181
Şekil 4.13. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde p-mTOR (59. Ser2448) immünlokalizasyonu	182
Şekil 4.14. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktör bulbusunda TSC2 ve p-TSC2 (Thr1462)'nin Western blot analizi.....	185
Şekil 4.15. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde TSC2 immünlokalizasyonu	186
Şekil 4.16. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde p-TSC2 (Thr1462) immünlokalizasyonu.....	187
Şekil 4.17. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktör bulbusunda Beclin 1 ve p62/SQSTM1'nin Western blot analizi.....	189

Şekil 4.18. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde Beclin 1 immünlokalizasyonu	190
Şekil 4.19. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde P62/SQSTM1 immünlokalizasyonu	191
Şekil 4.20. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktör bulbusunda MAPLC3 α/β ve MAP1LC3A'nın Western blot analizi	193
Şekil 4.21. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde MAPLC3 α/β immünlokalizasyonu	194
Şekil 4.22. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde MAP1LC3A immünlokalizasyonu.....	195

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiroid hormonları (TH'leri) tiroid bezinden salgılanan, tiroksin (tetraiyodotironin T4) ve 3,3',5-triiodo-L-tironin (T3) tirozin bazlı hormonlardır. Tiroid hormonları omurgalıların çeşitli organlarında ve dokularında hücrelerin normal büyüme ve gelişmeleri için gerekli olmalarının yanı sıra, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmalarının kritik düzenleyicileridirler. Tiroksin, tiroid bezinde folikül epitel hücrelerinin salgıladığı ana üründür ve periferik dokularda T4'ün dış halkasının deiyodinasyonu ile üretilen biyoaktif hormon olan T3'ün bir öncüsüdür (Mullur ve ark., 2014).

Tiroid bezinde üretildikten sonra hedef dokulara taşınan TH'lerinin bu dokulardaki fonksiyonları genomik (nüklear) ve non-genomik (nüklear olmayan) mekanizmalar ile düzenlenir. Tiroid hormonlarının çoğu etkisine genomik mekanizma aracılık eder. Genomik mekanizmada TH'lerinin etkilerini gerçekleştirebilmesi için, T3 çekirdeğe girmeli ve tiroid hormonuna duyarlı genlerin transkripsiyonunu düzenleyen spesifik tiroid hormon reseptörlerine (TR) bağlanmalıdır (Evans, 1988; Lazar ve Chin, 1990). Bu reseptörler THRA (TR α) ve THRB (TR β) genleri olarak kodlanır. Bu TR'lerin TR α 1 (Tiroid hormon reseptörü alfa1), α 2, α 3 ve β 1, β 2, β 3 olmak üzere farklı izoformları bulunur (Hodin ve ark., 1989; Williams, 2000). Bunlar TH sinyal yolağında farklı rollere sahiptirler (Cheng ve ark., 2010). Genomik olmayan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamakla birlikte, TH'lerinin çoğu işlevinde önemli yardımcı mekanizmalar olarak ortaya çıkarlar ve hücre membranında, sitoplazmada, hücre iskeletinde ve organellerde bulunurlar (Cheng ve ark., 2010; Wrutniak-Cabello, 2001). Tiroid hormonları genomik olmayan işlevlerini yerine getirirken serin-treonin kinaz (STK), fosfoinozid 3-kinaz (PI3K), protein kinaz B (Akt), adenosin monofosfat aracılığıyla aktive olan protein kinaz (AMPK) ve kalsiyumu içine alan farklı sinyal yollarını aktive etmek için hücre zarı reseptörleri ve sitosolik proteinlerle etkileşime girerler (Senese ve ark., 2014).

Memelilerde TH'leri erken embriyogenezden yetişkin beyindeki nörojeneze kadar tüm yaşam boyunca beyin gelişimi ve fonksiyonu için çok önemlidir. Tiroid hormon sinyali, nöron ve glial hücrelerin çoğalması, canlılıkları, göç, farklılaşma ve olgunlaşma dahil olmak üzere nörojenizin birçok aşamasını yönetir (Bernal ve ark., 2003). Her ne kadar tiroid hormonunun beyindeki etkileri, gelişim sürecinde en belirgin olsa da yetişkin kaynaklı hipotiroidizmde koku ve tat alma, görme ve duyma bozuklukları gibi duyuşal bozukluklar, düşünme ve eylem yavaşlığı, konuşma değişiklikleri, huzursuzluk, baş ağrısı, uyku bozuklukları, kafa karışıklığı, halüsinasyonlar, sanrılar, bellek bozuklukları gibi semptomlar sık sık görülür. Beyin gelişimi sırasında nöronal proliferasyon, göç, sinaptogenez ve miyelinleşme için TH'lerinin gerekli olduğu ortaya konduğu halde (Horn ve Heuer, 2010; Howdeshell, 2002), Tiroid hormonlarının koku alma sistemindeki fonksiyonu henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hipotiroidizm sırasındaki koku bozukluklarının prevalansı ile ilgili sadece birkaç araştırma yapılmıştır (Bhatia ve ark., 1991; McConnell ve ark., 1975) ve insanlarda hipotiroidizm sırasında görülen TH eksikliğinin koku alma duyusunun bozulmasına neden olduğu saptanmıştır (McConnell ve ark., 1975). Propiltiourasil (PTU) uygulanarak hipotiroidizm oluşturulan kemirgenlerde, davranışsal koku alma işlev bozukluğunun bulunduğu (Beard ve Mackay-Sim, 1987; Brosvic ve ark., 1996) ve olfaktör reseptör nöronları dahil olfaktör epitel hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Mackay-Sim ve Beard, 1987; Paternostro ve Meisami, 1991; Paternostro ve Meisami, 1996). Bugüne değin yapılan araştırmalar, dentat girus, hipokampus ve koku duyusu için önemli merkezi röleler olan olfaktör bulbusda T3 için nükleer TR'lerinin bulunduğunu (Dozin ve Nayer, 1984; Pymirat 1992) ve bu bölgelerdeki nörojenizin hipotiroidizmden olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir (Alvarez-Dolado ve ark., 2001; Calza ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2009). Bununla birlikte hipotiroidizmin olfaktör bulbusda hangi mekanizmaları etkileyerek nörojenizi inhibe ettiği bilinmemektedir. Hipotiroidizm sırasında gözlenen olası koku alma duyusu bozukluklarında TH'lerinin nongenomik etkilerine aracılık eden AMPK sinyalizasyonunun bozulup bozulmadığına, ayrıca distiroidi sırasında otofajinin çeşitli basamaklarını düzenleyen proteinlerin aktivasyonunun/inaktivasyonunun etkilenecek otofajinin aktive ve/veya inhibe edip etmediğine dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında PTU verilerek hipotiroidizm oluşturulan erişkin sıçan modelinde tiroid hormonu yoksunluğunun; (1) olfaktör bulbus dokusunda AMPK α 1, TSC2 (Tuberoussclerosiscomplex 2 veya tuberin), mTOR (Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi), ULK1 (Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1), BECLIN1 (PtdIns3K-CI kompleks proteini) ve p62 (sekestozom) gibi otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin ve otofagozom oluşumunda önemli rol oynayan LC3'ün (Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3) relatif miktarlarını değiştirip değiştirmediği; (2) eğer değiştiriyorsa bu değişimin otofajinin indüklenmesi veya inhibe olması yönünde olup olmadığının ve (3) bu bağlamda tiroid disfonksiyonuna özellikle de hipotiroidizme bağlı olarak şekillendiği bildirilen koku alma bozukluklarında otofaji ile ilişkili proteinlerin olası rolünün ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tiroid Bezi ve Tiroid Hormonları

Memelilerde tiroid bezi boyun bölgesinde larenksin yakınında yer alan, sağ ve sol olmak üzere iki lobdan oluşan ve bir ara yapı olan istmus ile birbirine bağlanan kelebek şeklindeki bir endokrin bezdir. Tiroid bezi dıştan bağ dokusundan oluşan ince bir fibro-elastik kapsül ile sarılmış olup, kapsülden ayrılan septumlar tiroid bezini düzensiz biçimdeki, farklı büyüklükteki lopçuklara ayırır. Bu lopçuklar, lümenleri "kolloid" adı verilen homojen jelatinimsi bir madde ile dolu çok sayıda küresel oluşum içerir. Tiroid bezinin yapısal ve fonksiyonel birimleri olan bu küresel oluşumlar "tiroid folikülleri" olarak adlandırılır. Tiroid folikülleri retikulum ipliklerinden, kapılar ve lenf damarlarından zengin bir bağ doku ağı içinde sıkıca bir arada tutulur. Folikül duvarına bitişik kapılar damarların endotel hücreleri pencere yapıdadır. Foliküller, erişkin hayvanlarda ovalimsi veya yuvarlak, genç hayvanlarda örneğin genç köpeklerde az ya da çok tübüler yapıda ya da dallanmıştır. Çapları 20-500 µm arasında değişen foliküllerin duvarını kolloid ile dolu lümen etrafında dizilen ve organın fonksiyon durumuna göre şekilleri yassıdan prizmatikçe kadar değişen tek katlı epitel hücreleri oluşturur. "Folikül epitel hücreleri" veya "tirositler" olarak adlandırılan bu hücreler embriyonal gelişim sürecinde ikinci embriyonal yaprak olan endodermden köken alırlar (Rykova ve ark., 2019). Ortalama aktivite sırasında normal bir folikül durumunda hücreler kübiktir ve lümendeki kolloid orta miktardadır. Foliküller dinlenme (inaktif) aşamasındayken, foliküler epitel hücreleri yassılaştırmıştır ve lümendeki kolloid bol miktardadır. Foliküller aktif olduğunda ise, foliküler hücreler yüksek prizmatiktir (Petrova ve ark., 2014). Bununla birlikte aynı tiroid dokusunda farklı hücrelerin farklı aktivite seviyeleri göstermesi de mümkündür (Shoyele ve ark., 2019). Epitelin yüksekliğinin yanı sıra folikül büyüklüğü de foliküler aktivitenin belirleyicisidir. Foliküler aktivite ile folikül çapı arasında ters bir ilişki vardır. Genel

olarak küçük foliküller yüksek prizmatik epitelle örtülüdür ve aktiftirler. Büyük foliküller ise yassı ya da kübik epitelle örtülüdür ve inaktiftirler (Liman, 2010).

Folikül epitel hücreleri lümene bakan yüzeyleri düzgün olmayan mikrovilluslar ile donatılmış, belirgin bir kutuplaşma gösteren asidofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Çekirdek hücrenin bazalinde yerleşirken, bol miktarda olduğu gözlenen granüler endoplazmik retikulum (ER), ribozom ve poliribozomlar, Golgi kompleksi, lizozomlar ve mitokondriyonlar sitoplazmanın her tarafına dağılmıştır. Bu hücrelerin sitoplazmalarında mikrotübüller ve mikrofilamanlar ile ayrıca iki tip vezikül bulunur: apikal ve endositotik veziküller. Hücrede apikal sitoplazmada yerleşen apikal veziküller Golgi kompleksinden köken alırlar. Tiroglobulin içeren bu veziküller ekzositozla folikül lümenine salgılanırlar. Diğer veziküller ise luminal yüzeyde bulunan büyük endositotik veziküllerdir. Bu veziküller membranla sarılı kolloid damlacıkları olarak adlandırılırlar ve lizozomlarla birleşerek fagolizozomları şekillendirirler (Liman, 2010).

Foliküler hücrelerin aktivitesi, hipofiz serebriden salgılanan tiroid uyarıcı hormon (TSH) aracılığıyla düzenlenir (Rajkovic ve ark., 2006; Takizawa ve ark., 1993). Foliküler hücrelerin görevi tiroid hormonlarını (TH) üretmek ve salgılamaktır. Kolloidin esasını glikoproteinden zengin tiroglobulin oluşturur (Khan ve Farhana, 2022). Tiroid hormonları tirozin bazlı hormonlar olup tiroksin ve tironin olarak adlandırılırlar. Tiroksin, folikül epitel hücrelerinin salgıladığı ana üründür ve periferik dokularda deiyodinasyon ile biyoaktif hormon olan T3'e dönüştürülür. Hedef dokulardaki T4 ve T3 konsantrasyonları metabolizma ile kontrol edilir (Mullur ve ark., 2014). Her iki hormon hedef hücreleri etkilese de T3, T4'ten daha aktiftir (Ibhazehiebo ve Koibuchi, 2012). Tiroid bezinde foliküller arasında gruplar halinde veya tiroid foliküllerinin duvarında foliküler hücreler ile bazal membranları arasında "parafoliküler hücreler" veya "C hücreleri" olarak adlandırılan hücreler de bulunur. Parafoliküler hücreler uzun süre, erken embriyoda nöral tüpten faringeyal aparatın branşiyal kemerlerine ventromedial olarak göç eden nöral krista hücrelerinden türeyen kalan birkaç nöroendokrin soydan biri olarak kabul edilmiştir (Le Douarin ve ark., 1974). Ancak farelerde yapılan son çalışmalar parafoliküler hücrelerin faringeyal endodermden türediğini ortaya koymuştur (Nilsson ve Williams, 2016).

Parafoliküler hücreler eksantrik yerleşmiş çekirdekleri olan, büyük, oval ve çok yüzlü, Hematoksilen-Eozin (HE) boyası ile soluk boyanan açık renkli hücrelerdir. Bu hücreler az miktarda ER, bol miktarda Golgi kompleksi ve mitokondriyon ile çok sayıda membranla çevrili elektron yoğun salgı granülleri içerir. Gümüşleme ile kahverengi veya siyah boyanan arjirofilik özellikteki bu hücreler bir polipeptid hormon olan “tirokalsitonin (kalsitonin) hormonunu” salgırlar (Felsenfeld ve Levine, 2015; McLaughlin ve Jialal, 2020). Bu hormonun salgılanması hipofiz serebriden bağımsızdır ve esas olarak serum kalsiyum düzeyine bağlıdır (Sexton ve ark., 1999). Kalsitonin hormonunun etkisi paratiroid bezi tarafından salgılanan paratiroid hormonununkine zıttır. Osteoklast aktivitesini inhibe ederek ve osteoblast aktivitesini uyarak kemik rezorpsiyonunu baskılar ve böylece kandaki kalsiyum seviyesini düşürür (Melmed ve ark., 2011). Parafoliküler hücrelerin ayrıca serotonin, somatostatin veya kalsitonin genine bağlı peptit (CGRP) gibi çeşitli nöroendokrin peptitleri daha küçük miktarlarda salgıladıkları bilinmektedir (Barasch ve ark., 1987; Bernd ve ark., 1981; Zabel, 1984). Bu hücreler tirotropin salgılatıcı hormonu (TRH) eksprese ettikleri için lokal olarak tiroid hormon üretimini düzenlemede de rol oynayabildikleri ileri sürülmektedir (Gkonos ve ark., 1989; Morillo-Bernal ve ark., 2009).

Tiroid hormonları omurgalıların çeşitli organlarında ve dokularında hücrelerin normal büyüme ve gelişmeleri için gerekli olmalarının yanısıra, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmalarının kritik düzenleyicileridir (Mullur ve ark., 2014). Tiroid hormonları, enerji depolaması ve harcamasını düzenleyerek enerji dengesini kontrol eden anahtar metabolik yolları etkiler (Cheng ve ark., 2010; Iwen ve ark., 2013; Liu ve Brent, 2010). Organizmanın tiroid hormon durumunun vücut ağırlığı ve enerji harcanması ile paralel olduğu bilinmektedir (Fox ve ark., 2008; Iwen ve ark., 2013; Knudsen ve ark., 2005). Tiroid hormonunun aşırı salgılanması (hipertiroidizm) artan dinlenme enerji harcaması, kilo kaybı, düşük kolesterol düzeyleri, artmış lipoliz ve glukoneogenez ile karakterize hipermetabolik bir durumdur (Brent, 2008; Motomura ve Brent, 1998). Tersine, TH yetersizliği (hipotiroidizm), azalmış dinlenme enerji harcaması, kilo alımı, artmış kolesterol seviyeleri, azalmış lipoliz ve glukoneogenez ile karakterize hipometabolik durumdur (Brent, 2012). Tiroid hormon düzeyleri hem lipogenezi hem

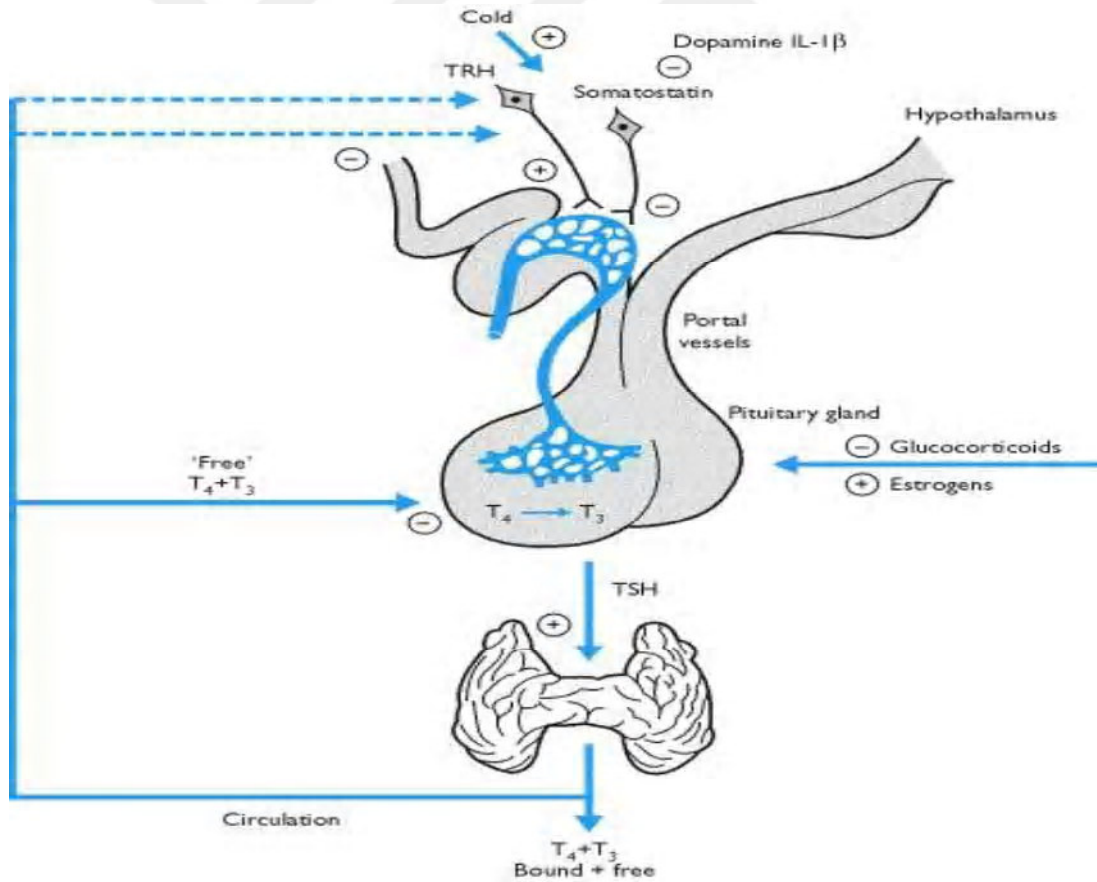
de lipolizi uyarır, ancak TH seviyeleri yükseldiğinde net etkisi yağ kaybıdır (Oppenheimer ve ark., 1991).

2.1.1. Tiroid Hormonlarının Biyosentezi ve Salgılanmasının Düzenlenmesi

Tiroid bezinde foliküler hücreler tarafından tiroid hormonu salgılanması esas olarak anterior (ön) hipofizdeki tirotrop hücrelerden salgılanan “tiroid uyarıcı hormon (TSH, tirotropin)” tarafından düzenlenir. Tiroid uyarıcı hormonun tirotroplardan sentezi ve salgılanması ise hipotalamus kökenli bir tripeptid olan “tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) (TSH salgılatıcı hormon veya Tirotropin salgılatıcı faktör -TRF- olarak da adlandırılır)” tarafından uyarılır. Daha büyük bir pro-hormondan ayrılan bu küçük peptid hipotalamustaki nörosekretuar hücrelerden hipotalamo-hipofizer portal kapillerlere salınır ve buradan da hipofizin tirotrop hücrelerine taşınır. Tiroid uyarıcı hormon salgılanması diğer hormonlar (somatostatin ve dopamin dahil) ve sitokinler, özellikle de IL-1 β (İnterkökin-1beta), IL-6 (İnterkökin-6) ve TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü alfa) tarafından inhibe edilir. Tiroid uyarıcı hormon tirotrop hücrelerden salgılandıktan sonra tiroid bezindeki folikül epitel hücrelerinin membranlarında bulunan TSH reseptörlerine (tirotropin reseptörü, TSHR) bağlanarak tiroid bezini T4 ve T3 hormonlarını sentezleyip salgılaması için uyarır. Tirotropin reseptörü, integral membran proteinlerinin G proteinine bağlı reseptör süper ailesinin bir üyesidir (Farid ve Szkudlinski, 2004) ve adenililsiklazı aktive ederek siklik adenozin monofosfat (cAMP) bağımlı yolu uyanan heterotrimerik G proteinini Gs'ye (Adenilat siklaz kontrolünde uyarıcı G proteini) bağlanır (Calebiro ve ark., 2010). Tiroid uyarıcı hormonunun reseptörüne bağlanması, iyot (I) döngüleriyle ilişkili G proteinlerini aktive eder. Bu, $\alpha\beta\gamma$ G-protein (Alfa beta gama G proteini) heterotrimerine bağlı GDP'nin (Guanin di fosfat) GTP (Guanin tri fosfat) ile yer değiştirmesini içerir. Daha sonra α alt birimi kompleksten ayrılır ve hücre içi enzimleri aktive eder. Tiroid uyarıcı hormon reseptörüne bağlanan G proteinleri, Gs ve Gq, sırasıyla adenilatsiklaz ve fosfolipaz C'yi aktive eder. Adenilat siklaz proteini Adenozin trifosfat (ATP)'nin cAMP'ye dönüşümünü uyarır ve bu da protein kinaz A'yı (PKA) fosforile eder ve aktifleştirir. Fosfolipaz C, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatın (PIP2) inositol 1, 4, 5-trisfosfat (IP3) ve diaçilgliserole (DAG) hidrolizini uyarır. İnositol trifosfat geçici olarak hücre içi Ca²⁺ (Kalsiyum iyonu) konsantrasyonunu artırırken, diaçilgliserol

protein kinaz C'yi aktive eder. Bu kinazlar, sonunda tiroid hormonu sentezi ve salınımı ile tiroid büyümesine dahil olan çeşitli süreçleri uyaran başka sinyal iletim mekanizmalarını aktive eder. Bunlar 'I' alımını, hidrojen peroksit ve tiroid peroksidaz (TPO) üretimini ve kolloid damlacıklarının alımını içerir (Calebiro ve ark., 2010).

Tiroid hormonlarının dolaşımdaki konsantrasyonu da hipotalamo-hipofiz eksenini içeren homeostatik bir geri bildirim döngüsü ile düzenlenir (Şekil 2.1.). Tiroid hormonlarının ana etkisi, hipotalamustan TRH salgılanma oranını değiştirmekten ziyade hipofiz tirotroflarının TRH'ye verdiği yanıtı azaltmaktır. Tirotrofların TRH'ye duyarlılığı hücre içi T3 konsantrasyonlarına bağlıdır. Bu T3'ün %80'i, T4'ün T3'e intrapituiter dönüşümünden elde edilir. Dolaşımdaki T4 konsantrasyonları düşük olduğunda, TRH reseptörlerinin sayısında ve TSH sentezinde bir artış olur ve bu da TRH'ye verilen TSH yanıtının artmasına neden olur. Dolaşımdaki yüksek tiroid hormonu konsantrasyonlarının varlığında ise bunun tersi geçerlidir.



Şekil 2.1. Tiroid bezi aktivitesinin kontrolü. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28/bin/ch3fb11.jpg>, Erişim Tarihi: 24 Haziran 2022).

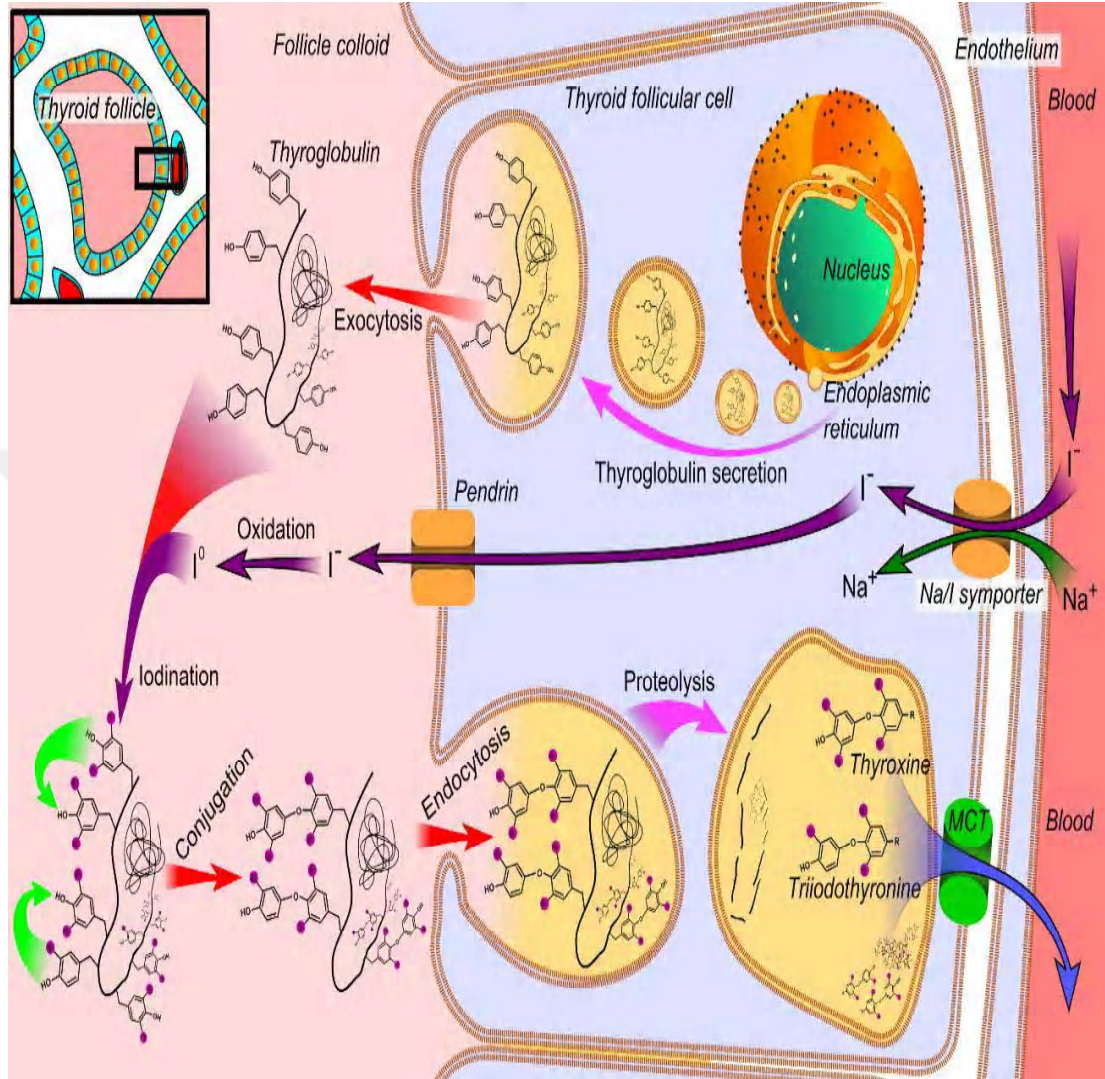
Bu düzenleyici döngü, TSH'nin salgılanma hızını değiştiren iç ve dış faktörlerden etkilenir. Tiroid uyarıcı hormon pulsatil bir şekilde salgılanır ve gece yarısı civarında zirve yaparak günlük bir değişim gösterir. Çevresel sıcaklık, TRH salgılanmasını ayarlayarak TSH salınımını uyarabilir veya engelleyebilir. Bu nedenle, 24 saat soğuk bir ortama maruz kaldıktan sonra, tiroid hormonlarının plazma konsantrasyonları, bazal metabolizma hızındaki artış ve vücut ısısının endojen üretiminde bir artış ile yükselir (Şekil 2.1.). Bu etki sıçanlarda insanlara göre daha belirgindir. Östrojenler ve kortikosteroidler gibi bir dizi ek endokrin aracı da T3 ve T4 biyosentezinin düzenlenmesinde rol oynar. Glikokortikoidler, TRH'ye TSH salgılama yanıtını azaltarak tiroid hormon salgılarını inhibe eder. Buna karşılık östrojenler, TSH salgısını ve dolayısıyla tiroid bezinin aktivitesini artırarak tam tersi bir etki gösterirler. Bu ana düzenlemenin yanı sıra, tiroid fonksiyonu ve büyümesi tiroid bezinde salgılanan peptitlerin etkisi altındadır. Bu peptidler arasında sinir sonları tarafından salınan vazointestinal peptid (VIP) veya nöropeptid Y (Ahrén B, 1989), foliküler hücreler tarafından salgılanan insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) (Eggo ve ark., 2003) ve C hücrelerinin salgıladığı bazı yerel faktörler (Ahrén B, 1991) bulunur.

Tiroid hormonu sentezi süreci oldukça karmaşıktır. Tiroid hormonları tirozin amino asidinden sentezlenir. Tiroid hormonlarının sentezi için çok miktarlarda “iyod”, tiroid foliküler hücrelerinde iyodürü (I-) hücrelere taşıyan “sodyum iyodür simporter (NIS)” ve iyodürü iyodinyuma (I+) oksitleyerek tiroglobulini (Tg) iyodinleştiren “tiroperoksidaz (TPO)” gibi çeşitli moleküller gerekir. Foliküler hücrelerin bazal hücre membranında Na⁺/K⁺-ATPaz tarafından oluşturulan sodyum gradyanı, NIS'nin iki sodyum iyonunu bir I⁻'le birlikte tiroid foliküler hücrelerine aktif olarak taşımasını sağlar. Foliküler hücrenin içine girdikten sonra iyodür, hidrojen peroksit tarafından aktif iyoda oksitlenir. Bu reaksiyon, hem-içeren TPO tarafından katalize edilir. İyot daha sonra bazal yüzeyde meydana gelen aynı aktif süreçle foliküler hücrenin apikal yüzeyi boyunca aktif olarak taşınır. Apikal-kolloid arayüzde ‘I’ hemen büyük glikoprotein tiroglobulin moleküllerinin tirozin kalıntılarına dahil edilir. Tiroglobulin foliküler hücrelerde sentezlenir ve tiroglobulin formuna bağlı olarak yaklaşık 140 tirozin kalıntısı ile yaklaşık 650.000 dalton moleküler ağırlığa sahiptir. Bu kalıntıların yaklaşık dörtte biri iyotlanabilir. İyotlandıktan sonra tiroglobulin folikülün kolloidine alınır ve burada hala proteine dahil olarak iyotlanmış tirozin molekül çiftleri arasında

bir bağlanma reaksiyonu meydana gelir. Her biri iki pozisyonda iyotlanmış iki tirozin kalıntısının (di-iyodotirozin, DIT) birleşmesi tetra-iyodotironin veya tiroksin (T4) üretirken, DIT'nin mono-iyodotirozin (MIT) ile birleşmesi tri-iyodotironin (T3) üretir (Şekil 2.2.). Bu tür bir birleşme tek bir tiroglobulin molekülü içinde veya proteinin dimerize molekülleri arasında meydana gelebilir. Bu birleşme TPO tarafından katalize edilir. Tiroid hormonları bu durumda depolanır ve yalnızca tiroglobulin molekülü foliküler hücrelere geri alındığında salınır. TSH tarafından uyarılan tiroglobulin damlacıkları pinositoz ile foliküler hücrelere alınır. Damlacıkların lizozomlarla füzyonu tiroglobulin moleküllerinin hidrolizi ve T4 ve T3 salınımı ile sonuçlanır. Tiroksinin (T4) yaklaşık %10'u salgılanmadan önce mono-deiyodinasyona uğrar ve T3'e dönüştürülür; salınan 'I' tekrar kullanılır. Bezden her gün yaklaşık 100 µg tiroid hormonu salgılanır ve bu hormonların çoğu T4, yaklaşık %10'u ise T3 şeklindedir. Tiroksinin (T4) %80'i karaciğer ve böbrekte daha aktif olan T3'e (T3, T4'ten on kat daha aktiftir) veya biyolojik aktivitesi çok az olan veya hiç olmayan ters T3'e (reverseT3, rT3) periferik dönüşüm geçirir. MIT ve DIT gibi diğer iyotlu moleküllerin yanı sıra tiroglobulin de dolaşımda çok küçük miktarlarda ölçülebilir (Walter ve Boulpaep, 2003).

Tiroid hormonları hidrofobik amin hormonlardır ve 'I' atomlarının sayısına göre değişiklik gösteren iki temel alt tipten oluşurlar. Bunlardan T3 ve rT3, 'I' atomuna, T4 ise 4 'I' atomuna sahiptir. Periferik dokularda fonksiyonel olarak T3 en aktif iken, T4 sınırlı aktiviteye sahiptir. Reverse T3 ise inaktif formdur. Tiroid hormonları suda az çözünen lipofilik özellikteki hormonlar olup plazmalemi kolaylıkla geçebilir. Kanda dolaşan tiroid hormonunun %99,8'inden fazlası üç plazma proteinine [tiroksin bağlayıcı globülin (TBG), transtiretin (TTR) ve serum albümine] sıkıca bağlanır. Bunlardan TBG niceliksel olarak en önemlisidir ve toplam proteine bağlı hormonun (hem T4 hem de T3) %70'inden fazlasını oluşturur. Dolaşımdaki T4'ün yaklaşık %10-15'i ve dolaşımdaki T3'ün %10'u TTR'ye bağlanır ve neredeyse eşit miktarlarda albümine bağlanırlar. Tiroksin bağlayıcı globulin, plazmadaki konsantrasyonu TTR'nin yalnızca %6'sı ve albüminin %0,1'inden az olmasına rağmen hormonun büyük kısmını taşır. Çünkü hem T4 hem de T3'e olan affinitesi diğer proteinlerinkinden çok daha yüksektir. Her üç tiroid hormonu bağlayıcı protein de T4'ü T3'ten en az 10 kat daha etkin bir şekilde bağlar. Böylece serbest yani bağlanmamış

T3 ve T4 konsantrasyonları neredeyse eşit olur (Nussey ve Whitehead, 2001). Transtiretin beyin omurilik sıvısında T4'ün birincil taşıyıcısıdır (Palha, 2002).



Şekil 2.2. Tiroid hormonu sentezi (Häggström, 2014). Tiroid hormonu sentezi şu adımları içerir: (1) tiroglobulinin granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenmesi ve ekzositozla tiroid folikülünün lümenindeki kolloide verilmesi; (2) bilinmeyen mekanizmalarla endoteli geçen iyodürün (I⁻) folikül hücreleri tarafından aktif transport ile alınması (tiroid hormonu sentezindeki ilk önemli adım olan iyodürün foliküler hücelere aktif olarak taşınmasına, sodyum iyodür simporter (NIS) aracılık eder); (3) iyodürün hücrelerin apikal sitoplazmasına difüzyonu; (4) iyodürün kolloid içine taşınması (iyodür tirozitlerin apikal membranında bulunan hidrofobik bir membran proteini olan pendrin aracılığıyla taşınır); (5) kolloid içindeki inorganik iyodürün tiroid peroksidaz (TPO) ile iyoda (IO) oksidasyonu ve iyodun kolloid içindeki tiroglobulin molekülleri içindeki tirozin kalıntılarına dahil edilmesi (konjugasyon); (6) tetraiyodotironin (T4) oluşturmak için iki di-iyodotirozin (DIT) molekülünün veya T3 oluşturmak için mono-iyodotirozin (MIT)'nin DIT ile birleşmesi; (7) tiroglobulinin kolloidden endositoz yoluyla foliküler hücreye alınması, tiroglobulinin bir lizozomla birleşmesi ve proteoliz ile T4, T3, DIT ve MIT'nin salınması; (8) T4 ve T3'ün dolaşıma salınması; ve (9) tirozin elde etmek için DIT ve MIT'nin deiyodinasyonu. T3 ayrıca tiroidde ve periferik dokularda T4'ün monodeiyodinasyonu yoluyla da oluşur (Walter ve Boulpaep, 2003).

2.1.2. Tiroid Hormonlarının Etki Mekanizmaları

Hücrel büyüme, embriyonik gelişim, farklılaşma, metabolizma ve proliferasyon dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçler, TH'lerin genomik ve nongenomik etkileri ile modüle edilir. Genomik sinyal yolu gen transkripsiyonu ve translasyonunu doğrudan etkilerken, genomik olmayan yol daha hızlı hücrel değişiklikleri içerir ve bunların bazıları daha dolaylı sinyal yoluyla gen ifadesini de düzenler (Moeller ve Broecker-Preuss 2011). Tiroid hormonlarının genomik etkilerine T3 için tercihli bir afiniteye sahip olan tiroid hormonu reseptörü α (THRA) ve tiroid hormonu reseptörü β (THRB) genleri tarafından kodlanan tiroid hormonu reseptörleri (TR veya THR'ler) aracılık eder (Evans, 1988; Lazar ve Chin, 1990; Marsili ve ark., 2011). Tiroid hormon reseptörleri nüklear reseptör süper ailesine aittir. Nüklear reseptör ailesi içinde ayrıca östrojen reseptörü, D vitamini reseptörü, peroksizom proliferatörle aktive olan reseptörler (PPAR'ler), retinoik asit reseptörü (RAR) ve retinoid X reseptörünü (RXR) yer alır (Cheng ve ark., 2010; Phan ve ark., 2010). Tiroid hormon reseptörleri, tüm steroid hormon reseptörleri gibi, diğer transkripsiyon faktörleriyle birlikte hedef hücrelerde genlerin promotör bölgelerinde bulunan hormon yanıt elementlerine (HRE'ler) bağlanarak gen ekspresyonunu düzenlerler ve bir DNA (Deoksiribo nükleik asit) bağlama alanı ile COOH-terminal alanı bulundurlar (Brent, 2011). Bu reseptörlerin TH sinyal yolağında farklı rollere sahip olan TR α 1, α 2, α 3 ve β 1, β 2, β 3 olmak üzere farklı izoformları bulunur (Cheng ve ark., 2010). Tiroid hormon reseptörü alfa 1, kalp, kemik ve iskelet kasında yüksek oranda ifade edilirken, TR α 2 tüm vücutta yaygın olarak ifade edilir. Tiroid hormon reseptörü beta 1 (TR β 1) ağırlıklı olarak beyin, karaciğer ve böbrekte ifade edilirken, TR β 2 hipofiz, retina ve kokleada bulunur. TR α 1, TR β 1 ve TR β 2, T3'ü benzer afinite ile bağlar (Singh ve Yen, 2017).

Tiroid hormonunun nongenomik etkileri plazma membranı, mitokondri veya sitoplazmadaki reseptörlerde başlar (Cheng ve ark., 2010; Wrutniak-Cabello ve ark., 2001). Mitokondrial TR, sitoplazmik TR (TR β 1, TR α 1 gibi) veya plazma membran reseptörleri (integrin α V β 3, integrin α V β 3) buna aracılık yapar (Cheng ve ark., 2010; Davis ve ark., 2021; Hammes, 2015; Wrutniak, 1998). Tiroid hormonları genomik olmayan işlevlerini yerine getirirken serin-treonin kinaz, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), protein kinaz B (Akt), adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz

(AMPK) ve kalsiyum gibi ikincil habercilerin aracılık ettiği sinyal iletim yollarını aktive etmek için bu sitosolik proteinlerle de etkileşime girerler (Segal, 1990; Senese ve ark., 2014; Shih ve ark., 2004).

Tiroid hormonlarının aktivasyonu veya inaktivasyonu hem biyolojik olarak aktif T3'ün dolaşımdaki seviyelerini koruyan hem de TH homeostazını hücre ve zamana bağlı bir şekilde yerel düzeyde düzenleyen “iyodotironin deiyodinaz (DIO)” aktivitesi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Deiyodinazlar TH sinyalinin işlevsel çeşitlendirilmesinde çok önemli bir rol oynarlar. Gelişim, büyüme ve metabolik süreçlerde yer alırlar ve TH homeostazının düzenlenmesinde hücreye özgü bir şekilde hareket ederler. Deiyodinazlar, hücrelere giren TH molekülünün dış veya iç halkasındaki bir ‘I’ atomunun çıkarılması yoluyla TH'lerin aktivasyonunu ve inaktivasyonunu katalize ederler. Neredeyse tüm organ ve dokularda ifade edilirler ve bir deiyodinaz genellikle TH'nin hücre içindeki kaderini belirleyen ilk veya son aktördür (Sabatino ve ark., 2021). Memelilerde üç farklı deiyodinaz tanımlanmıştır: DIO1, DIO2 ve DIO3. Bu enzimler, farklı genlerin ürünleri olmalarına ve spesifik substrat afiniteleri ile fizyolojik rollere sahip olmalarına rağmen önemli benzerlikleri paylaşırlar (Gereben ve ark., 2008a; Gereben ve ark., 2008b). Üç deiyodinaz, yaklaşık 60 kDa'lık dimerik integral membran proteinleridir. Aktif merkezdeki modifiye amino asit selenosistein (SeCys) ile karakterize edilirler, bu da enzime katalitik aktivite sağlar; çünkü fizyolojik pH'da SeCys iyonize olur ve çok etkili bir elektron donörü olarak hareket ederek deiyodinasyon reaksiyonunu mümkün kılar (Gereben ve ark., 2008a; Gereben ve ark., 2008b). Katalitik merkez, disülfid bağlarının aracılık ettiği dimerizasyon için önemli olan bir kor dizisi içerir (Callebaut ve ark., 2003). Homodimerizasyon, deiyodinaz monomerleri arasında en sık görülen etkileşim şekli olmaya devam etmektedir. Ancak, canlı izole hücrelerde belirsiz nedenlerden dolayı belirli bir düzeyde DIO3:DIO1 ve DIO3:DIO2 heterodimerizasyonu gözlenmiştir (Curcio-Morelli ve ark., 2003; Sagar ve ark., 2008). Deiyodinazların hücredeki yerleşimleri farklılık gösterir. Deiyodinaz 1 ve DIO3 plazma membranında bulunurken, DIO2 endoplazmik retikulumda bulunur ve bu da onu çekirdeğe çok yakın hale getirir. Deiyodinaz 1 ve DIO2'nin katalitik globüler alanları sitozole bakarken, katalitik alan da dahil olmak üzere DIO3 molekülleri çoğunlukla ekstrasellüler boşluğa doğru çıkıntı yapar. Deiyodinaz 3 endozom vezikülleri aracılığıyla hızla hücre içine

alınır ve hücre membranına geri kazandırılır (Baqui ve ark., 2000; Baqui ve ark., 2003).

Deiyodinasyon TH'lerin aktivasyon/inaktivasyon sürecindeki ilk adımdır ve yaklaşık 12 saatlik bir yarılanma ömrüne sahip aktif form T3'ü üretmek için T4'ün dış tirozil halkasından bir 'I' atomunun çıkarılmasını içerir (oysa T4'ün yarılanma ömrü yaklaşık 8 saattir). Deiyodinaz 1 ve DIO2, T4'ün dış halka deiyodinasyonunu ve aktif hormon T3'e dönüşümünü katalize ederek aktivasyonu teşvik eder (Bianco ve da Conceição 2018). Dolaşımdaki T3'ün çoğunluğu, esas olarak tiroidte ve aynı zamanda karaciğer ve böbrekte meydana gelen DIO1 aktivitesi ile T4 deiyodinasyonundan kaynaklanır; tipik olarak, diğer dokularda varlığı değerlendirilmez (veya ilgisiz olarak kabul edilir). Buna karşılık, DIO2 hücrelerin içinde T3'ün yerel üretiminden birincil olarak sorumlu kabul edilir ve hipofiz bezi ile hipotalamus (Christoffolete ve ark., 2006; Larsen, 1982), kohlea (Campos-Barros ve ark., 2000), kahverengi yağ dokusu (de Jesus ve ark., 2001), kemikler (Bassett ve ark., 2010), kaslar (Marsili ve ark., 2011), kalp (Bianco ve Silva, 1988) ve merkezi sinir sistemi (Freitas ve ark., 2010) organlarında varlığı tespit edilmiştir. Deiyodinaz 1 tarafından üretilen T3 ile DIO2 tarafından üretilen T3 arasındaki ayrımın altında yatan detaylar hala tam olarak bilinmese de DIO1 tarafından üretilen T3'ün yaklaşık 30 dakika içinde plazma ile hızla dengelendiği, DIO2 tarafından üretilen T3'ün ise hücrede daha uzun süre kaldığı açıktır (Hernandez ve ark., 2002). Deiyodinaz 2 böbrekte ve karaciğerde prohormon olan T4'ün deiyodinasyon ile biyoaktif T3'e dönüştürülmesinde rol oynar. Deiyodinaz 1 tirozil ve fenolik halkanın ikisinin deiyodinasyonunu katalizler ve karaciğer, tiroid ve böbreklerde ifade edilir. Deiyodinaz 2 ise sadece fenolik halkanın deiyodinasyonunu katalizler ve merkezi sinir sistemi (MSS), tiroid, iskelet kası ve kahverengi yağ dokusunda ifade edilir (Bianco ve Conceição, 2018). Bununla birlikte, DIO3 hem aktif hormon T3'ü hem de prohormon T4'ü tirozil halkasının deiyodinasyonu yoluyla inaktif metabolitler olan 3,3'-diiodotironin (T2) ve 3,3', 5'-Tri-iyodotironin (ters T3 veya rT3)'e dönüştürerek biyolojik olarak inaktif hale getirilebilir (Bianco ve ark., 2002; Dentice ve Salvatore, 2011; Kuiper ve ark., 2005). Dolayısıyla, DIO1 ve DIO2 tiroid hormonlarını aktive ederken, DIO3 tiroid hormonları aktivitesinin fizyolojik bir sonlandırıcısıdır (Huang, 2005). Deiyodinaz 3 embriyonik dönemde ve gelişmekte olan dokularda ana deiyodinazdır ve gelişmekte

olan dokuları aşırı TH üretiminden korur. Yetişkinlikte, DIO3 esas olarak merkezi sinir sisteminde (Kaplan ve Yaskoski, 1980) ve deride (Huang ve ark., 1985) bulunurken, fizyolojik koşullar altında çoğu erişkin dokular çok az DIO3 ifadesi (ekspresyonu) gösterir veya hiç göstermez. Deiyodinaz 3'ün plasenta ve gebe uterusunda yüksek oranda eksprese edilmesi, bu enzimin gelişim sürecinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Huang ve ark., 2003).

2.1.3. Tiroid Bezi Fonksiyon Bozuklukları

Tiroid bezinin gereğinden az ya da fazla TH üretmesi tiroid bezi hastalığı olarak tanımlanır. Hipotiroidizm TH yetersizliği durumundaki, hipertiroidizm ise tiroid bezinden yüksek miktarda TH sentezlenip salgılandığı durumdaki patolojik bozukluktur (Chaker, 2017).

2.1.3.1. Hipotiroidizm

Hipotiroidizm primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve subklinik hipotiroidizm olmak üzere farklı şekillerde ortaya çıkar.

Primer hipotiroidizm'de tiroid bezi normal bir şekilde uyarılır, ancak yeterli TH üretemez. Hipofiz bezi tiroidin daha fazla T3 ve T4 üretmesini sağlamak için daha fazla TSH üretir. Primer hipotiroidizmde, hipofizin feedback inhibisyonunda azalma vardır ve serum TSH düzeyi her zaman yüksek iken serum serbest T4 düzeyi düşüktür. Primer hipotiroidizimli birçok hastada dolaşımdaki T3 seviyeleri normaldir, bunun nedeni muhtemelen sürekli TSH uyarımı sonucu yetersiz tiroidin biyolojik olarak aktif T3'ü tercihli sentezi ve salgılamasıdır. Primer hipotiroidizmin en yaygın nedeni Hashimoto tiroiditidir (tiroid bezinin iltihaplanmasıdır). Bu, bağışıklık sisteminin yanlışlıkla tiroid bezine saldırmasına neden olan otoimmün bir hastalıktır. Bunun yanı sıra tiroid kanseri ve hipertiroidizm tedavisi için radyoaktif 'I' uygulanması veya tiroid bezinin bir kısmının ya da tamamının cerrahi olarak çıkarılması hipotiroidizme neden olabilir (Braunstein, 2022). Ayrıca diyetle yetersiz 'I' alımı, konjenital hastalık, bazı ilaçlar ve viral tiroidit de primer hipotiroidizme neden olabilir. İyot eksikliği endemik guatr ve guatröz hipotiroidiye neden olabilir. Hashimoto tiroiditinin neden olmadığı guatrı olan hastaların çoğu ötiroiddir veya hipertiroiddir. İyot eksikliği TH'lerin sentezini azaltır. Buna yanıt olarak TSH salgılanır, bu da tiroidin büyümesine

ve iyodu tutmasına neden olur; böylece guatr ortaya çıkar. İyot eksikliği şiddetli ise hipotiroidi şekillenir. İyot eksikliği konjenital hipotiroidizme neden olabilir. Dünya çapında ciddi 'I' eksikliği olan bölgelerde, konjenital hipotiroidizm (önceden endemik kretinizm olarak adlandırılırdı) zihinsel engelliliğin önemli bir nedenidir. Nadir görülen kalıtsal enzimatik kusurlar tiroid hormonu sentezini değiştirebilir ve guatr hipotiroidisine neden olabilir. Lityum alan hastalarda, belki de lityum tiroid tarafından hormon salınımını engellediği için hipotiroidi görülebilir. Hipotiroidizm ayrıca amiodaron veya diğer 'I' içeren ilaçlar alan hastalarda, interferon-alfa alan hastalarda ve kanser için kontrol noktası inhibitörleri veya bazı tirozin kinaz inhibitörleri alan hastalarda da ortaya çıkabilir. Hipotiroidizm, gırtlak kanseri veya Hodgkin lenfomanın radyasyon tedavisinden de kaynaklanabilir. Radyasyon tedavisinden sonra kalıcı hipotiroidi insidansı yüksektir (Braunstein, 2022).

Sekonder hipotiroidizm hipotalamus yetersiz TRH ürettiğinde veya hipofiz yetersiz TSH ürettiğinde ortaya çıkar. Sekonder hipotiroidizmde serbest T4 ve serum TSH düzeyleri düşüktür (bazen TSH normaldir ancak biyoaktivitesi azalmıştır) (Braunstein, 2022). Bazen, yetersiz TRH salgılanmasına bağlı olarak yetersiz TSH salgılanması **tersiyer hipotiroidizm** olarak adlandırılır.

Subklinik hipotiroidizm, hipotiroidizm semptomları olmayan veya minimal düzeyde olan ve serum serbest T4 seviyeleri normal olan hastalarda serum TSH'nin yükselmesidir. Subklinik tiroid disfonksiyonu nispeten yaygındır; yaşlı kadınların yaklaşık %15'inde ve yaşlı erkeklerin %10'unda, özellikle de Hashimoto tiroiditi olan bireylerde görülür.

Hipotiroidizm belirtileri bireylere göre büyük farklılıklar gösterir. Belirtiler tipik olarak yavaş gelişir ve hastalığın ciddiyetine bağlıdır. En sık görülen belirtiler, özellikle periorbital olmak üzere sıvı retansiyonu ve şişkinlik, yorgunluk, soğuğa karşı hassasiyet ve zihinsel bulanıklıktır (Carlé ve ark., 2015). Çeşitli organ sistemleri, aşağıdakiler de dahil olmak üzere birçok olası belirti ve semptomla etkilenebilir (Braunstein, 2022):

- a. Metabolik belirtiler: Soğuk intoleransı, sıvı retansiyonu ve metabolizmanın azalması nedeniyle kilo alımı, hipotermi.

- b. Nörolojik belirtiler: Unutkanlık, el ve ayaklarda parestezi (genellikle el ve ayak bileği çevresindeki bağlarda proteinden zengin matriksin birikmesi sonucu oluşan karpal tünel sendromu nedeniyle şekillenir), derin tendon reflekslerinin gevşeme fazında yavaşlama.
- c. Psikiyatrik belirtiler: Kişilik değişiklikleri, depresyon, donuk yüz ifadesi, bunama veya açık psikoz (miks ödem deliliği).
- d. Dermatolojik belirtiler: Yüzde şişkinlik, miksödem, seyrek, kaba ve kuru saçlar, kaba, kuru, pullu ve kalın deri, özellikle avuç içi ve ayak tabanlarında belirgin olan karotenemi (karotenin lipidten zengin epidermal tabakalarda birikmesinden kaynaklanır), dilde proteinden zengin matriksin birikmesine bağlı makroglossi.
- e. Oküler belirtiler: Hiyaluronik asit ve kondroitin sülfatın infiltrasyona bağlı periorbital şişlik, göz kapaklarında düşüklük.
- f. Gastrointestinal belirtiler: Kabızlık.
- g. Jinekolojik belirtiler: Menoraji veya sekonder amenore.
- h. Kardiyovasküler belirtiler: Yavaş kalp hızı (hem tiroid hormonunda hem de adrenerjik stimülasyon da azalma bradikardiye neden olur), kalp büyümesi (kısmen dilatasyon nedeniyle, ancak esas olarak perikardiyal efüzyon nedeniyle şekillenir).
- i. Diğer belirtiler: Plöyral veya abdominal füzyonlar (plöyral füzyonlar yavaş gelişir ve nadiren solunum veya hemodinamik sıkıntıya neden olur), boğuk ses ve yavaş konuşma (Braunstein, 2022).

Sekonder hipotiroidizm yaygın olmamakla birlikte, genellikle hipotalamus-hipofiz eksenini tarafından kontrol edilen diğer endokrin organları etkiler. Hipotiroidili kadınlarda, sekonder hipotiroidizm belirtileri menorajiden çok amenore öyküsü ile karakterizedir. Sekonder hipotiroidizm, kuru ama çok kaba olmayan cilt ve saç, cilt depigmentasyonu, yalnızca minimal makroglossi, atrofik göğüsler ve düşük tansiyon ile karakterizedir. Ayrıca kalp küçüktür ve seröz perikardiyal füzyonlar oluşmaz. Hipoglisemi, eşlik eden adrenal yetmezlik veya büyüme hormonu eksikliği nedeniyle yaygındır. Her iki tip hipotiroidizmde anemi mevcuttur, genellikle normositik-normokromiktir ve etiyojisi bilinmemektedir, ancak menoraji nedeniyle hipokromik olabilir ve bazen pernisiyöz anemi veya folat emiliminin azalması nedeniyle

makrositer olabilir. Anemi nadiren şiddetlidir (hemogloblin genellikle > 9 g/dL [> 90 g/L]). Hipometabolik durum düzeltildikçe anemi azalır ve bazen 6-9 ay sürer. Serum kolesterolü primer hipotiroidizmde sekonder hipotiroidizme göre daha yüksektir (Braunstein, 2022).

Hipotiroidizm tedavisi için sentetik T4 (levotiroksin, LT4), T3 (liotironin) preparatları, 2 sentetik hormonun kombinasyonları ve kurutulmuş hayvan tiroid ekstresi dahil olmak üzere çeşitli tiroid hormonu preparatları kullanılır.

Levotiroksin (LT4): Hipotiroidizmin levotiroksin (LT4) ile tedavisinin temeli, insanların T4'ü T3'e aktive etmesidir. Dolayısıyla, LT4 dozları serum TSH değerini normalleştirirken vücudun T3 rezervuarını da geri kazandırmalıdır. Hipotiroidi semptomlarını gidermedeki etkinliği, yararları konusunda uzun süreli deneyim, olumlu yan etki profili, uygulama kolaylığı, iyi bağırsak emilimi, uzun serum yarı ömrü ve düşük maliyeti nedeniyle hipotiroidi tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir preparattır. Levotiroksin, TSH seviyeleri orta normal aralıkta olana kadar uygulanır. Primer hipotiroidizmde LT4 replasmanının amacı, ötiroidizm durumuna ulaşmak ve dolaşımdaki TSH ve tiroid hormon düzeylerini normalleştirmektir (Mandel ve ark., 1993; Singer ve ark., 1995). Ötiroidizm durumu, tiroid hormon etki indekslerinin normalleşmesi ve hipotiroidizm ile ilişkili semptomların ve klinik bulguların yokluğu veya gerilemesi olarak tanımlanır. Tiroid uyarıcı hormon düzeyi replasman tedavisinin yeterliliğinin en güvenilir belirtecidir ve referans aralığındaki bir değer (0.4-4.0 mIU/L) terapötik hedef olarak kabul edilmelidir. Levotiroksinin olağan idame dozu yaşa, vücut kitle indeksine ve emilime bağlı olup 75-150 µg olarak günde bir kez ağızdan uygulanır. Bununla birlikte genç veya orta yaşlı hastalarda başlangıç dozu günde bir kez oral yoldan 100 µg veya 1.7 µg/kg olabilir. Kalp hastalığı olan hastalarda tedaviye düşük dozlarla, genellikle günde bir kez 25 µg ile başlanır. İdame doza ulaşılan kadar doz her 6 haftada bir ayarlanır. Hamile kadınlarda idame dozunun artırılması gerekebilir. Tiroksin emilimini azaltan veya metabolik klerensini artıran ilaçların birlikte uygulanması durumunda da dozun artırılması gerekebilir. Kullanılan doz, serum TSH düzeylerini orta normal aralığa geri getiren en düşük doz olmalıdır (ancak bu kriter sekonder hipotiroidi hastalarında kullanılamaz). Sekonder hipotiroidizmde LT4 dozu, serbest T4 seviyesini orta normal aralıkta tutmalıdır (Jonklaas ve ark., 2014). Bu hastalarda, yeterli kortizol salgılandığına dair kanıt olana

kadar (veya kortizol tedavisi verilene kadar) LT4 verilmemelidir, çünkü levotiroksin adrenal krizi tetikleyebilir (Jonklaas ve ark., 2014).

Liotironin (L-triiodotironin, LT3): Kısa yarılanma ömrü ve serum T3 düzeylerinde oluşturduğu büyük pikler nedeniyle uzun süreli replasman için tek başına kullanılmamalıdır. Standart replasman miktarlarının (günde iki kez 25-37.5 µg) uygulanması, neredeyse tamamen emilmesi nedeniyle serum T3'ün 4 saat içinde hızla 300-1000 ng/dL'ye (4.62-15.4 nmol/L) yükselmesine neden olur; bu seviyeler 24 saat içinde normale döner. Ayrıca, liotironin alan hastalar günde en az birkaç saat kimyasal olarak hipertiroidiktir ve bu da potansiyel olarak kardiyak riskleri artırır (Idrees ve ark., 2020).

Sentetik T3 ve T4 hormon kombinasyonları: İki hormonun karışımları ağızdan alındığında da benzer serum T3 değişiklikleri meydana gelir, ancak daha az T3 verildiği için pik T3 daha düşüktür. Sentetik T4 preparatları ile replasman tedavileri serum T3 yanıtında farklı bir model yansıtır. Serum T3'teki artışlar kademeli olarak gerçekleşir ve yeterli dozda T4 verildiğinde normal seviyeler korunur (Jonklaas ve ark., 2021).

Kurutulmuş hayvan tiroid preparatları: Bu preparatlar değişken miktarlarda T3 ve T4 içerir ve hasta halihazırda bu preparatı almıyorsa ve serum TSH düzeyi normal değilse reçete edilmemelidir (Braunstein, 2022).

2.1.3.2. Hipertiroidizm

Hipertiroidizm nedenine bağlı olarak tiplere ayrılır:

- a. Primer hipertiroidizm: Yüksek serbest T4, düşük TSH, normal TRH stimülasyon testi bulgusuyla karakterizedir.
- b. Sekonder hipertiroidizm: TRH stimülasyon testi normal iken, TSH düzeyi yüksektir.
- c. Subklinik hipertiroidizm: T3 ve T4 düzeyleri normaldir, ancak TSH düzeyi düşüktür ($<0.1 \mu\text{IU} / \text{ml}$) (Biondi ve ark., 2005). Levotiroksin ile TSH baskılayıcı tedavi ya da aşırı miktarda hormon replasmanının (Batrinos, 2006) ve tiroid kanserine (Biondi ve ark., 2005) bağlı olarak aşırı hormon üretiminin bir sonucu olarak şekillenebilir.
- ç. Tironin hipertiroidizmi: Hipertiroid hastalarının %1-4'ünde rastlanan bu tipte serbest T3 yüksek, serbest T4 normal ve TSH düşük düzeydedir.

d. Tiroksin hipertiroidizmi: Bu tip hipertiroidizmde T4 düzeyi yüksek iken, T3 düzeyi normal sınırlardadır (Biondi ve ark., 2005).

Hipertiroidizm, kandaki tiroid uyarılarının veya otonom tiroid hiperfonksiyonunun etkisiyle tiroid bezinden aşırı TH'lerin sentezlenmesi sonucu oluşur. Bunun yanı sıra sentez artışı olmaksızın tiroid bezinden aşırı TH'yi salgılanmasından da kaynaklanabilir. Bu tip salınım mekanizmasında genel olarak bazı tiroidit çeşitlerinin yıkıcı değişimleri rol oynar. Genel olarak en yaygın nedenler Graves hastalığı (toksik diffüz guatr), Multinodüler guatr ve tiroidittir. Otoimmün tiroid hastalıklarından biri olan Graves hastalığı, tiroid uyarıcı antikor (TSAb) olarak da bilinen tiroid uyarıcı immünoglobulin (TSI) otoantikörlerinin üretiminden kaynaklanır (Diana ve ark., 2018). Çoğu otoantikörün inhibitör etkisi olmasına karşılık, bu otoantikör uyarıcı özellikte olup folikül epitel hücre membranındaki TSH reseptörüne (tirotropin reseptörü, TSHR) bağlanır ve onu aktive ederek hem T4 ve T3'ün otonom üretimine hem de tiroid bezi büyümesini uyararak hipertiroidizm ve tiromegaliye neden olur (Diana ve ark., 2018; McIver ve Morris, 1998). Ayrıca hamilelik ve özellikle doğum sonrası, iyot fazlalığı, enfeksiyonlar, duygusal stres, sigara ve interferon alfa gibi çeşitli çevresel faktörler, duyarlı genler üzerinde bağışıklık tepkilerini tetikleyerek Graves hastalığını şekillendirir. Hashimoto tiroiditi gibi Graves hastalığı da bazen tip 1 diabetes mellitus, saçların erken beyazlaması, vitiligo, pernisiyöz anemi, poliglandüler eksiklik sendromu ve bağ dokusu bozuklukları gibi diğer oto immün bozukluklarla birlikte görülür. Kalıtsal faktörler Graves hastalığı riskini artırır, ancak ilgili genler bilinmemektedir. Graves hastalığı guatr, ekzoftalmus (oftalmopati) ve infiltratif dermopati ile karakterize olup bunlardan biri veya daha fazlası ile birlikte ortaya çıkar. Grave sorbitopatisi (oftalmopati), tiroid uyarıcı antikörlerin (TSAb) ve sitotoksik T lenfositler tarafından salınan sitokinlerin etkilerine bağlı olarak ekstraoküler kasların ve retro-orbital bağ ve yağ dokularının inflamasyonu, hücresel proliferasyonu ve aşırı büyümesinden kaynaklanır. Bu sitokinler ve tiroid uyarıcı antikörler periorbital fibroblastları ve preadipositleri aktive ederek aşırı hidrofilik glikozaminoglikanların (GAG) sentezlenmesine ve retro-orbital yağ büyümesine neden olur. Glikozaminoglikanların suyu hapsetmesiyle ekstraoküler kaslar şişer. Bu değişiklikler proptozis, diplopi, konjesyon ve periorbital ödeme yol açar. Tedavi

edilmezse, sonunda kaslarda geri dönüşü olmayan fibrozis meydana gelir (Li ve ark., 2018).

Toksik soliter veya multinodüler guatr (Plummer hastalığı) bazı zamanlarda sürekli tiroid aktivasyonunu sağlayan TSH reseptör geninin mutajenik bozukluklarından kaynaklanır. Toksik nodüler guatr hastalarında bulunan belirtiler ile Graves hastalarında gözlenen otoimmün belirtiler aynı değildir ve dolaşımlarında bulunan antikorlar arasında ortak olan yoktur. Aynı zamanda, Graves hastaları tedavi edildiğinde iyileşebiliyorken, toksik soliter ve multinodüler guatr hastaları genel olarak iyileşmez (Krohn ve ark., 2005).

İnflamatuvar tiroid hastalıkları (tiroidit), subakut granümatöz tiroiditi, Hashimoto tiroiditi ve Hashimoto tiroiditinin bir varyantı olan sessiz lenfositik tiroiditi gibi alt çeşitlere ayrılır. Hipertiroidizm, subakut granümatöz tiroidit formunda daha yaygın olarak görülür. Artmış salgıdan ziyade, tiroid bezindeki yıkıcı değişimlerinden ve biriken hormonun salınmasından kaynaklanır. Bunu da hipotiroidizm fonksiyon bozukluğu izleyebilir (Slatosky ve ark., 2000).

Hipertiroidizm nadir olarak normal olmayan TSH salgılanması ile de oluşabilir. Ön hipofizin anormal büyümesi sonucu şekillenen bu bozuklukta salgılanan TSH metabolik anlamda normal TSH'den daha aktiftir. Hipofiz anomalisi bulunan hastalarda kanda TSH'nin alfa alt biriminde bir yükselme görülür. Bu durum ayırıcı tanıda da yardımcı olur (Bonomi ve ark., 2001).

İlaça bağlı hipertiroidi, kanser hastalığının iyileştirilmesinde kontrol noktası inhibisyon faktörleri olarak kullanılan amiodaron (Martino ve ark., 1988), multiple skleroz hastalığının iyileştirilmesinde kullanılan alemtuzumab (Ragavan ve ark., 2022) ya da trimetabolik bozuklukların etkisi ile tiroidit durumunu tetikleyen interferon-alfa'dan (Tomer ve Menconi 2009) kaynaklanabilir. Genellikle hipotiroidi oluştursa da lityum nadiren hipertiroidiye de sebep olabilir (Fairbrother ve ark., 2019).

Tirotoksikoz factitia (alimenter tirotoksikoz), ekzojen tiroid hormonu alımından kaynaklanan bir tirotoksikoz durumudur. Levotiroksin ve triiyodotironin gibi ilaçların yanlışlıkla fazla alımının sonucu oluşabilir. Nadir görülen bir hipertiroidizm şeklidir (Jahagirdar ve ark., 2008).

Gereğinden fazla 'I' alımı da hipertiroidizme neden olur. Nontoksik nodüler guatrı olan (genel olarak yaşlı hastalar), içeriğinde 'I' bulunan ilaç (örn. amiodaron) ya da radyolojik uygulamalar için 'I' açısından fazlaca konsantre maddeler uygulanan hastalarda görülür. Etiyolojisi de, aşırı iyodun tiroidin fonksiyonel olarak otonom (yani TSH regülasyonu altında olmayan) bölgelerinin hormon üretmesi amacıyla substrat sentezlemesi olabilir. Hipertiroidizm patolojik bozukluk durumu genel olarak aşırı 'I' dolaşıma katıldığı süre boyunca devam eder (Fairbrother ve ark., 2019).

Otoimmün olmayan otozomal dominant hipertiroidizm bebeklik döneminde ortaya çıkar. Tiroid uyarıcı hormon reseptörünün genindeki mutasyonlardan kaynaklanır (Chester ve ark., 2008). Hipertiroidizm oluşturan olası bir diğer neden metastatik tiroid kanseridir. Tiroid hormonunun fazlaca üretimi, bilhassa pulmoner metastazlarda olmak üzere, nadiren görülen metastatik foliküler karsinomdan kaynaklanır (Rosário ve ark., 2005).

Hipertiroidizm tanısı: Yüksek serbest T4 veya serbest T3 veya her ikisiyle birlikte baskılanmış TSH, hipertiroidi tanısını doğrular. Hipertiroidizmde, genellikle serum T3 düzeyi, T4'ten daha çok artar, bunun nedeni muhtemelen T3 salgısının artması ve periferik dokularda T4'ün T3'e dönüşmesidir. Hastaların bazılarında sadece T3 artar (T3 toksikozu). Triiyodotironin toksikozu, hipertiroidizme sebep olan yaygın trimetabolik bozukluklar olan Graves hastalığı, multinodüler guatr ve otonom olarak çalışan soliter tiroid nodülü hastalığı da olmak üzere bu hastalıkların herhangi birinde görülebilir. Triiyodotironin toksikozu tedavi edilmediğinde, hastada hipertiroidizm için tipik klinik anormallikler de gelişir. Tiroiditin alt formlarında görülen hipertiroidi fazının hemen arkasından bir hipotiroidi fazı vardır. Subklinik hipertiroidizmde sadece TSH baskılanır, ancak serbest T4 ve serbest T3 normaldir (Bahn ve ark., 2011; Ross ve ark., 2016).

Hipertiroidizmin tedavisi nedene bağlıdır. Bununla birlikte radyoaktif 'I', metimazol (MMI) veya propiltiourasil (PTU), beta-blokerler, 'I' ve cerrahi yöntem uygulanarak tedavi gerçekleştirilir (Abraham ve Acharya 2010).

Radyoaktif sodyum iyodür (iyot-131, radyoiyot): Radyoiyot, çocuklar da dahil olmak üzere tüm yaş grubundaki hastalarda Graves hastalığında ve toksik nodüler guatrda tedavi için sıklıkla tercih edilmektedir. İyot-131 dozunun ayarlanması zordur çünkü

bezin yanıtı tahmin edilemez; bazı doktorlar 8 ila 15 mikrokürik standart bir doz verir. Diğerleri ise 80-120 mikrokürik/g dozunu tiroid dokusunda sağlayabilmek için 24 saatlik alım miktarına ve görsel tahmini tiroid boyutuna göre dozu ayarlar. Ötiroidizm oluşturmak amacıyla yeteri kadar iyot-131 verildiğinde, hastaların hemen hemen %25-50'si bir yıl sonra hipotiroidi olur ve ayrıca insidans yıllar boyunca artmayı sürdürür. Böylelikle, hastaların çoğunda tedavi sonunda hipotiroidi şekillenir. Bunun yanı sıra, daha küçük ölçekli dozlar kullanıldığında, nüks insidansı daha yüksek olur. Daha büyük dozlar, örneğin 10-20 mikrokürik genellikle ilk 6 ayda hipotiroidizm oluşturur. Bu nedenle iyot-131 ile tedavi yöntemi tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Radyoiyot anne sütüne geçme ve bebekte hipotiroidizm oluşturma riski bulunduğundan emzirme dönemindeki annelerde ve plasentayı geçerek fetal hipotiroidizme neden olduğundan gebelikte kullanılmaz (Kravets 2016).

Metimazol(MMI) ve propiltiourasil (PTU): Bu ilaçlar TPO'yu inhibe ederek iyodürün organifikasyonunu azaltır ve bağlanma tepkimesini bozar. Propiltiourasilin yüksek dozları, T4'ün T3'e dönüşerek aktif form haline gelmesini inhibe eder. Metimazolün genel başlama dozu günlük 2-3 kez 5-20 mg'dır. Tiroid uyarıcı hormonun normalleşmesi, T4 ve T3 seviyelerinin normalleşmesini bir veya daha fazla hafta geciktirir. Bu nedenle, T4 ve T3 düzeyleri normalleştiğinde, hipotiroidizmi indüklemekten kaçınmak için dozaj en düşük (günlük bir kez 2.5-10 mg) etkili miktara düşürülür. Kontrol genellikle 2 ila 3 ay içinde sağlanır. Metimazolün idame dozları klinik belirtiler göz önüne alındığında en az bir yıl ya da daha uzun yıllar sürdürülebilir. Şiddetli tirotoksikozu olan hastalarda daha hızlı biyokimyasal kontrol gerektiğinde, MMI'nin etki süresi 24 saatten az olabileceğinden, başlangıçta bölünmüş bir MMI dozu (örn. günde iki kez 15 veya 20 mg) günlük tek bir dozdan daha etkili olabilir (McCrudden ve ark., 1987). Avrupa ülkelerinde geniş çapta kullanılan ancak Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunmayan karbimazol metimazole hızla dönüştürülür. Genel olarak başlangıç dozajı metimazole benzer olup, idame dozajı günlük bir veya iki kez 2.5-10 mg'dır. Metimazol, PTU'ya kıyasla günde bir kez uygulama avantajına ve daha düşük majör yan etki riskine sahip olduğundan daha çok tercih edilir. Bununla birlikte PTU, MMI'ye göre önemli ölçüde daha düşük konjenital anomali insidansı bulunduğundan gebelik sırasında, özellikle ilk trimesterde tercih edilen antitiroid ilaçtır (Abalovich ve ark., 2007). Propiltiourasilin etki süresi daha

kısadır ve hipertiroidinin şiddetine bağlı olarak günde üç kez 50-150 mg ile başlanarak genellikle günde iki veya üç kez uygulanır. Klinik bulgular ve tiroid fonksiyon testleri normale döndükçe, günde iki veya üç kez 50 mg idame PTU dozuna inmek genellikle mümkündür. Propiltiourasil dozu günde 4 kez 150-200 mg'a çıkarılarak süratle kontrol altına alınabilir. Potansiyel yan etkiler veya diğer özellikler iki ilaç arasında farklılık gösterir ve her biri için endikasyonları yönlendirir. Metimazolun günde bir kez alınması gerekir ve bu durumda da uyum artar. Üstelik, metimazol günde 20 mg dozdan daha az kullanıldığında agranülositoz belirtisi daha az görülür. Propiltiourasil tedavisinde her dozunda agranülositoz durumu görülebilir. Propiltiourasil, tiroid fırtınası tedavisinde tercih edilmektedir. Zira yüksek dozlar (günlük 800 mg'ın üzerinde) tiroid bezindeki üretimi azaltmanın yanı sıra T4'ün aktif form olan T3'e periferik olarak dönüşümünü kısmi olarak engeller. Aşırı dozaj PTU ile T4'ün T3'e dönüşümünün güçlü bir inhibitörü olan deksametazon kombinasyonu, tiroid fırtınası olan hastalarda görülen yoğun hipertiroidizm belirtilerini azaltabilir, serum T3 seviyesini 7 gün içerisinde normal seviyeye getirebilir (Ross ve ark., 2016). Levotiroksin alan subklinik hipertiroidi hastalarında, tedavi tiroid kanser teşhisi konulan hastalarda inhibe edilmiş TSH düzeylerini sürdürmeyi amaçlamıyorsa, dozajın miktarının azaltılması ideal bir yönetim olur. Endojen subklinik hipertiroidi (serumdaki TSH değerinin 0.1mU/L altında) olan hastalarda, bilhassa atriyal fibrilasyonu olan ya da kemikte azalmış mineral yoğunluğu olan hastalarda tedavi endikedir. Olağan tedavi ilacı iyot-131'dir, ancak daha az doz MMI da etkili olmaktadır (He ve ark., 2004).

Beta-blokerler: Stimüle edici adren bağımlı hipertiroidizm, bu grupta bulunan ilaçlara yanıt verebilir; en yaygın kullanılan ilaç propranolol'dur, atenolol yada metoprolol da alternatif tercih edilen diğer ilaçlardır. Genellikle beta-blokerlerin yan etkileri taşikardi, tremor, mental semptomlar, göz kapağının kapanması bozukluğu, bazen terleme ve ısı intoleransı, diyare, proksimal miyopati'dir. Beta-blokerlere cevap oluşturmayan belirtileri ise ekzoftalmi, kilo kaybı, guatr, bruit (türbülanslı kan akışıyla ilişkili olarak damar sesinin duyulabilir olması), oksijen tüketiminde artış ve dolaşımdaki tiroksin seviyelerinde artıştır. Propranolol tiroid fırtınasında endikedir. Oral yoldan alındığında genel olarak 2-3 saat içerisinde, damar yolundan alındığındaysa dakikalar içerisinde kalp atımını hızlı bir şekilde azaltır. Esmolol

sadece yoğun bakım ünitesinde kullanılmalıdır, çünkü dikkatli titrasyon ve izleme gerektirir. Özellikle yaşlı hastalarda hipertiroidizm ile birlikte görülen taşikardiye de beta-blokerler endikedir. Antitiroid ilaçların etkili olabilmesi için geçen süre birkaç haftayı bulabilir. Beta-blokerlerin ters etki gösterdiği hastalarda kalsiyum kanal blokerleri taşikardiye kontrol altına alabilir (Feely ve Peden 1984).

İyot: İyotun farmakolojik dozları, saatler içerisinde T3 ve T4 salgılanmasını durdurur ve böylelikle iyotun organifikasyonunu da inhibe etmiş olur. Bu durum, birkaç gün içerisinde geçecek olan bir etkidir ve hemen sonrasında inhibisyon çoğu zaman sona erer. Tiroid fırtınasının acil kontrol altına alınmasında, tiroid dışı cerrahi geçiren hipertiroid hastalarda ve tiroidektomi geçiren hipertiroid hastalarda tiroidin damarlanmasını azalttığından ameliyat öncesi hazırlığı için 'I' kullanılmaktadır. Bu amaçla doymuş potasyum (K) iyodür çözeltisi gün içerisinde 3-4 kez ağızdan 2-3 damla (100-150 mg) veya günde bir kez sodyum iyodür solüsyonu (1 L %0.9 salin çözeltisi içinde 0.5-1 g sodyum iyodür eritilerek hazırlanır) yavaşça verilir (De Almeida ve ark., 2022).

Operasyon: Tiroid karşıtı ilaç tedavisinin ardından hipertiroidizm durumunun tekrarı ve iyot-131 ilacını kabul etmeyen Graves hastalığı olan hastalarda, tiroid için kullanılan ilaçları bünyesi kabul etmeyen hastalarda, aşırı büyük guatrı bulunan hastalarda ve multinodüler guatrı ya da toksik adenomu olan kimi genç hastalarda operasyon uygulanır. Ayrıca dev nodüler guatrı olan yaşça büyük hastalarda da operasyon yapılabilir (Smithson ve ark., 2019).

Hipertiroidizmin klinik belirtileri: Hipertiroidizm, hipermetabolizma ile karakterizedir. Graves hastalığında ortaya çıkan infiltratif oftalmopati ve dermopati hariç, hipotiroidizmin nedeni ne olursa olsun, çoğu belirti ve bulgu aynıdır. Guatr veya nodül mevcut olabilir. Çarpıntı, sinirlilik, yorgunluk, hiperaktivite, iştah artışı, halsizlik, uykusuzluk, terlemede artış, kilo kaybı, ısıya duyarlılık ve yoğun bağırsak hareketleri (ishal) gibi birçok yaygın hipertiroidi semptomu adrenerjik hormonlara karşı artan duyarlılıktan kaynaklanır. Hipomenore görülebilir. Titreme, sıcak ve nemli deri, taşikardi, atriyal fibrilasyon ve artmış nabız basıncı belirtiler arasındadır (Doubleday ve Sippel, 2020). Yaşlı hastalarda, özellikle toksik nodüler guatrı olanlarda, daha çok depresyon veya demansa benzer semptomlar (apatik veya maskeli hipertiroidizm)

gözlenebilir. Çoğunda ekzoftalmus veya tremor görülmez. Olası semptomlar atriyal fibrilasyon, duyu değişikliği, senkop, kalp yetmezliği ve halsizliktir. Semptomlar bazen sadece bir organ sistemini kapsayabilir. Gözdeki bulgular arasında aşırı adrenerjik uyarıma bağlı olarak göz kapağı düşüklüğü ve göz kapağı retraksiyonu yer alır. İnfiltratif oftalmopati Graves hastalığına özgüdür.

Hipotiroidili ve hipertirodili hayvanların tiroid bezindeki histopatolojik değişiklikler:

Hipotiroidili hayvanların tiroid bezinde folikül epitel hücreleri ve C hücrelerinde hiperaktivite belirtileri gözlenir. Epitel hücreleri prizmatikleşir ve C hücrelerinin sayısı artar (Elkalawy ve ark., 2013). Hipertiroidide ise tiroid bezinde foliküler epitel hücreleri basıklaşırken ve folikül içerisindeki kolloid miktarında artış meydana gelir (Ferreira, 2007).

2.1.4. Tiroid Bezi Fonksiyon Bozukluklarının Merkezi Sinir Sistemindeki Klinik Etkileri

Çok sayıda karmaşık düzenleyici mekanizma, periferik ve merkezi sinir sisteminin gelişimini ve işlevini etkiler. Bunlar arasında hormonlar en güçlü düzenleyici faktörlerdir. Hormonal aktiviteleriyle bilinen çeşitli partiküller nörotransmitter olarak görev yapar. Ayrıca, sistemik olarak salgılanan hormonlar hem beyin düzeyinde hem de periferik organlarda sinir sisteminin işlevini modüle eder. Tiroid fonksiyonunun, içsel düzenleyici devrelerle doğrudan etkileşimi içeren mekanizmalarda veya dolaylı olarak örneğin dolaşım sistemi veya metabolik yollar üzerinde uygulanan sistemik etkiler yoluyla, uygun bilişsel gelişimde ve aynı zamanda sinir sistemi aktivitesinin diğer birçok yönlerinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Sinir sistemi işleviyle olan bu yakın ilişkiler nedeniyle, tirometabolik durum bozuklukları, ruh hali ve bilişsel bozukluklar, baş ağrısı, oftalmopleji, koku alma bozuklukları, tremor ve diğer hareket bozuklukları, kas güçsüzlüğü vb. dahil olmak üzere geniş bir nörolojik belirti ve semptom yelpazesiyle ilişkilidir. Hem hipertiroidizm hem de hipotiroidizm depresif veya anksiyete bozukluğu, hafıza eksikliği, yürütme yetersizliği ve hatta psikoz gibi psikiyatrik semptomlara neden olabilir. Şiddetli dekompanse hipotiroidizm, ardışık olarak ilerleyen ensefalopatik semptomlarla hayatı tehdit eden bir durum olan miksödem komasıyla sonuçlanabilir. Otoimmün tiroidit ile ilişkili steroide yanıt veren ensefalopati, tiroid hastalığı ile ilişkili ve potansiyel olarak ciddi klinik

komplasyonlara neden olan bařka bir ensefalopatik bozukluk biřimini temsil eder. Periferde, tirometabolik bozukluklar kas fonksiyonunu etkileyerek subjektif yorgunluk ve dűřűk egzersiz toleransı ile bazı durumlarda (űzellikle hipotiroidizmde) objektif miyopatik bulgulara neden olabilir. Ayrıca periferik sinir sistemi de űzellikle hipotiroid hastalarda, periferik polinűropati ve karpal tűnel veya Guyone kanalı sendromları gibi tuzak nűropatileri geliřtirme eęilimi ile etkilenebilir. Daha da űnemlisi, otoimműn tiroid hastalıęının potansiyel olarak miyasteni, Guillain-Barre sendromu veya pernisiyűz anemi gibi nűrolojik semptomlara neden olabilecek dięer otoimműn sűreçlerle bir arada bulunduęu gűsterilmiřtir (Stasiolek, 2015).

Hipotiroidizmde dűřűk TH konsantrasyonları biliřsel gerileme, depresyon, demans, disfoni (ses kalitesinin bozulması) ve koma gibi nűropsikiyatrik semptomlara neden olabilir. Hipotiroidizmde yaygın zihinsel bozulmanın bir uzantısı olarak demans geliřebilir. Bununla birlikte, demans potansiyel olarak geri dűnűřűmlűdűr ve levotiroksin tedavisinden sonra nűrobiliřsel yeteneklerin iyileřtięi gűsterilmiřtir (Jurado-Flores ve ark., 2022). Ancak demans, hipotiroidizmin tek psikiyatrik belirtisi deęildir. Ayrıca deliryum, sanrısals bozukluk, řizofreniform psikoz veya majűr depresyon da ortaya ıkabilir (Dugbartey, 1998). Hem kemirgenlerde hem de insanlarda TR mutasyonları, duysal, dikkat, duygu ve hafıza fonksiyonlarındaki deęiřiklikler de dahil olmak űzere çeřitli davranıřsal ve biliřsel fenotiplerle iliřkilendirilmiřtir, ancak etkileri, hipotiroidizminkinden daha karmařık ve genellikle daha tehlikesizdir (Dellovade ve ark., 2000; Forrest ve ark., 1996; Gothe ve ark., 1999; Guadano-Ferraz ve ark., 2003; Wong ve ark., 1997).

Primer hipotiroidizm hastalarında karřılařılan yaygın bir dięer klinik problem sensorinűral koku alma bozuklukları (disomia)'dır. Sensorinűral koku alma bozuklukları, koku alma reseptűrleri, koku alma duyu nűronları (Olfaktűr reseptűr nűronlar, ORN) veya merkezi sinir sistemi tarafından stiműlasyonun yetersiz alımı veya iřlenmesi (Dhong ve Kim, 2003; Paternostro ve Meisami, 1991) nedeniyle duysal yoęunluęun azalması veya bozulması anlamına gelir (Chen ve ark., 2021). Bu gibi hastalarda, tiroid hormonları ile tedavinin bu kusurları bűyűk űlűde tersine ęevirdięi tespit edilmiřtir (McConnell ve ark., 1975). McConnell ve ark. (1975) hipotiroidizmde tat ve koku alma duyularının bozulduęunu bildirmiřtir. Walczak ve arkadaşları konjenital hipotiroidizm hastalarında, tiroid hormonlarının kokunun

tespitinde ve ayırt edilmesinde önemli olduğunu belirlemişlerdir (Walczak ve ark., 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalarda da subklinik hipotiroidizmin (Baskoy ve ark., 2016) ve primer hipotiroidizmin (Deniz ve ark., 2016) koku alma duyarlılığını negatif yönde etkilediği gösterilmiştir. Dahası, hipotiroidizmin yetişkin farelerde koku almanın kısmen veya tamamen kaybolmasına (anosmia) neden olduğu gösterilmiştir (Beard ve Mackay-Sim, 1987).

Paternostro ve Meisami (1991), tiroid hormonu değişikliklerinin yeni doğan sıçanların olfaktör epitelindeki etkilerini araştırmıştır. Deneysel olarak oluşturulan hipo ve hipertiroid sıçanlar, koku reseptör nöronlarının (ORN) olgunlaşması, yüzey yoğunluğu ve toplam reseptör düğüm sayısı açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada, hipotiroid sıçanlarda koku epitelinin daha küçük olduğu, koku reseptör nöronları için olgunlaşmamış/olgunlaşmış oranının arttığı, ancak toplam reseptör hücrelerinin aynı yoğunlukta olduğu saptanmıştır. Bu araştırmacılar tiroid hormonlarının postnatal olfaktör epitel proliferasyonu ve reseptör hücre olgunlaşması için gerekli olduğu ve aşırı dozda tiroid hormonlarının bu sonuçları iyileştirmeyeceği sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde Dhong ve arkadaşları (2003), hipotiroidizmin koku epitelindeki olası histolojik etkilerini araştırmış; immünohistokimyasal boyama kullanarak koku epitelinde daha düşük olgunlaşma skorları bulmuşlardır. Tiroid hormonlarının koku alma üzerindeki etkileri merkezi sinir sistemi veya uç organ yanıtları yoluyla da ortaya çıkabildiği ve koku alma bozukluğunun yaşamın ilerleyen dönemlerinde bilişsel bozuklukla ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Roberts ve ark., 2016).

2.1.5. Tiroid Hormonlarının Nöroenez Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tiroid hormonları nöral hücre gelişimini ve RNA (Ribonükleik asit) sentezi gibi büyümeye ilgili süreçleri etkilerler ve memelilerde embriyogenez ve infantil dönemde sinir sistemi gelişiminde önemli rol oynarlar (Timiras, 1988). Yaşamın bu erken aşamalarında, bir dizi gen TH'ye yanıt olarak güçlü değişiklikler gösterir (Bernal, 2017). Ancak, gelişmekte olan beyindeki TH'ye yanıt veren bu genler yetişkinlikte TH'ye yanıt vermeyi bırakır. Memeli nöronları doğum öncesi ve doğum sonrası erken yaşamda üretildiğinden, TH'ler doğum sonrası memelilerin gelişen nöronlarını etkileyebilir (Rakic, 1985). Bazı çalışmalarda yetişkin bireylerde tiroid hormonunun nöroenez üzerindeki etkisi gösterilmiştir (Kapoor ve ark., 2015; Remaud ve ark.,

2014). Tiroid hormonu, hücre göçü ve kortikal tabakaların oluşumu gibi olayların düzenlenmesinin yanı sıra, nöronal ve glial hücre farklılaşmasında rol oynar. Tiroid hormonlarının, hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve gelişmekte olan korteksin sürekli çoğalmasını sağlayan POU2F1/Oct-1 veya Nov genlerinin ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir (Dowling ve ark., 2000; Morte ve ark., 2010).

Tiroid hormonu eksikliği (hipotiroidizm) veya fazlalığının (hipertiroidizm) bir sonucu olarak, özellikle hücre farklılaşması, göçü ve gen ekspresyonunun değiştiği tespit edilmiştir (Benvenuti ve ark., 2008; Bernal ve Nunez, 1995). Hipotiroidizm hücre döngüsünün bozulmasına, apoptoza ve hem apikal hem de bazal progenitör hücre havuzlarında azalmaya, ayrıca nöronal farklılaşmadaki kusurlara neden olur (Mohan ve ark., 2012). Bugüne değin yapılan çalışmalar hipotiroidizmin, bilişsel bozulmanın en önemli metabolik nedenlerinden biri olduğunu ortaya koymuştur (Dietzel ve ark., 2012). Yakın zamanda görüntüleme teknikleri (özellikle MRI (Manyetik rezonans görüntüleme) taramaları) kullanılarak hipotiroidizm tanısı alan annelerin yenidoğanlarında ve bebeklerinde beyin yapısının ve olgunlaşmasının birçok yönünün bozulduğu gösterilmiştir (Korevaar ve ark., 2016; Lischinsky ve ark., 2016; Samadi ve ark., 2015; Stagnaro-Green, 2011; Willoughby ve ark., 2014a; Willoughby ve ark., 2014b). Dahası, hamilelik sırasında ilk trimesterde anneleri düşük TH seviyelerinden muzdarip olan çocukların, bir hafıza eksikliği ile ilişkili olabilecek daha küçük hipokampüse sahip oldukları saptanmış ve insanda ilk trimesterin TH sinyalizasyonu için nörojenezi kontrol eden kritik bir dönem olduğu rapor edilmiştir (Willoughby, 2014a).

Doğumdan sonra TH'ler tamamen yenidoğanın tiroid bezinden türetilir. Perinatal dönemde şekillenen hipotiroidizm nöronal hücre proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını bozar. Hem nörojenez hem de gliyogenezde yer alan birkaç TH-hedef gen, yenidoğan beyin gelişimi için çok önemlidir (Bernal ve ark., 2003).

Tiroid hormonlarının ana etkisi enerjiyi kullanmaktır. Bu, çoğu dokunun metabolik hızında bir artışa neden olur. Hipotiroidizmde zihinsel ve fiziksel aktivitenin yavaşlamasının nedeni metabolizmanın azalmasıdır. Yetişkin hipotiroidizimli sıçanlar öğrenmede yetersizlikler ve depresyon belirtileri gösterir (Fundaro, 1989; Kulikov ve ark., 1997). Belirli fetal evrelerdeki tiroid hormonu eksikliğinin bir sonucu olarak,

neokortekste değişmiş hücre göçü, belirgin olmayan kortikal tabakalaşmaya neden olur (Berbel ve ark., 2001; Bernal, .2017; Moog ve ark., 2017). Nöroenez yaşın ilerlemesiyle birlikte azalır (Enwere ve ark., 2004; Gould ve ark., 1999) ve bilişsel eksiklik yaşlı insanlarda ve yaşlanan kemirgenlerde sık görülür (Bach ve ark., 1999). Tiroid hormon sinyali yaşlanma sırasında çoklu fizyolojik sistemleri etkiler (Bowers ve ark., 2013). Bununla birlikte, bazı TH tedavileri hipotiroidili insanlarda (Kramer ve ark., 2009) ve farelerde (Fu ve ark., 2010; Fu ve ark., 2014) bilişsel performansları geliştirebilir.

Yetişkin beyinde iki bölge bulbus olfactoryus (olfaktör bulbus, OB) ve hipokampüsün dentat girusu yaşam boyunca yeni üretilen nöronları alır ve sürekli olarak kendi nöronlarına dönüştürür (Ming ve Song 2005). Merkezi sinir siteminde nöroenez iki bölgede gerçekleşir: subventriküler alan (SVZ) ve subgranüler alan (SGA). Subventriküler alan, lateral ventrikül yüzeyinin altında bulunur, yetişkin kemirgenlerde olfaktör bulbus nöronlarını üretilir. Subgranüler alan, dentat girusun granüler katmanının yanında bulunur ve granüler nöronları üretilir. Yetişkin beyinde iki bölge OB ve hipokampüsün dentat girusu yaşam boyunca yeni üretilen nöronları alır ve sürekli olarak kendi nöronlarına dönüştürür (Ming ve Song 2005). Hipotiroidizmin yetişkin sıçanlarda SVZ’de hücre döngüsüne yeniden girişini bloke ederek nöronal kök hücre ve progenitör hücre proliferasyonunu azalttığı (Lemkine ve ark., 2005) ve ekzojen tiroid hormonu verilmesinin n roenezini uyardığı bilinmektedir (Ambragini ve ark., 2005; Montero-Pedrazuela ve ark., 2006). T3 hormonu SVZ’de nöronal prekürsörlerin diferensiyasyonunu arttırır ve nöral kök hücrelerin nöroblastlara dönüşümünü teşvik eder (Kapoor ve ark., 2012). Triiyodotironinin embriyonik ve yetişkin nöroenez etkilerini baskın olarak TR 1 sağlamaktadır (Chen ve ark., 2012; Denver ve ark., 2009). Ayrıca, hipotiroidizm sırasında göç eden nöroblastların sayısı azalır, bu da nöroenezin bozulmuş olduğunu gösterir (Lemkine ve ark., 2005; L pez-Ju rez ve ark., 2012). Bu azalmış nöroenezin koku alma fonksiyonunu etkileyebileceği, böylece koku alma davranışının bazı formlarını değiştirebildiği belirtilmektedir (Kageyama ve ark., 2012).

2.2. Olfaktör Sistem (Koku Alma Sistemi)

Koku alma, türler arasında en korunmuş duylardan biridir. Koku alma bireylerin gıdaya erişilebilirlik hakkında uygun verileri elde etmesini ve çeşitli toksik ve zararlı maddeleri reddetmesini sağlar; dişilerin cinsel durumunun belirlenmesinde, çiftleşme, üreme ve emzirmede, bölgelerin sınırlandırılması ve işaretlenmesinde, yuvanın tespitinde, tehlike algısı ve navigasyonda önemli rol oynar (Brennan ve Zufall, 2006; Frasnelli ve ark., 2005; Liberles, 2014; Li ve Liberles, 2015; Rymer, 2020; Shingo ve ark., 2003). Koku alma duyusu, zararlı maddelere karşı erken uyarı sistemi olarak çalışmasının yanı sıra normal sindirim fizyolojisindeki gastrik sekresyonların uyarılmasında da önemli rol oynar (Frasnelli ve ark., 2005; Mattes, 1997). Hem kemirgenlerde hem de insanlarda doğumdan sonra lokomotor aktivitelerin gelişmesi ve mekansal oryantasyona yardımcı olmak için koku alma esastır (Hugill, 2015; Miller ve ark., 2008; Miller ve ark., 2010).

Koku alma, buharlaştıklarında burun deliklerine ulaşp burun mukozasında çözünmeleri ve böylece koku alma sürecini başlatmaları için uçucu olmaları gereken koku moleküllerini tespit etmek üzere uzmanlaşmış kimyasal bir duydur. Tat alma da bir başka kimyasal duyu örneğidir. Kokuya ilişkin bilgiyi taşıyan moleküller, Yunanca "semeon" (işaret anlamına gelir) kelimesinden gelen "semyokimyasallar" olarak adlandırılan koku ligandlarıdır. Semiyokimyasalların çeşitli alt grupları bulunur (Bakker ve Leinders-Zufall, 2016).

a. Feromonlar, aynı tür içindeki bireyleri etkileyen kimyasallardır. Bu isim Yunanca "pherein" (taşımak veya aktarmak anlamına gelir) ve "hormon" (uyarmak veya heyecanlandırmak anlamına gelir) kelimelerinden türetilmiştir. Feromonlar salgılatıcı ya da primer feromonlar olarak sınıflandırılabilir. Salgılatıcı feromonlar, kokunun alınması üzerine anında davranışsal bir tepki başlatır. Primer feromonlar ise endokrin sistemi modüle ederek gecikmeli bir davranışsal tepkiye neden olur (Bakker ve Leinders-Zufall, 2016). Sinomonlar ("syn" birlikte hareket eden veya düşünülen anlamına gelir), bir türün üyeleri tarafından salınan, başka bir türün davranışını etkileyen ve her iki tarafa da fayda sağlayan kimyasallardır. Bitkiler bilinen çoğu sinomonun kaynağıdır (Bakker ve Leinders-Zufall, 2016).

b. Kairomonlar ("kairos" doğru veya uygun anlamına gelir) sadece alıcıya fayda sağlayan türler arası kimyasal habercilerdir. Bu kemosinyaller birçok şekilde ortaya çıkar. Konak bulma ve kabul etme sürecinin birçok aşamasında işlev görebilir: kemosinyal alıcılar tarafından dinlenir ve bir avcının veya avın varlığına ilişkin bilgi olarak kullanılabilir. Örneğin, bir kediden gelen kokular, potansiyel avları olan farede doğuştan gelen korku davranışını ortaya çıkarır (Bakker ve Leinders-Zufall, 2016).

c. Allomonlar ("allos" başka veya farklı anlamına gelir, yabancı veya yabancı birşeyi ima eder) yayıcıya fayda sağlayan türler arası kimyasal habercilerdir. Genellikle kovucu/beslenme caydırıcısı olarak işlev gören savunma amaçlı kimyasallardır, ancak alıcıyı bir avcı tarafından güvenli bir yere çekmek için de kullanılabilirler. Örneğin, bolas örümcekleri belirli güve feromonlarını sentezleyerek bu türlerin erkek güvelerini yakalanmak üzere menzile çeker. Bir kokarca, avcılarında kaçınma tepkileri ortaya çıkarmak için kokusunu bir savunma silahı olarak kullanır (Bakker ve Leinders-Zufall, 2016; Brown ve ark., 1970).

Memelilerde koku almak üzere özelleşmiş doku ve organlar olfaktör sistemi (koku alma sistemi) oluştururlar. Olfaktör sistem gebeliğin ortasında gelişmeye başlar (de Castro, 2009; Sarnat ve Yu, 2016; Treloar ve ark., 2009). Olfaktör sistem genellikle anatomik olarak bağımsız iki koku alma sistemine ayrılır: ana koku alma sistemi (ana olfaktör sistem, MOS) ve aksesuar koku alma sistemi (aksesuar olfaktör sistem, AOS) (Şekil 2.3.). Aksesuar olfaktör sistem vomeronazal sistem (VNS) olarak adlandırılır. Olfaktör ve vomeronazal sistemler omurgalılarda birincil nazal kemosensör sistemlerdir. Ana koku alma sistemi çevredeki her türlü uçucu kimyasalı tespit edip işlerken (Buck, 1996), aksesuar koku alma (veya vomeronazal) sistemi esas olarak biyolojik önemi olan uçucu ve uçucu olmayan kimyasalların (Chamero ve ark., 2012; Halpern ve Martínez-Marcos, 2003) işlenmesiyle görevlidir. Bu tür kimyasallar arasında cinsel feromonlar (Roberts ve ark., 2010), saldırgan davranışları ortaya çıkaran kimyasal sinyaller (Chamero ve ark., 2007; Chamero ve ark., 2011), avcı (Takahashi, 2014), hastalık kaynaklı (Rivière ve ark., 2009) ve stres ile ilgili (Nodari ve ark., 2008) sinyaller yer alır. Bu nedenle, ana koku alma sistemi hayvanın kimyasal çevresini analiz etmesini sağlarken, vomeronazal sistem esas olarak türdeşlerin ve avcılarının tespit edilmesinde rol oynar. Bununla birlikte her iki koku alma sistemi moleküllerin uçuculuk özelliklerinden bağımsız olarak kimyasal sinyalleri

tanıyabilmeleri ve feromonlar da dahil olmak üzere semiyokimyasalları tespit edebilmeleri nedeniyle birbirini tamamlayıcı roller üstlenirler (Bakker ve Leinders-Zufall, 2016; Swaney ve Keverne, 2009).

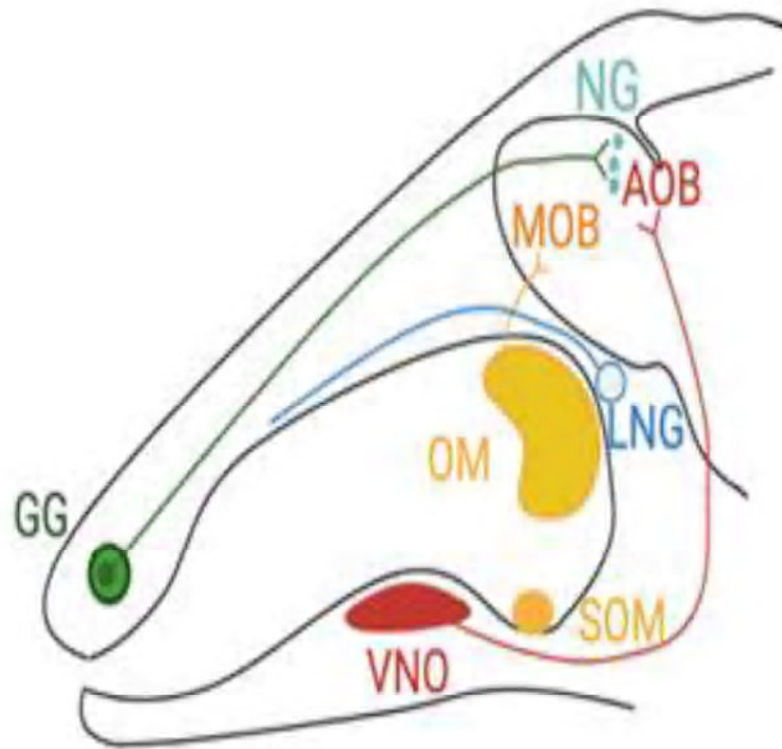
Bu tezde sadece ana olfaktör sistem hakkında bilgi verilmiştir.

2.2.1. Ana Olfaktör Sistem

Ana olfaktör sistem periferik ve merkezi olfaktör sistem olarak ikiye ayrılır:

2.2.1.1. Periferik Olfaktör Sistem

Kemirgenlerde periferik koku alma sistemi burun delikleri, etmoid kemik ve burun boşluğunda yerleşen, anatomik olarak ayrılmış bir kaç yapıdan oluşur: ana olfaktör (koku) epiteli (MOE), Grueneberg (Grüneberg) gangliyonu (GG) ve Masera'nın septal organı (Abaffy ve ark., 2023) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Fare olfaktör (koku alma) sistemi. Kemosensör alt sistemleriyle birlikte fare kafatasının görünümü. GG, Grueneberg gangliyonu; OM, olfaktör mukoza; SOM, Masera'nın septal organı; VNO, vomeronazal organ; MOB, ana bulbus olfaktoryus; AOB, aksesuar bulbus olfaktoryus; LNG, lateral burun bezleri; NG, glomerül dizileri (Abaffy ve ark., 2023).

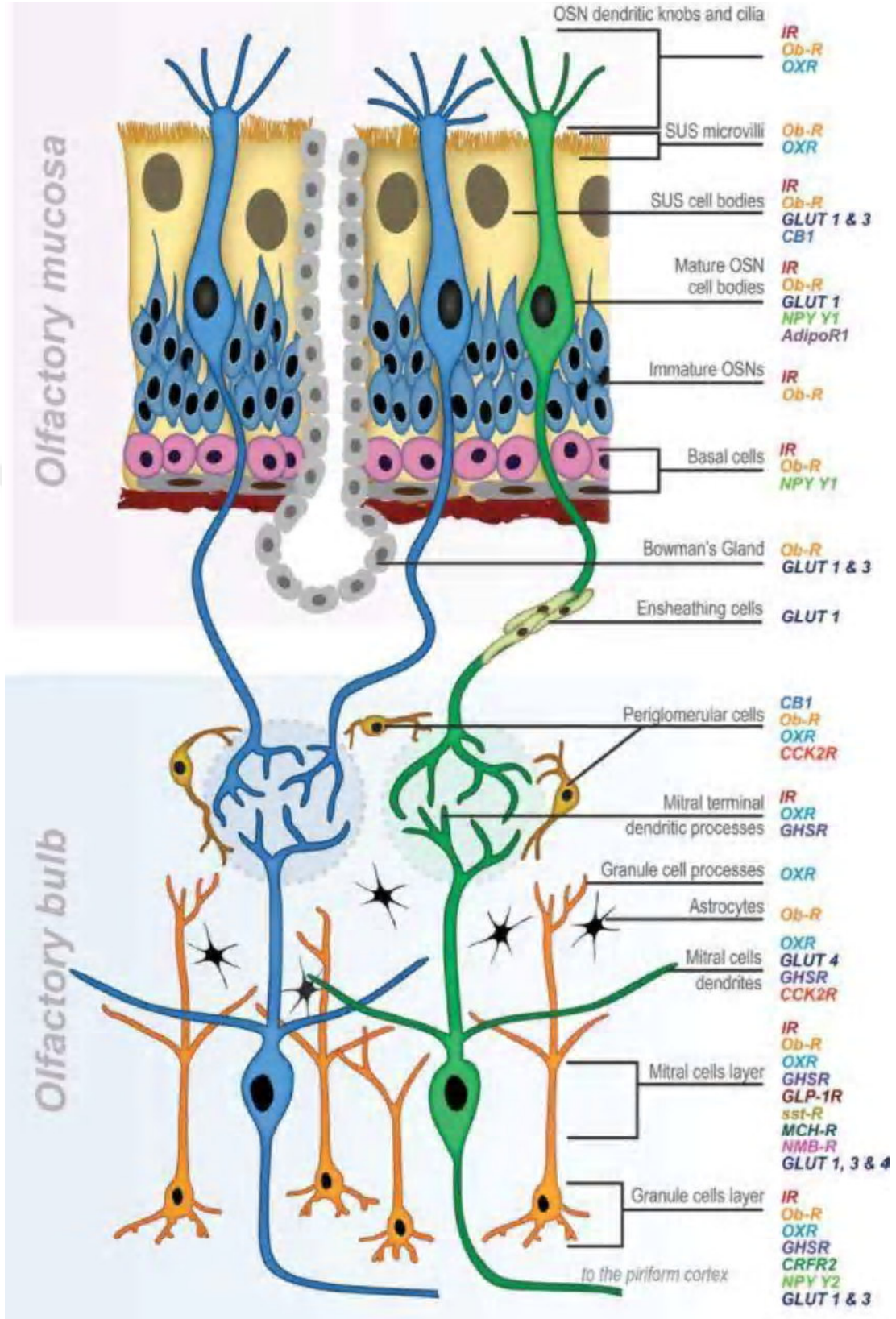
2.2.1.2. Olfaktör Mukoza

Olfaktör mukoza etmoid kemiğin kribriiform plakasının alt yüzeyinde, üst ve orta konkaların medial yüzeyinde ve üst nazal septumda yer alır. Bu mukozanın primer bileşenleri olfaktör epitel (koku alma epiteli), bunun altındaki lamina propriya, olfaktör bezler (koku bezleri) ile epitel içindeki olfaktör duyu nöronlarının (olfaktör reseptör nöronlar, olfaktör sensorik nöronlar, koku nöronları, ORN veya OSN) uzantıları olan sinir telleridir (Huard ve ark., 1998). Koku molekülleri ya nefes alma (koku alma) sırasında burun deliklerinden ya da çiğneme veya yutma (retro-nazal koku alma) sırasında dilin havayı burun boşluğunun arkasına ittiğinde burun boşluğuna ulaşabilir (Xiao ve ark., 2021). Burun boşluğunun duvarı olfaktör bezler tarafından üretilen mukus ile kaplanmıştır. Mukus ayrıca olfaktör epiteli de örter. Mukus içeriğindeki metabolik enzimler koku moleküllerini çözer (Débat ve ark.,2007) (Şekil 2.4.).

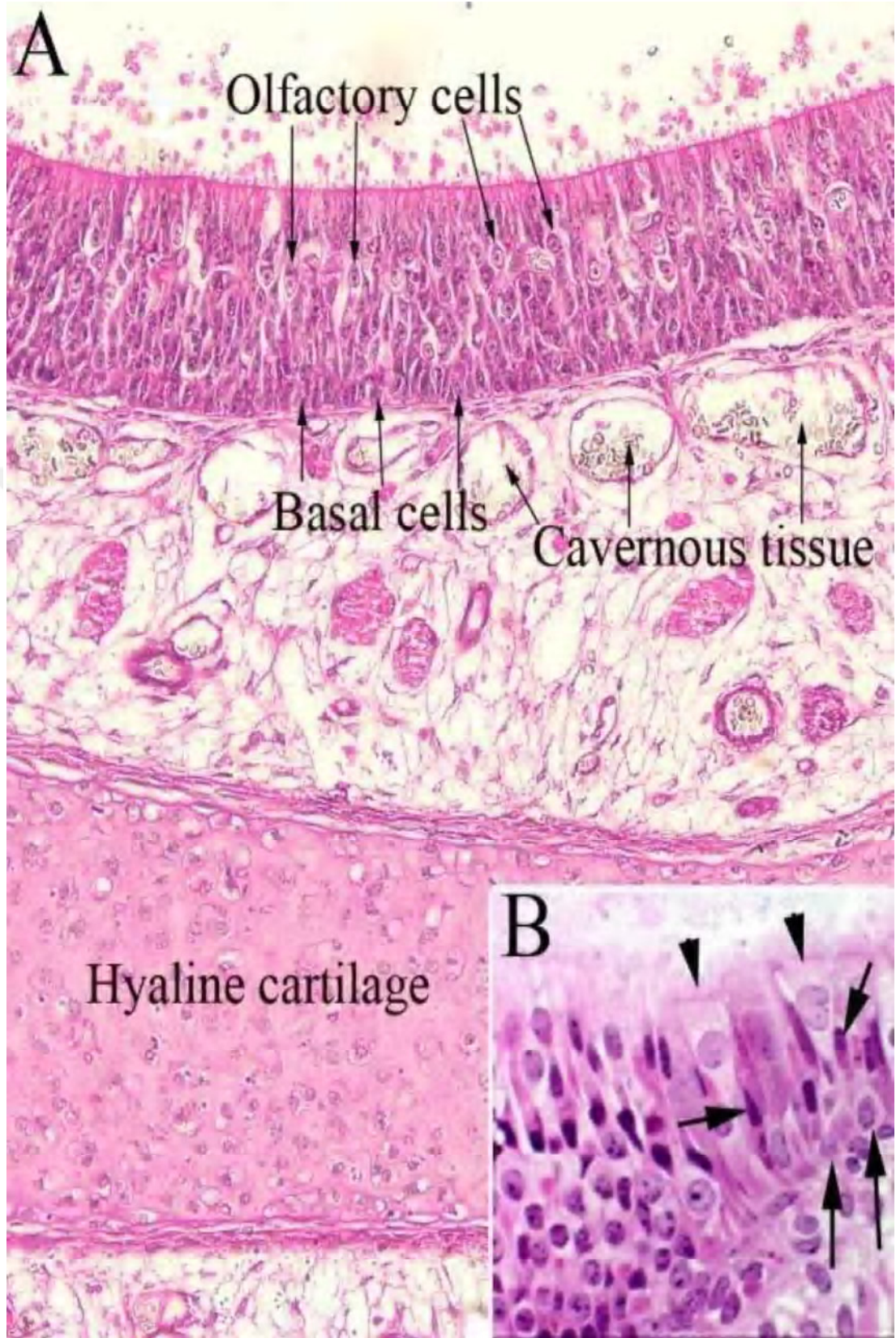
Olfaktör (koku) epitel kokunun algılanmasında rol oynayan bir tür yalancı çok katlı prizmatik epiteldir (Şekil 2.4.). Omurgalılarda, koku epitelinde beş tip hücre bulunur:

- a) Olfaktör reseptör nöronlar (ORN),
- b) Bir tür destek hücresi olan sustentaküler hücreler,
- c) Sürekli olarak yeni koku reseptör nöronlarına ve sustentaküler hücrelere dönüşen kök hücreler olan bazal hücreler (Schwob, 2002),
- d) Mikrovillar hücreler,
- e) Beşinci tip hücre.

a) Olfaktör reseptör nöronlar (ORN) bipolar sensorik nöronlardır. Apikal dendritlerini nöroepitel yüzeyine uzatır ve miyelinsiz aksonlarını bazal lamina ve etmoid kemiğin kribriiform plakasından geçirerek beyinde olfaktör bulbusun glomerüllerindeki mitral ve püsküllü nöronların dendritlerinde sonlandırır. Olfaktör reseptör nöronlarının hücre gövdeleri, koku epitelinin tabakalı katmanlarında dağılmıştır (Cunningham ve ark., 1999). Olfaktör reseptör nöronları epiteldeki hücrelerin %75-80'ini oluşturur ve işlevsel olarak homojen olup hepsi koku maddelerini algılar (Şekil 2.5.).

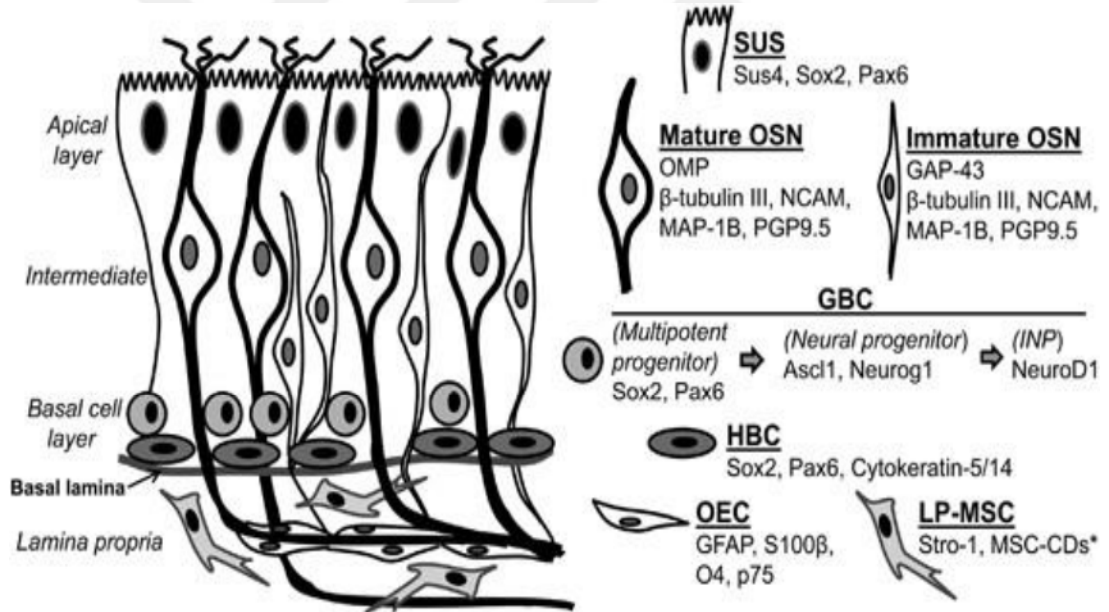


Şekil 2.4. Olfaktör mukoza ve olfaktör bulbus bileşenlerinin şematik gösterimi (Palouzier-Paulignan ve ark., 2012).



Şekil 2.5. A: Olfaktör mukoza, B: Olfaktör (koku) epitel. Olfaktör reseptör (koku) nöronlar (ok başları), Destek hücreleri (kısa oklar), Bazal hücreler (Uzun oklar). Hematoksilen-Eozin (Fath-Elbab ve Abou-Elhamd, 2016).

Olfaktör reseptör nöronlar yaşam boyunca düzenli bir oranda yaşlanır ve ölürler. Küresel bazal hücrelerin farklılaşması ile yenilenirler (Caggiano ve ark., 1994). Olfaktör reseptör nöronları olgunlaştıkça epitelde apikale hareket ederek nöronal yaşın pozisyona göre belirlenmesine izin verirler (Roskams ve ark., 1998) ve olgun ORN'ler koku işaretleyici protein (OMP) ifade ederler (Farbman ve Margolis, 1980). İlginç bir şekilde, bu nörogenez, olfaktör bulbus ablasyonu (bulbektomi olarak adlandırılır) ile aşırı indüklenebilir (Carr ve Farbman, 1993). Bu nedenle, sinyal iletimindeki sinyal bileşenlerinin işlevlerinin anlaşılması, ORN'lerin mekansal organizasyonu ve gelişimi ile ilgili çalışmalarla kolaylaştırılabilir. İnsanlarda ORN'ler farklı gelişim aşamalarında bulunabilir ve sustentaküler hücrelerin arasına yerleşirler (Schwob, 2002). Olfaktör reseptör nöronlarının çekirdekleri ovaldir ve genellikle heterokromatik özellik gösterir. Hücre gövdeleri yuvarlak veya oval olup ~4-6 µm çapındadır (Şekil 2.6.).

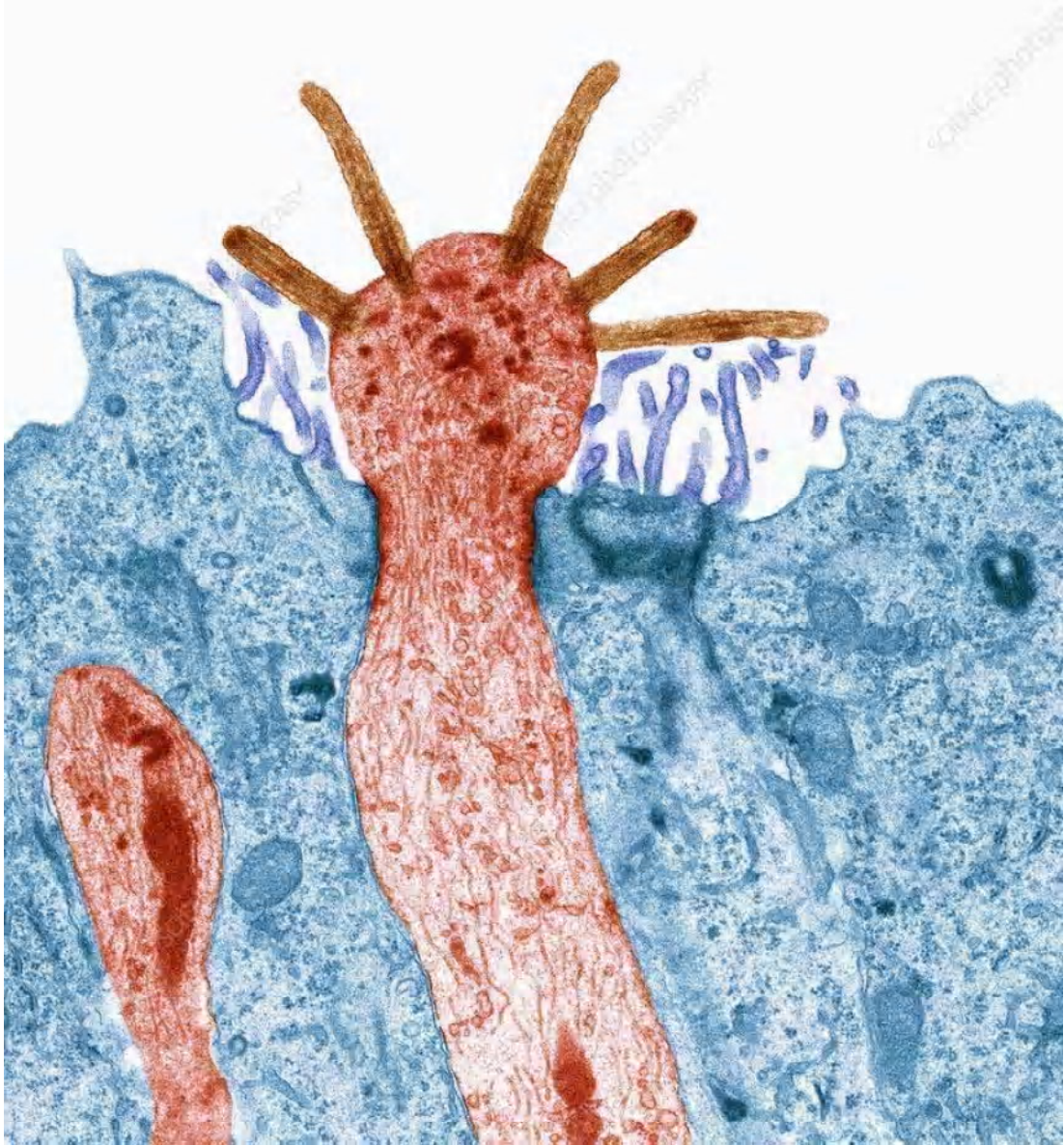


Şekil 2.6. Olfaktör mukozanın hücre-mimarisi ve moleküler özellikleri. Kemirgen olfaktör epitelin multilaminer organizasyonu solda gösterilmiştir ve memeli olfaktör epitelindeki hücre tiplerini in vivo olarak tanımlayan ve ayırt eden çekirdek moleküler belirteçler sağda listelenmiştir. GBC, küresel bazal hücre; HBC, horizontal bazal hücre; INP, ara nöral progenitor hücre; OEC, olfaktör gliya hücreleri; OSN, olfactory sensory neuron; SUS, sustentacular cell (Borgmann-Winter ve ark., 2015). Olfactory ensheathing glia veya olfactory ensheathing glial cells olarak da bilinen olfactory ensheathing cells (OECs), sinir sisteminde bulunan bir makroglia (radyal glia) türüdür. OEC'ler, hem olfaktör sinirde periferik olarak hem de olfaktör bulbusun olfaktör sinir tabakası içinde olfaktör akson demetlerini sararlar. Schwann hücrelerinin miyelinsiz periferik nöronları sarmasına benzer bir şekilde koku nöronlarının miyelinsiz aksonlarını sardıkları için olfaktör Schwann hücreleri olarak da bilinirler. Ayrıca aksonal rejenerasyona yardım ederler (Ruitenberg ve ark., 2006).

Olfaktör reseptör nöronların dendritleri sustentaküler hücreler arasında yükselir ve her reseptör hücresinde 10-20 adet hareketsiz (non-motil) silyum taşıyan dendritik düğümler oluşturur. Bu düğümler “koku topuzu” adını alır (Bloom ve Engström, 1952; Morrison ve Costanzo, 1990). Olfaktör reseptör nöronları arasında gap junkşınlar (boşluk bağlantıları) mevcuttur; bunların doku gelişimini ve döngüsünü kolaylaştırmada rol oynadığına inanılmaktadır (Delay ve Dionne, 2003). Koku topuzunun morfolojisi ampul benzeri değil, düz veya kubbe şeklindedir. Silyumlar, bazı insan olmayan türlerde tanımlandığı gibi paralel olmak yerine epitel yüzeyine dik olarak koku hücresinin uzun eksenine yönünde uzanır (Polyzonis ve ark., 1979). Elektron mikroskopik olarak paralel olmayan bir oryantasyondaki koku topuzları ve silyumlar, olfaktör epitel içindeki ORN'lerin varlığını belirlemek için kullanılabilir (Féron ve ark., 1998). Silyumlar, çözülmüş proteinler ve enzimlerin yardımıyla koku veren moleküllerin birikmesini, reseptör bağlanmasını ve etkileşim sonrası uzaklaştırılmasını kolaylaştıran, sustentaküler hücreler tarafından salgılanan bir mukus tabakasına uzanır (Getchell ve ark., 1984) (Şekil 2.7.).

Olfaktör reseptör nöronlar mukus içerisinde çözülmüş koku moleküllerini algırlar ve duyu iletimi (transdüksiyon) adı verilen bir işlemle koku hakkında beyine bilgi iletirler (Bushak, 2016). Bu durum nöronların olfaktör bulbus içinde spesifik nöronal bağlantılar oluşturmalarını ve bu işlevler için spesifik reseptörleri ve sinyal moleküllerini ifade etmesini gerektirir. Olfaktör reseptör nöronların silyumlarının membranlarında koku moleküllerine bağlanan olfaktör reseptörler (OR) bulunur. Her ORN, 1000'den fazla OR geninden yalnızca bir OR türünü ifade eder. Olfaktör reseptörler, hormonlara, nörotransmitterlere ve görsel ile kimyasal uyarıların iletilmesinde rol oynayan duyu uyaranlara verilen yanıtlar gibi çok çeşitli önemli fizyolojik işlevlere aracılık eden bir reseptör sınıfı olan G proteinine (Guanin nükleotid bağlayıcı protein) bağlı reseptörler (GPCR'ler) ailesine aittir. Reseptörler ve efektör proteinler arasındaki sinyalleri entegre eden heterotrimerik (çoklu trimerik) G-proteinleri, yedi transmembran-domainli (7TM) GPCR'lerin (G-protein eşleşmiş reseptör) hücre içi partnerleridir. Galfa ($G\alpha$), Gbeta ($G\beta$) ve Ggamma ($G\gamma$) alt birimlerinden oluşan membrana bağlı heterotrimerler GPCR'lerin hücre içi yüzeyleriyle yakından ilişkilidir. Bu alt birimler ilgili gen aileleri tarafından kodlanır. G-protein eşleşmiş reseptörler öncelikle $G\alpha$ ve $G\beta\gamma$ alt birimlerinden oluşan G protein

heterotrimerlerini aktive ederek sinyalleri iletir. Guanozin difosfata bağılı $G\alpha$ alt birimleri, $G\beta\gamma$ 'nın zorunlu heterodimerine sıkıca bağlanır. Bu ilişki $G\alpha$ 'nın plazma membranına lokalizasyonuna yardımcı olur (Chen ve Manning, 2001) ve GPCR'lerin işlevsel bağlantısı için gereklidir (Robillard ve ark., 2000). Olfaktör reseptör ailesi insanlarda yaklaşık 900, sıçanlarda 1200 ve farelerde 1500 genden oluşan en büyük gen havuzlarından birine sahiptir. Dolayısıyla OR'ler insan ve fare genomlarında bilinen en büyük gen ailelerinden biridir ve tüm genlerin %3-5'ini temsil eder (Niimura, 2009).

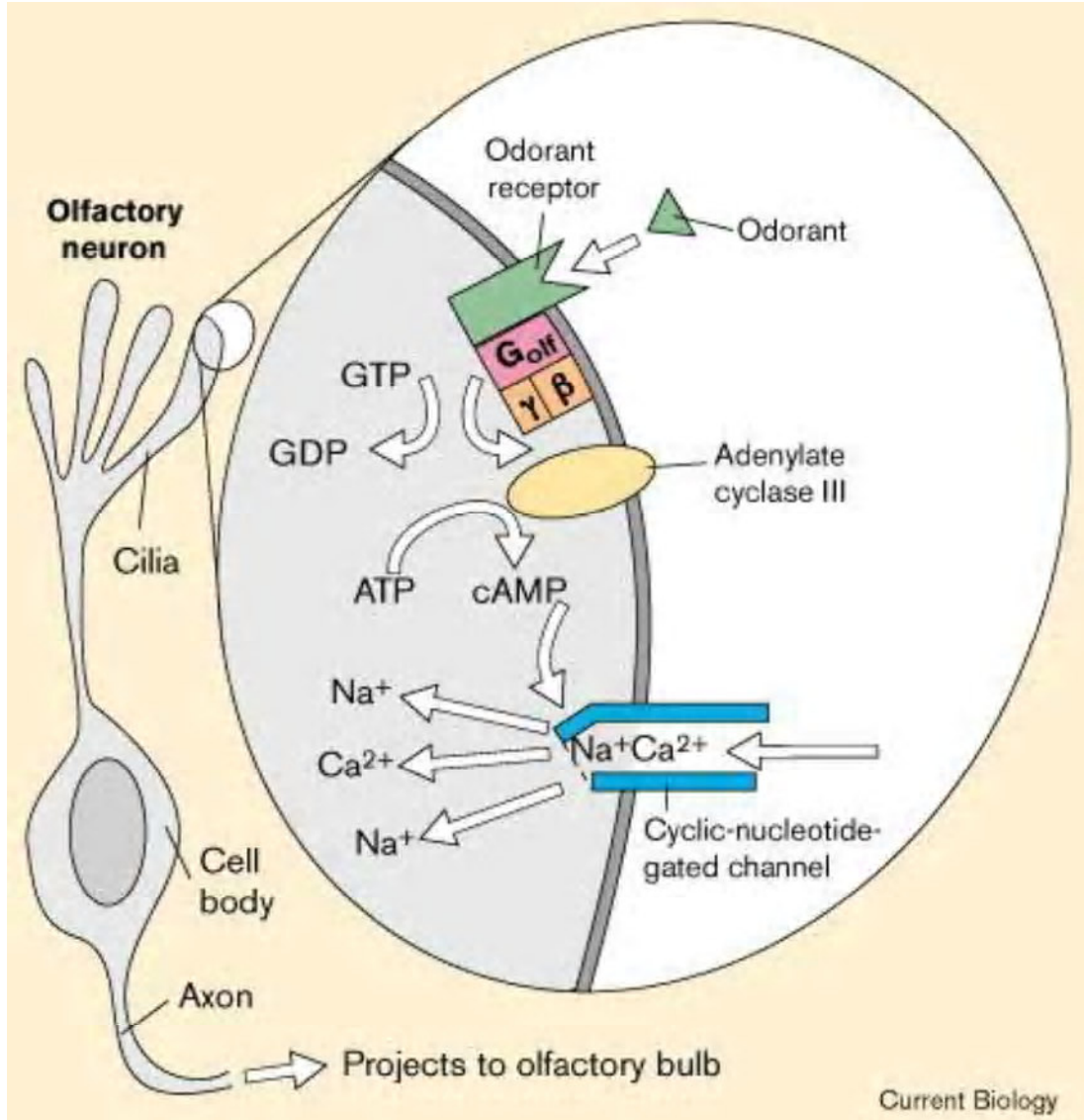


Şekil 2.7. Olfaktör reseptör nöronun transmisyon elektron mikrofrafı (TEM). (https://media.sciencephoto.com/image/c0153276/800wm/C0153276-Smell_receptor_TEM.jpg. Erişim tarihi: 09 Mayıs 2023).

Koku reseptörleri belirli ligandları bağlamak yerine bir dizi koku molekülüne afinite gösterir ve tersine tek bir koku molekülü, moleküllerin moleküler hacimleri gibi fizyokimyasal özelliklerine bağlı olarak değişen afinitelerle bir dizi koku reseptörüne bağlanabilir (Buck, 2004).

Koku algısı, ORN'lerdeki OR'lerin aktivasyonu ile başlar. Olfaktör reseptörler, GNAL (Golf, G alfa olf) alfa alt birimi, GNB1 (beta alt birimi) ve GNG13 (gama alt birimi) içeren trimerik G protein kompleksleri ile ilişkilidir. Kokuya maruz kalındığında bir koku maddesinin bir OR'ye bağlanması, üç ana sinyal proteininin sıralı aktivasyonu yoluyla bir elektrik sinyaline dönüştürülür. Koku maddesinin reseptöre bağlanması, plazma membran reseptörlerinin konformasyonunu değiştirir.

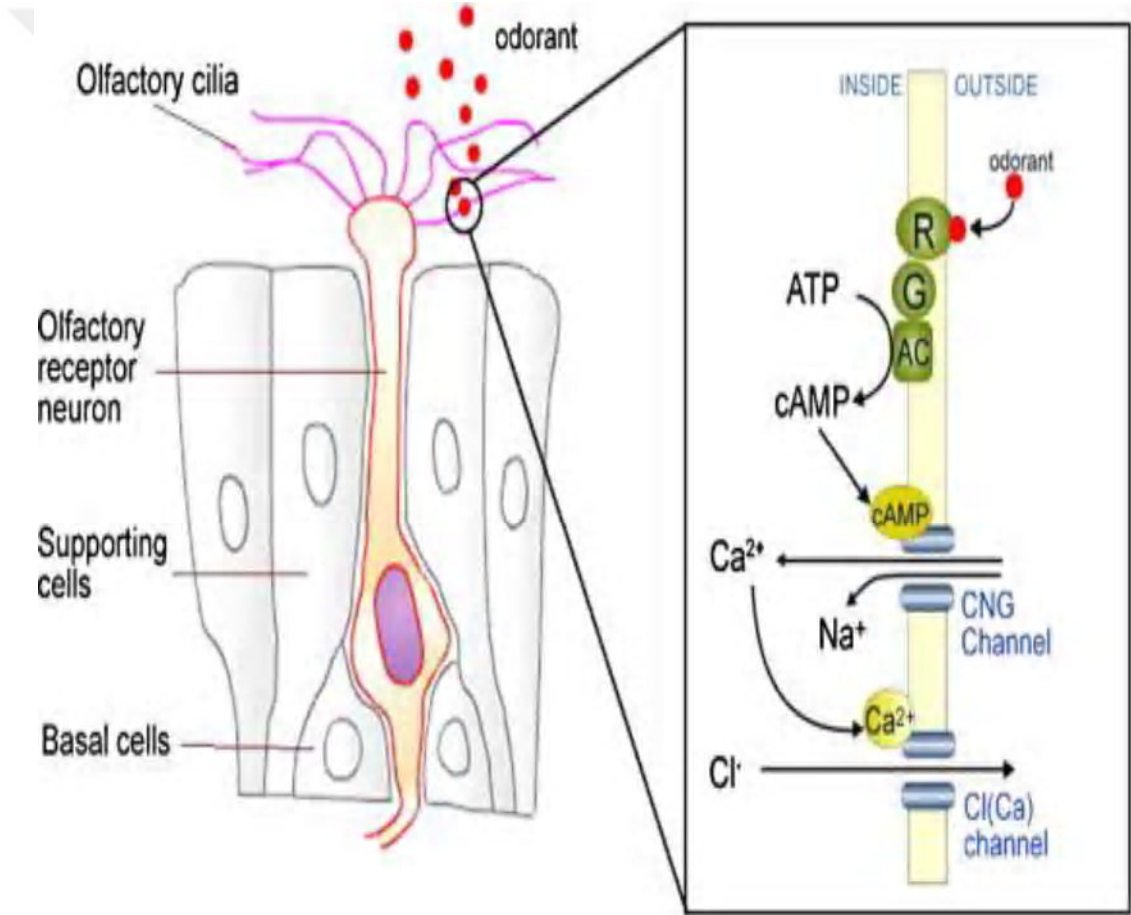
Aktive olan reseptörler, çoklu trimerik G proteinleri üzerinde GDP'nin GTP'ye değişimini katalize ederek uyarıcı G proteininin (Gs proteini) olfaktör izoformu olan olfaktör spesifik G-proteininin (G α olf) G β ve G γ 'dan ayrılmasına neden olur (Bakalyar ve Reed, 1990). Bu G α olf'u aktifleştirir (Şekil 2.8.). Aktifleşen her bir G α olf sırayla ATP'yi cAMP'ye dönüştüren adenilsiklaz tip III (ACIII)'ü aktive ederek hücre içi cAMP konsantrasyonunda bir artışa neden olur (Jones ve Reed, 1989; Takeuchi ve Kurahashi, 2003). Siklik adenosin monofosfat seviyelerindeki hücre içi artış daha sonra Na⁺ ve Ca²⁺'nın mukustan siliyer lümene akmasına izin veren ve böylece siliyer membranı depolarize eden siklik nükleotid kapılı (CNG) katyon kanallarını açarak hücre içinde Ca²⁺ ve Na⁺ akışına neden olur (Bradley ve Frings, 2005; Kaupp, 2010). Sonuçta ortaya çıkan Na⁺ ve Ca²⁺ akışı plazma membranını depolarize eder ve sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonunu ([Ca²⁺]_i) yükseltir (Şekil 2.8.; Şekil 2.9.). Siklik nükleotid kapılı kanalları tarafından gerçekleştirilen ilk depolarizasyonu ek bir önemli amplifikasyon adımı takip eder. Kalsiyum 2+ seviyesindeki artış Ca²⁺ ile aktive olan Cl⁻ kanallarının (CACC) açılmasına neden olarak Cl⁻ çıkışına izin verir. Bu anyon akışı, membran potansiyellerinin daha fazla depolarizasyonuna ve nihayetinde aksiyon potansiyeli oluşumuna yol açar (Bhandawat ve ark., 2005; Imai ve Sakano, 2008). Sinyal iletim kademesinin tüm bu bileşenleri, ana olfaktör epiteli kaplayan mukus içine gömülü olan duyuşal silyumlarda lokalize olur. Bu silyumlar koku maddeleri için geniş bir etkileşim yüzeyi sağlar. Silyumlardaki artan Ca²⁺ seviyesi ORN'lerin sadece aktivasyonuna değil aynı zamanda duyarsızlaştırılmasına da aracılık eder (Menini, 1999; Rinaldi, 2007).



Şekil 2.8. Fare koku alma sinyal iletim kaskadı. Koku reseptörüne bağlanan koku Golf'ü aktive eder. Aktive olan Golf daha sonra G $\beta\gamma$ 'dan ayrılır ve adenilat siklaz III'ü aktive ederek hücre içi cAMP konsantrasyonunda bir artışa yol açar ve bu da siklik nükleotid kapılı kanalları açar. Bunun sonucunda ortaya çıkan Na⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının akışı, beyne sinyal göndermek üzere birincil nöronun aksonundan aşağıya doğru ilerleyen bir aksiyon potansiyelini oluşturur (Ebrahimi ve Chess, 1998).

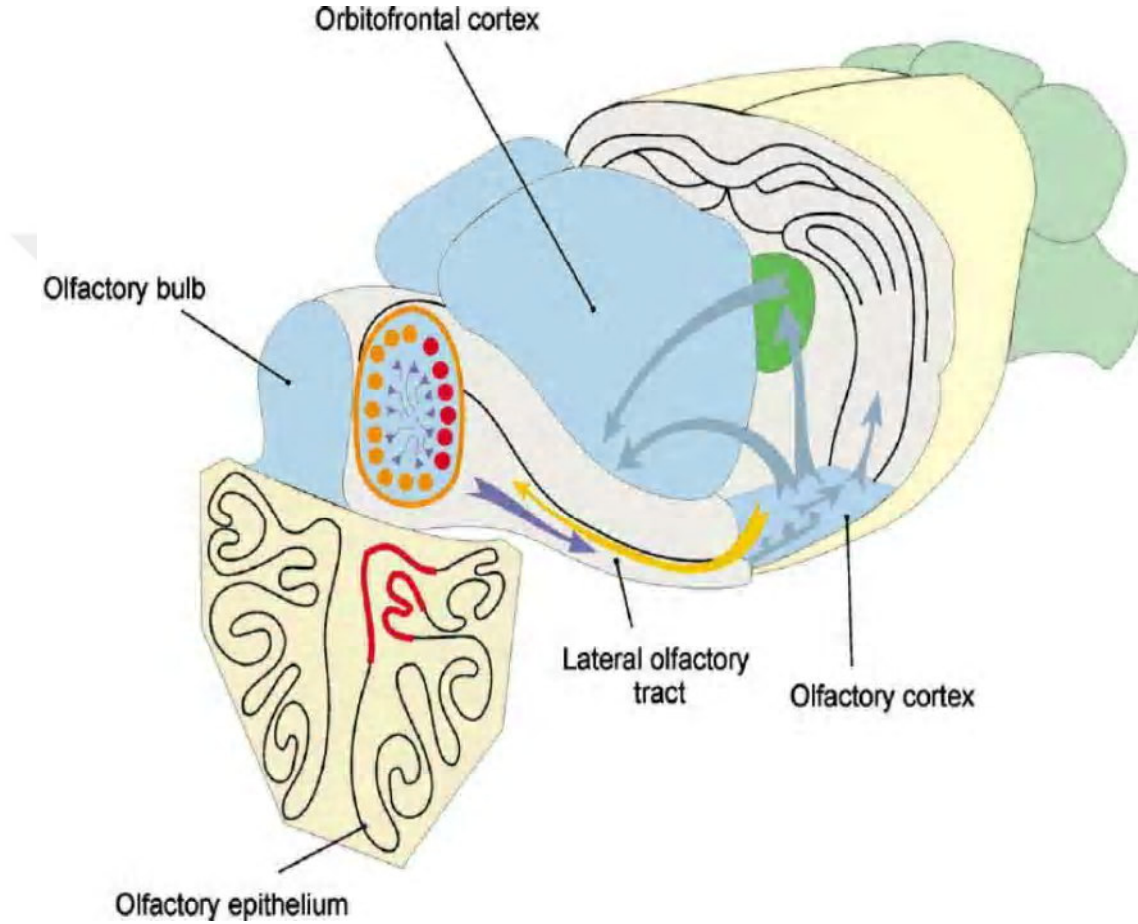
Aksiyon potansiyeli frekansı spesifik koku moleküllerinin konsantrasyonu ile orantılıdır. Bununla birlikte, aksiyon potansiyeli frekansı, reseptörün adaptasyonu veya duyarsızlaştırılması ve cAMP üretimindeki azalma ile zayıflayacaktır. Koku maddelerinin hızlı adaptasyonu ve uzaklaştırılması, bir sonraki solunum döngüsünde solunan yeni aromaların tanınmasına ve ayırt edilmesine izin verir. Aktive olmuş ORN'lerin aksonları kribriform plakadan geçer ve OB'de olfaktör sinir telleri katmanını oluşturur. Bu aksonların akson terminallerinde üretilen aksiyon potansiyelleri OB içindeki glomerüllere yayılır. Glomerüller birkaç bin ORN'nin

akson terminallerinin büyük mitral hücreler ve püsküllü hücrelerden gelen çok sayıda dendrit ile sinaps yaptığı bir bölgedir. Olfaktör reseptör nöronlarının aksonları ile OB'nin özelleşmiş hücreleri arasındaki bu yakınlaşma/uzaklaşma mitral hücrelerin dendritlerinde uyarıcı postsinaptik potansiyeller (EPSP'ler) ve ardından aksiyon potansiyelleri oluşturur. Periglomerüler hücreler tarafından yapılan lateral inhibisyon, diğer mitral ve püskül hücreleri tarafından innerve edilen komşu glomerüllerdeki aktiviteyi modüle eder. Mitral ve püsküllü hücrelerin aksonları olfaktör trakta kaudal olarak projekte olur, birbirinden ayrılır ve anteriyör olfaktör nükleus (AON) nöronları ile sinaps yapar. Ön koku alma çekirdeğinden gelen aksonlar anterior komissür yoluyla hemisferin karşı tarafına geçer.



Şekil 2.9. Olfaktör reseptör nöronu ve silyumlardaki iyon kanalları. Bir koku molekülü siliyer membrandaki bir reseptör proteine (R) bağlandığında, bir G proteini (G) aktive olur ve adenililsiklaz (AC) tarafından ATP'den cAMP üretiminde bir artışa yol açar. Olfaktör siklik nükleotid kapılı (CNG) kanallar Na⁺ ve Ca²⁺'ı sillere iletir. Ca²⁺ da Ca²⁺ ile aktive olan Cl⁻[Cl (Ca)] kanallarını açar, bu da hücre içi Cl⁻ konsantrasyonu yüksek olduğu için Cl⁻ akışına ve nöronun daha fazla depolarizasyonuna yol açar (Liu ve ark., 2010).

OB'den gelen aksonların çoğu lateral olarak ayrılır ve olfaktör korteksin nükleusları ile sinaps yapan lateral olfaktör yolu oluşturur (Şekil 2.10.). Bunlar piriform korteks (PC), periamigdaloid korteks, amigdalanın bir kısmı ve hipokampüstür (Carleton ve ark., 2002). Olfaktör bulbusdan talamusa doğrudan aktarım yoktur, ancak birkaç sinir teli, ipsilateral serebral hemisfere yansıtılan talamik dorsomedial nükleusdaki 3. derece duyuşal nöronlarla sinaps yapar (Courtiol ve Wilson 2015).



Şekil 2.10. Koku alma nöral yolu. Nazal fossanın koronal görünümü, doğrudan merkezi sinir sisteminin ana OB'ye projekte olan olfaktör duyu epitelini göstermektedir. Koku almada ilk adım olfaktör epitelde gerçekleşir. Olfaktör epitel, koku moleküllerini (odorantlar) tespit eden olfaktör reseptör nöronlar (ORN) içerir. Koku molekülleri ve çevresel maddeler burun deliklerinden girer ve ORN'lerdeki reseptörleri ve iyi karakterize edilmiş bir sinyal iletim kaskadını aktive eder. Kokuyla uyarılan aksiyon potansiyelleri bu duyuşal nöronların aksonları boyunca merkezi sinir sistemine yayılır ve burada sinyaller projeksiyon nöronları tarafından iletilir. Dolayısıyla, koku işleme için ikinci adım, bu duyuşal bilgileri kodlamak için duyuşal nöron projeksiyonlarını alan ana OB'de gerçekleşir. OB'deki mitral ve püsküllü hücrelerin aksonları lateral koku yolunu oluşturur ve olfaktör korteksdeki nöronlar üzerinde sinaps yapar. Bu korteks daha sonra sırasıyla piriform ve entorhinal kortekse karşılık gelen primer ve aksesuar koku korteksine ve talamusun medial dorsal nükleusuna (yeşil) projeksiyon yapar. Son işlem, bu beyin yapılarında gerçekleşir. Bu kortikal ve talamik bölgelerin birlikte kokuların bilinçli algılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Carleton ve ark., 2002).

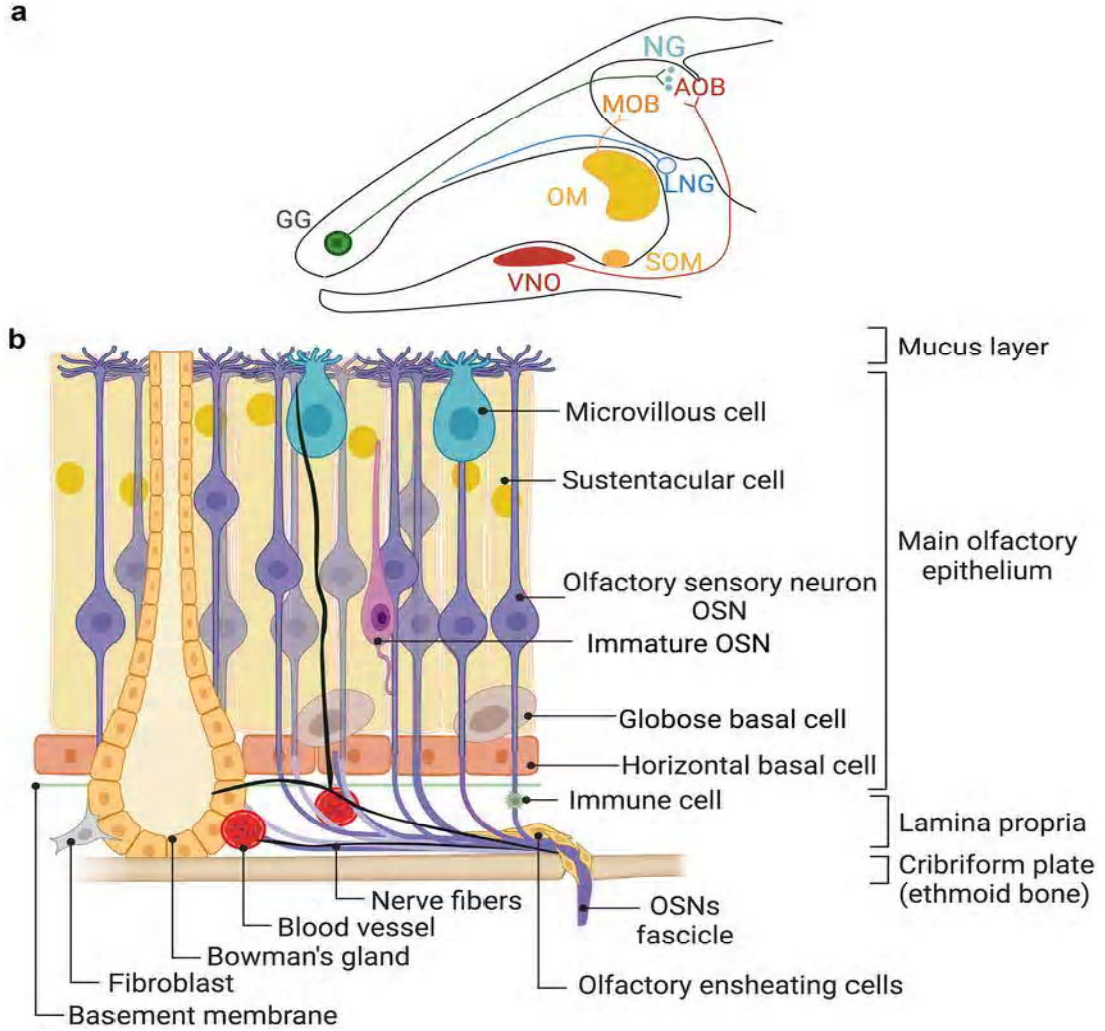
b) Sustentaküler (destek) hücreler, büyük dikey olarak uzamış ökromatik çekirdekleri ve çok sayıda uzun mikrovillusları olan düzensiz prizmatik hücrelerdir (Polyzonis ve ark., 1979; Weiler ve Farbman, 1998) (Şekil 2.11.). Sustentaküler hücre sitoplazmaları birçok mitokondri, granüler ve agranüler endoplazmik retikulum içerir (Weiler ve Farbman, 1998). Birçok bulgu, sustentaküler hücrelerin ORN homeostazı ve proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Sustentaküler hücreler ve ORN'ler arasındaki sıkı bağlantıların keşfi ve fare sustentaküler hücrelerinde karmaşık kalsiyum sinyali de buna dahildir (Hegg ve ark., 2009; Morrison ve Costanzo, 1990).

c) Bazal hücreler: Yaşam boyunca ORN'lerin ve destek hücrelerinin sürekli olarak kaybedilmesi ve değiştirilmesinin normal bir süreç olduğuna ve bazal membranın üzerinde yer alan bazal hücrelerin olfaktör epitelde yeni nöral ve destek hücreleri oluşturmak üzere bölünen kök hücreler olduğuna inanılmaktadır (Caggiano ve ark., 1994; Farbman, 1994; Schwob, 2005). Sıçanda “küçük küresel (globose) bazal hücreler (GBC'ler)” ve “yatay (horizontal) bazal hücreler (HBC'ler)” olmak üzere bazal hücrelerin iki tipi olduğu ve olgun ve olgunlaşmamış ORN'lerin apikal yüzeye daha yakın olgun hücrelerle oldukça laminar bir şekilde organize olduğu iyi bilinmektedir (Şekil 2.11.). Ancak insanda, morfolojik olarak sıçandaki GBC'lere benzeyen tek bir bazal hücre tipi olduğu görülmektedir. Bu hücreler genellikle 5-7 µm çapındadır ve elektron mikroskobu ile incelendiğinde pürüzlü bir hücre yüzeye sahip oldukları gözlenir (Hahn ve ark., 2005).

Horizontal bazal hücreler olfaktör epitelin en derininde ve bazal membrana en yakın konumda yer alır ve düz bir morfolojiye sahiptir (Lindsay ve ark., 2010) (Şekil 2.11.). Nispeten durgundurlar ve sadece ara sıra bölünerek GBC'lere dönüştükleri düşünülmektedir. Bunların da daha sonra ORN'lere ve sustentaküler hücrelere farklılaştıkları varsayılmaktadır (Duggan ve Ngai, 2007; Leung ve ark., 2007; Weissman, 2000). Olfaktör epitelde ciddi hasar olması durumunda, HBC'lerin daha sık bölünerek birden fazla hücre tipine farklılaştığı da tespit edilmiştir (Duggan ve Ngai, 2007; Leung ve ark., 2007).

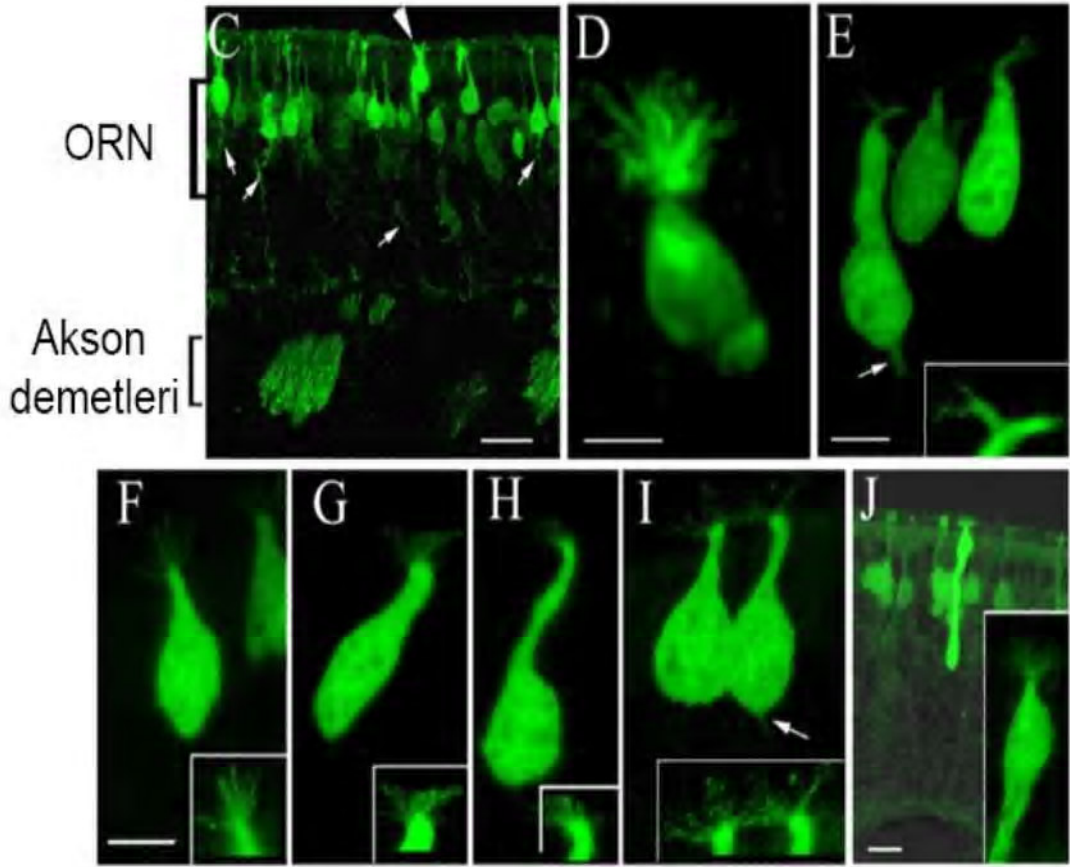
Küresel bazal hücreler (GBH), HBC'lerin üzerinde yer alır ve daha yuvarlak bir morfolojiye sahiptir (Lindsay ve ark., 2010) (Şekil 2.11.). Hayvan modellerinde,

GBH'lerin lezyondan sonra epitelin rejenerasyonu için gerekli olduğu bulunmuştur (Jang ve ark., 2003). Olfaktör epitelde nöronal ve destek hücrelerine farklılaşma yetenekleri, bunların multipotent hücreler olduklarını kanıtlamaktadır (Chen ve ark., 2004).



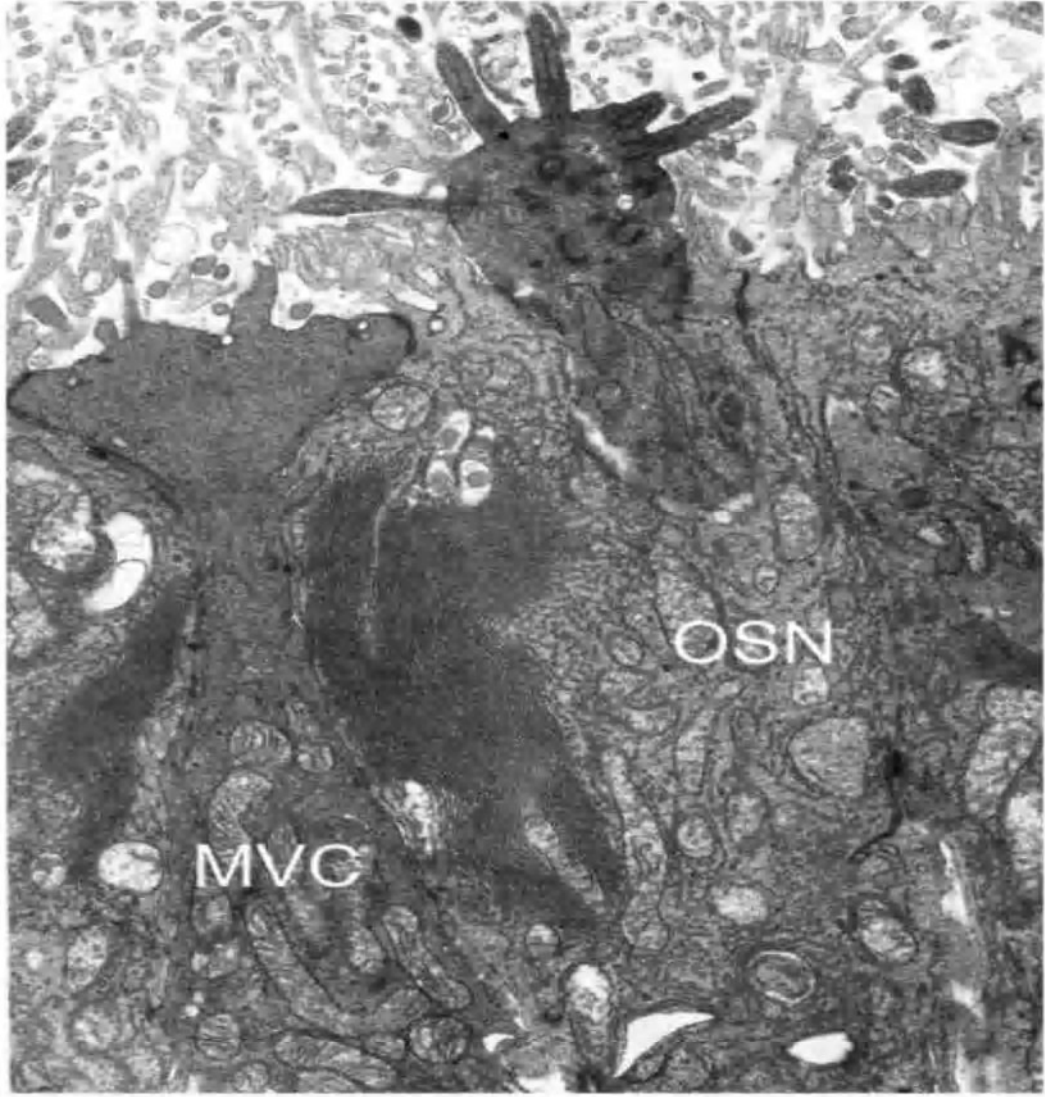
Şekil 2.11. Fare olfaktör (koku alma) sistemi. (a) Kemosenör alt sistemleriyle birlikte fare kafatasının görünümü. GG, Grueneberg gangliyonu; OM, olfaktör mukoza; SOM, Masera'nın septal organı (Memeli burnunda gözlenen farklı bir kemosenör organ olan septal organ, esasen nazal septumun ventral tabanında iki taraflı olarak bulunan küçük bir kemosenör nöroepitel adasıdır); VNO, vomeronazal organ; MOB, ana bulbus olfaktoryus; AOB, aksesuar bulbus olfaktoryus; LNG, lateral burun bezleri; NG, glomerül dizileri. (b) Olfaktör mukozada (OM) mukusu, olfaktör epitel ve lamina propriayı oluşturan hücrelerin şematik diyagramı. Ana olfaktör epitel olfaktör reseptör nöronlar (OSN'ler), mikrovillar ve sustentaküler hücreler ve bunların öncü bazal hücrelerinden oluşur. Horizontal ve küresel bazal hücreler olfaktör epitelin (OE) kök hücreleridir. Olgunlaşmamış sustentaküler hücreler ve iki farklı mikrovillöz hücre tipi diyagramda gösterilmemiştir. Bir bazal membran, koku epitelini esas olarak Bowman bezleri, sinir telleri, olfaktör gliya hücreleri (Olfactory ensheathing cells, OECs), kan damarları ve yerleşik bağışıklık hücrelerinden oluşan lamina propriyadan ayırır (Abaffy ve ark., 2023).

d) Mikrovillar hücrelerin somaları, epitelin sustentaküler hücrelerin çekirdeklerinin bulunduğu yüzeysel (apikal) tabakasında yer alır ve morfolojik olarak çeşitlilik gösterirler. Farede mikrovillar hücreler, genellikle yaklaşık 20 µm uzunluğunda olup ORN'lerden ve sustentaküler hücrelerden daha kısadırlar. Bir şişeye veya armuta benzeyen şekilleri, hücreden hücreye değişir. Yeşil floresan protein (GFP) eksprese eden bu hücrelerin çoğu bipolar ORN'ler için tipik olan dendritik düğümler (koku topuzları) ve silyumlar taşımaz. Bunun yerine bu hücreler apekslerinde mukus tabakasına uzanan ve ışık mikroskobu altında farklı morfoloji sergileyen mikrovillus benzeri uzantılara sahiptir (Lin ve ark., 2008) (Şekil 2.12.). Elektron mikroskopik çalışmalar apikal mikrovillusların farklı şekil, uzunluk ve çaplarda olabileceğini, sitoplazmalarının ise elektron-şeffaf ya da opak olabileceğini ortaya koymuştur (Jourdan, 1975; Rowley ve ark., 1989) (Şekil 2.13.). Mikrovillar hücreler, bir tür nörona özgü protein olan spot-35 proteinleri için pozitifdir (Yamagishi ve ark., 1992). İnce bir akson benzeri sitoplazmik uzantı bu hücrelerin bazal kutbundan uzanır ve epitel boyunca lamina propriaya doğru ilerleyerek bipolar bir morfoloji oluşturur (Moran ve ark., 1982) (Şekil 2.11.). Bazı mikrovillar hücrelerin OB'ye ince aksonlar gönderdiği bildirilmiştir (Rowley ve ark., 1989). Mikrovillar hücrelerin koku mukozasındaki morfolojik olarak farklı ikinci bir kemoreseptör hücre tipi olduğu kabul edilmekle birlikte (Moran ve ark., 1982; Rowley ve ark., 1989; Yamagishi ve ark., 1992), işlevi tam olarak anlaşılmamıştır. Bu hücrelerin kaybının koku alma işlevini etkilemediği (Miller ve ark., 1995), ayrıca, bazı mikrovillar hücrelerin nöronal kökenli olmadığı ve aksonlar taşımadığı gösterilmiştir (Asan ve Drenckhahn, 2005; Carr ve ark., 1991; Lin ve ark., 2008). Lin ve ark. (2008) farede bu hücrelerin kemosenzoriyel transdüksiyon açısından TRPM5 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 5) eksprese eden ORN'lere ve nazal soliter kemosenzoriyel hücrelere benzemediğini göstermiştir. Ayrıca Genovese ve ark. (2018) TRPM5-pozitif mikrovillar hücrelerin koku nöronları olmadığını, moleküler ve işlevsel olarak sustentaküler hücreler ile neredeyse aynı olduğunu ve etkilerinin de olfaktör epitelinin korunmasıyla sınırlı olabileceğini bildirmiştir.



Şekil 2.12. Fare olfaktör epitelinin mikrovillöz hücrelerinde yeşil floresan protein (GFP) ekspresyonu. C. GFP-eksprese eden hücreler olfaktör epitelin en yüzeysel katmanında yer almaktadır. Ok başı bir mikrovillöz hücreyi işaret etmektedir. Buna karşılık, GFP eksprese eden ORN'ler olfaktör sinir teli demetlerini oluşturan aksonlara sahiptir (oklar). D-I. Çeşitli hücre şekilleri ve apikal uzantılara sahip GFP eksprese eden mikrovillöz hücrelerin temsili görüntüleri. Bu hücreler Dalgalı (D), dalı (E), sert ve yayılan (F ve G), kısa fırça benzeri (H) veya nispeten ince (I) olabilen yoğunluğu artırılmış apikal mikrovilluslara sahiptir. Bazı hücrelerde kısa bazal uzantılar görülmesine rağmen bu hücrelerde akson yoktur (E ve I'daki oklar). J. Epitelin yarısına kadar uzanan nispeten kalın ve daha uzun bir bazal uzantıya sahip nadir görülen bir mikrovillöz hücre tipi. Ölçekler: C ve J, 20 μ m; D-I, 5 μ m (Lin ve ark., 2008).

e) Beşinci tip hücre Ota (1998), tarafından bulbus olfaktoryus rezeksiyonunu takiben koku silyumlarının kaybolmasından sonra keşfedilmiştir. Transmisyon elektron mikroskobu ile incelendiğinde bu hücrelerin mikrovillar hücrelerdekinin aksine (mikrovillar hücrenin mikrovillusları kıvrımlıdır) güçlü ve düz olan parmak benzeri mikrovilluslara sahip olduğu ve mikrovilluslarının mikrovillar hücrelerde bulunmayan mikrofilament demetlerinden oluşan spesifik bir kor yapısı ile karakterize olduğu gözlenmiştir. Bu araştırmacının taramalı elektron mikroskop (SEM) gözlemlerine göre, normal koku epitelinde ne mikrovillar hücreye, ne de beşinci tip hücreye rastlanmamıştır.



Şekil 2.13. Sıçanda bir mikrovillar koku hücresinin (MVC) ve tipik bir olfaktör reseptör nöronunun (OSN) apikal kutuplarını gösteren elektron mikrograf (Jourdan, 1975).

Olfaktör bulbus rezeksiyonu sonucunda olfaktör siliyal mat kaybolduğunda, beşinci tip hücrenin gözlemlenebilir hale geldiği, rezeksiyondan sonraki 300. günde, ORN'ların kaybolduğu ve destek hücrelerinin mikrovilluslarının kısaldığı tespit edilmiştir. Böylece, mikrovillar hücrenin yüzey yapısının açıkça gözlemlenebilir hale geldiği, mikrovilluslarının beşinci tip hücreninkilerden daha kısa olduğu ve radyal olarak dağıldığı bildirilmiştir. Her iki hücre tipinin de OB rezeksiyonundan etkilenmediği ortaya konmuştur. Ota (1998), bu sonuçlara dayanarak beşinci tip hücrenin koku alma sistemi dışında bir sistem için mekanoreseptör olduğunu ve mikrovillar hücrenin de erken evrede ya da ölüme yakın son evrede bir tür destek hücresi olarak işlev gördüğünü ileri sürmüştür.

Olfaktör mukozanın lamina propriyası, kan damarlarını oluşturan endotel hücreleri, duysal nöronların miyelin kılıflarını oluşturan Schwann hücreleri, Bowman bezlerinin glandüler hücreleri ve son yıllarda önemli bir ilgi odağı haline gelen kök hücreler dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipini içerir. Lamina propria kaynaklı kök hücrelerin in vitro ve in vivo olarak nöral olan ve olmayan hücre tiplerine farklılaştığı gösterilmiştir (Murrell ve ark., 2005). İmmün belirteçler ve akış sitometrisi de bu hücrelerin nöral kök hücreler ve hematopoetik kök hücrelerle çok az ortak noktası olduğunu göstermektedir (Delorme ve ark., 2010). Bowman bezlerinin olfaktör epitelin altında yer alan ve dar kanallar aracılığıyla epitel yüzeyine salgı yapan dallanmış tubuloalveolar yapılar olduğu bilinmektedir (Escada ve ark., 2009). Olfaktör reseptör nöronların dendritik uçlarını ve silyumlarını yıkayarak duysal reseptörlere koku difüzyonu sağlamanın yanı sıra, salgının önemli immünolojik işlevler üstlendiği öne sürülmektedir. İmmünglobülün A (IgA), immünglobülün M (IgM) ve J zinciri dahil olmak üzere salgısal bağışıklık sisteminin bileşenleri Bowman bezlerinin asiner ve kanal hücrelerinde ve mukosiliyer komplekste saptanmıştır (Mellert ve ark., 1992). Ayrıca iki antimikrobiyal protein olan laktoferrin ve lizozim de bulunmuştur (Mellert ve ark., 1992).

2.2.1.3. Grueneberg (Grüneberg) Gangliyonu

Grüneberg gangliyonu, kemirgenlerde burun boşluğunun girişinde bulunan ok şeklindeki nöronal bir yapıdır. Nazal septumun her iki yanında, nazal vestibül içinde, burun deliği açıklıklarının yakınında yer alır. İlk olarak 1973 yılında Hans Grüneberg tarafından tanımlanmıştır (Grüneberg, 1973). Daha sonra yapılan çalışmalarla Grüneberg ganglionunun varlığı farenin (Fleischer ve ark., 2006a; Fleischer ve ark., 2009; Fuss ve ark., 2005; Koos ve Fraser, 2005; Roppolo ve ark., 2006; Storan ve Key, 2006) yanısıra, rat, hamster ve gerbil gibi diğer memelilerde (Brechtbühl ve ark., 2014) de gösterilmiştir. Grüneberg ganglionunun nöronlar ve glial hücreler olmak üzere iki hücre tipinden oluştuğu tespit edilmiştir. Her bir gangliyon da yaklaşık 500 nöron yoğun şekilde paketlenmiş birkaç hücre kümesi halinde düzenlenmiştir. Her bir nöron, kaudale doğru uzanan bir sinir demeti oluşturmak üzere fasiküle olan bir aksona sahiptir. Aksonlar nazal vestibül ve septum boyunca ilerler ve kribriform plakadan geçtikten sonra OB'nin koku kolye kompleksini oluşturan glomerüllerinde sonlanır

(Fuss ve ark., 2005; Koos ve Fraser, 2005). Koku epitelindeki ORN'ler aksonlarını OB'deki bir dizi glomerüle göndererek "ipe dizilmiş boncuk" şeklini oluşturur ve bu nedenle "koku kolye glomerülleri" olarak adlandırılır (Luo, 2008). Farede Grüneberg gangliyonunun embriyonal gelişimin 16. gününde gelişmeye başladığı, doğumda tamamlandığı ve fare yaşamı boyunca varlığını devam ettirdiği bildirilmiştir (Fuss ve ark., 2005). Grueneberg gangliyonu nöronlarının koku alma reseptörlerine (Fleischer ve ark., 2006b; Fleischer ve ark., 2007) ve çok sayıda silyuma sahip olmaları (Brechtbühl ve ark., 2008; Liu ve ark., 2009), aksonlarının da OB'nin koku kolye kompleksiyle (Necklace Olfactory System) bağlantılı olmaları (Fuss ve ark., 2005; Koos ve Fraser, 2005; Roppolo ve ark., 2006) ve ayrıca bu nöronların OMP eksprese etmeleri (Fleischer ve ark., 2006b) Grüneberg gangliyonunun koku yolunun bir bileşeni olduğunu göstermektedir.

Esas olarak, stres altındaki türdeşler tarafından yayılan alarm feromonları (Brechtbühl ve ark., 2008) ve aynı zamanda yırtıcı karnivorların (etoburların) idrarından yayılan kairomonlar gibi tehlikeye işaret eden uçucu bileşiklerin tespitinde rol oynar. Bu bileşiklerin Grüneberg gangliyonu tarafından algılanması alıcıda korku davranışlarına neden olur (Brechtbühl ve ark., 2013). Grüneberg gangliyonu soğuk havalarda da aktive olur (Schmid ve ark., 2010).

2.2.1.4. Masera'nın Septal Organı

Memeli burnunda gözlenen farklı bir kemosensör organ olan Masera'nın septal organı (SO), nazal septumun ventral kısmında bulunan küçük bir olfaktör epitel parçasıdır (Ma ve ark., 2003). Septal organ alanı, sıçanlar cinsel olgunluğa ulaştığında postnatal yaşamın 66-105. günleri arasında maksimum büyüklüğe çıkar ve daha sonra küçülür, ancak sadece erkeklerde önemli ölçüde azalır, bu da rejenerasyon için sınırlı bir nörogenetik kapasitenin göstergesidir. Buna karşılık, ana olfaktör epitelin alanı postnatal yaşamın 300. gününde hala genişlemeye devam eder. Septal organ ile ana olfaktör epiteli ayıran modifiye solunum epiteli (ara epitel) postnatal yaşamın 66. gününe kadar birkaç koku nöronu içerir. Uzunluğu doğum sonrası artar, böylece SO, ana olfaktör epitelin daha ventralinde yer alır. Septal organın diğer anatomik konumu gelişimle birlikte değişse de genel olarak nazopalatin kanalın (NPAL) deliğinin hemen posteriyöründe yer alır. Bu nedenle, SO'nun olası bir işlevi, yalama yoluyla ağza giren

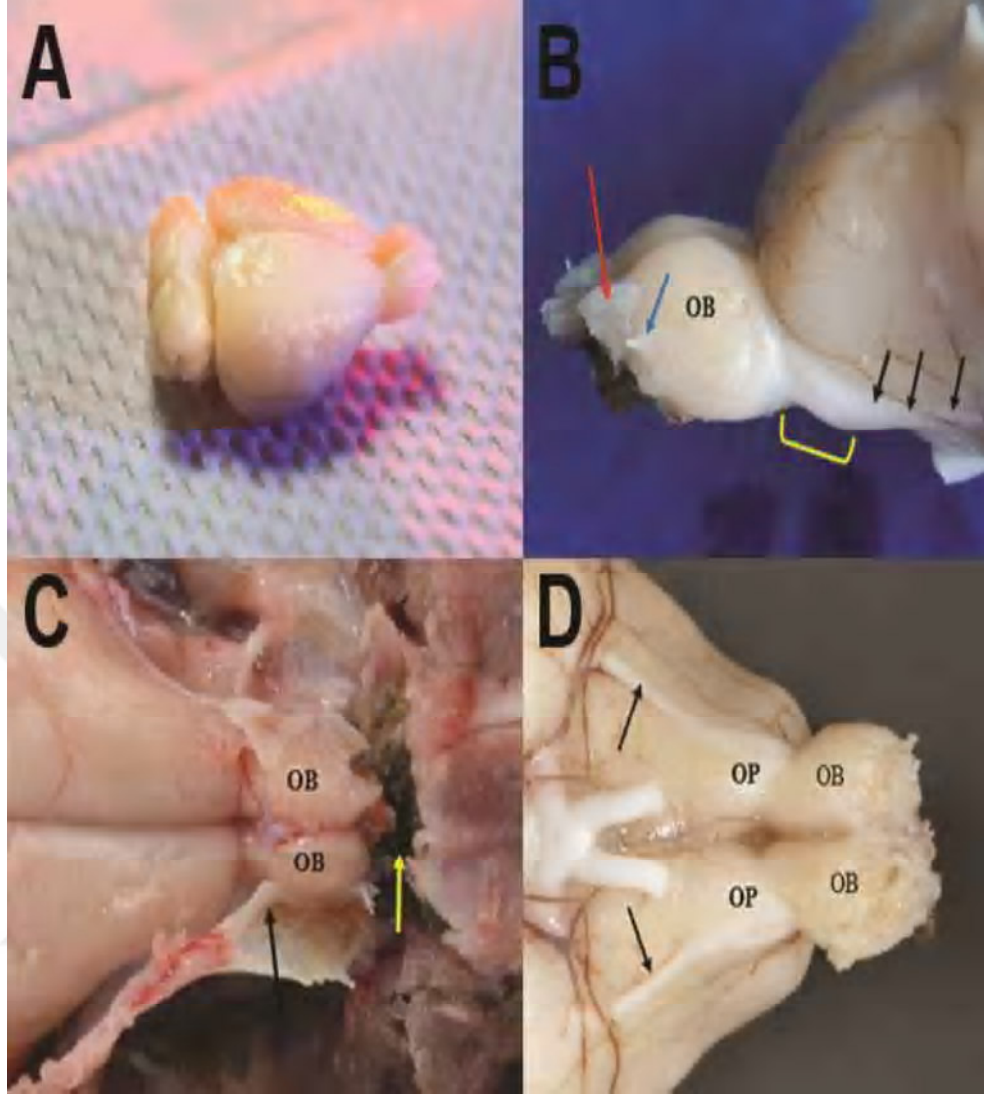
ve daha sonra NPAL yoluyla burun boşluğuna iletilen sıvılardaki kimyasalları algılamaktır. Bu nedenle SO, VNO (vomeronazal organ) gibi sosyal / cinsel davranışa dahil olabilir. SO'nun hem OE (Olfaktör epiteli) hem de VNO'dan biraz farklı özelliklere sahip ayrı bir aksesuar koku alma organı olduğu ve yalnızca NPAL'nin VNO'ya açılmadığı türlerde de bulunabileceği önerilmektedir (Weiler ve Farbman, 2003). Taniguchi ve ark. (1993), golden hamsterde SO'nun bipolar nöronlarını apikal morfolojilerine göre, biri OE'in reseptör nöronlarına ve diğeri vomeronazal duyuşal epitelin (VSE) reseptör nöronlarına benzeyenler olmak üzere iki farklı tipte olduğunu bildirmişlerdir. İlk tip baskındır ve SO'nun ana reseptörleri olarak tanımlanır. Diğeri sayıca daha azdır, ancak aynı zaman da bir tür koku alma reseptörü olarak kabul edilir. Septal organın destek hücrelerinin ultrastrüktürel özellikleri VSE'dekilerden ziyade OE'dekilere benzerken, bazal hücrelerin özellikleri OE, VSE ve SO'da benzerdir. Septal organının ilişkili bezi, olfaktör mukozadaki Bowman bezi gibi hem PAS (Periodik asit Schiff) hem de alsian mavisiyle boyanır ve ultrastrüktürel özellikleri de Bowman bezininkine benzerdir. Bu bulgular, SO'nun OE'ninkine benzer bir koku alma işlevini yerine getirdiğini düşündürmektedir (Taniguchi ve ark., 1993).

2.2.2. Merkezi Olfaktör Sistem

Olfaktör sistemin bu bölümü olfaktör korteks ile olfaktör bulbusdan oluşur. Olfaktör korteks piriform korteks (posteriyör orbitofrontal korteks), amigdala, olfaktör tuberkül ve parahipokampal girus'u içerir (Bywalez, 2016).

Bulbus olfaktoryus (Olfaktör Bulbus, OB)

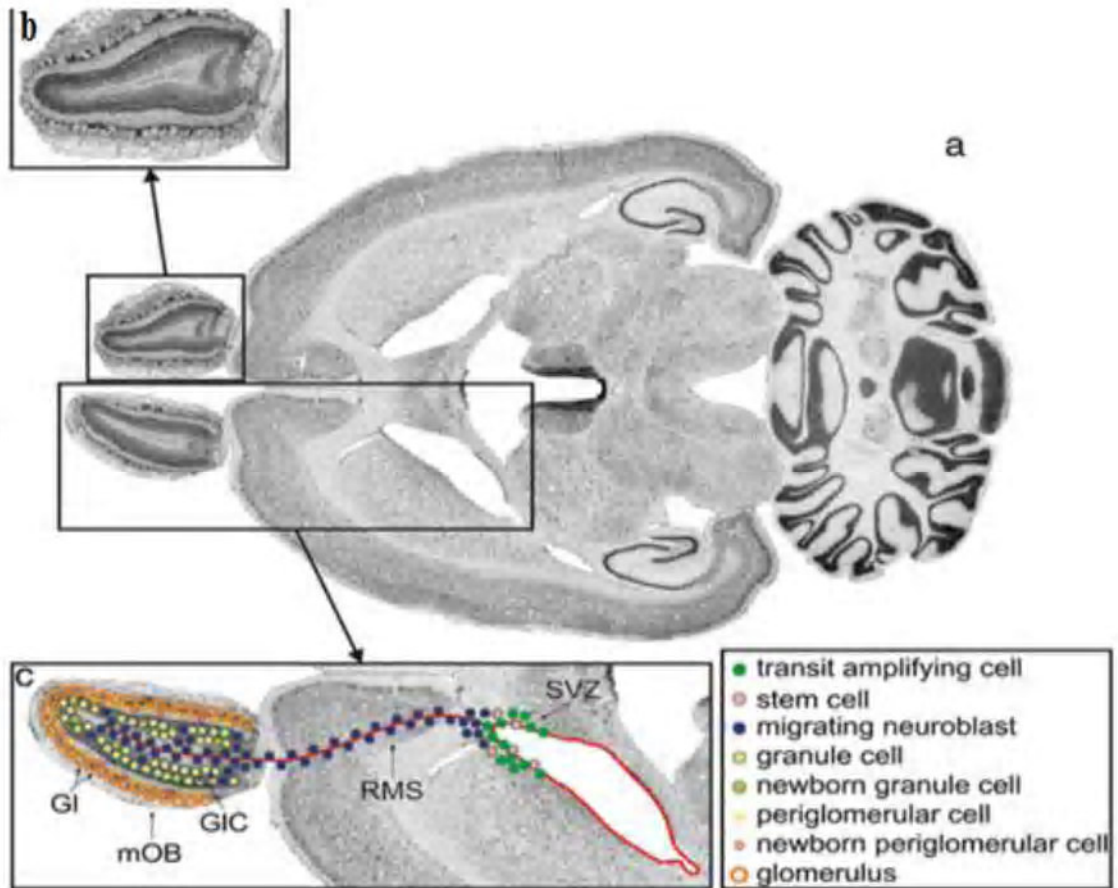
Olfaktör bulbus koku duyusunun alınmasında görevli olup ön beyine ait sinirsel bir yapıdır. Olfaktör bulbus kokuya ilişkin bilgileri amigdala ve orbitofrontal korteks (OFC) ile bellek ve öğrenmede rol oynayan hipokampusa gönderir. Olfaktör bulbus sıçanlarda beynin en rostral kısmıdır (https://t3.ftcdn.net/jpg/03/36/22/74/360_F_336227455_K5liv3HB0huqrgVGdkyRd1MEQuBXR9bb.jpg, Erişim tarihi: 16 Mayıs 2023) (Şekil 2.14.- Şekil 2.16.).



Şekil 2.14. Sığanda (A) Olfaktör Bulbus (OB) (https://t3.ftcdn.net/jpg/03/36/22/74/360_F_336227455_K5liv3HB0huqrgVGdKyRd1MEQuBXR9bb.jpg, Erişim tarihi:16 Mayıs 2023). B: Şiňsilla'da OB'nin yandan görünüşü, kribriform plaka parçası (kırmızı ok), olfaktör fasikül parçası (mavi ok), olfaktör pedinkül (OP, sarı gösterge) ve lateral olfaktör stria (siyah oklar); C: Şiňsilla'da olfaktör fossa ile kraniyal boşluk (siyah ok) ve etmoid kemiğin aboral segmenti (sarı ok) arasındaki sınırı gösteren OB'un dorsalden görünümü; D: Şiňsilla'da OB'nin ventral görünümü, olfaktör pedinkül (OP), olfaktör lateral stria (siyah oklar) (Irimescu ve ark., 2015).



Şekil 2.15. İnsan beyinde Olfaktör Bulbus'un (sarı renktedir) önden ve ventralden görünümü. (<https://scienceofparkinsons.com/tag/olfactory-bulb/>, Erişim tarihi: 16 Mayıs 2023)

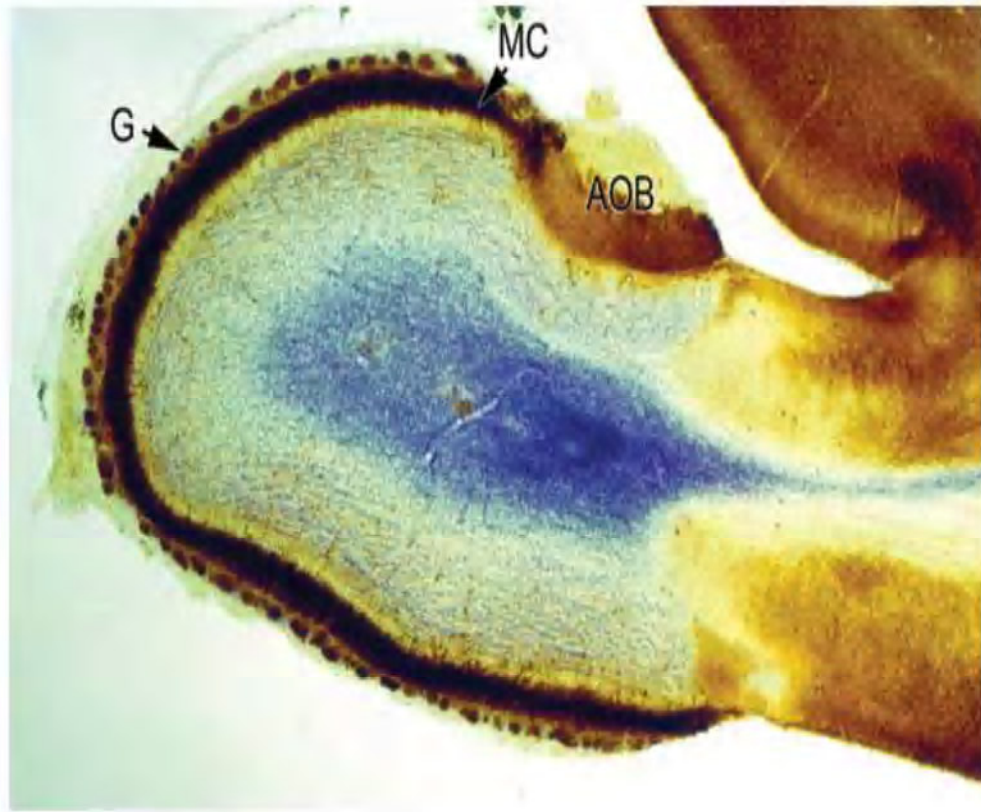


Şekil 2.16. Sığanda beyincik, beyin ve Olfaktör Bulbus'un (OB) horizontal kesiti (a), OB'nin büyütülmüş görüntüsü (b). Öncü koku alma hücrelerinin rostral göç yolu (RMS) aracılığıyla OB'ye göçünün şematik görünümü (Wille ve ark., 2015).

Olfaktör bulbus, uzamış bir soğanı andırır biçimde, histolojik olarak konsantrik halkalar şeklinde düzenlenmiş hücre katmanlarından oluşur (Şekil 2.17.- Şekil 2.20.). Kemirgenlerin (Nagayama ve ark., 2014) ve karnivorların (Ortiz-Leal ve ark., 2022) ana bulbus olfaktoryusu (MOB), altı ana katman şeklinde düzenlenir.

Yüzeyden merkeze doğru sırayla bu katmanlar şunlardır:

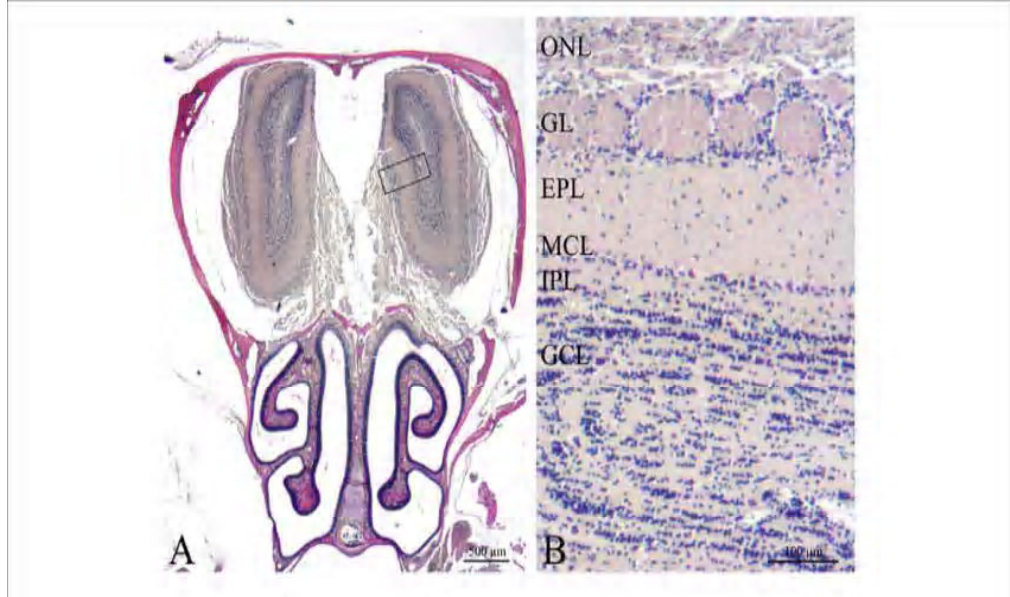
- a. Olfaktör sinir teller katmanı (ONL)
- b. Glomerüler katman (GL)
- c. Dış pleksiform katman (EPL)
- d. Mitral hücre katmanı (MCL)
- e. İç pleksiform katman (IPL)
- f. Granül hücre katmanı (GCL)



Şekil 2.17. On altı günlük bir sıçan beyninin Ana Olfaktör Bulb (MOB) ve Aksesuar Olfaktör Bulbus'un (AOB) sagittal kesit görünümü. GABAA (Gama amino bütirik asit) reseptör 1 antikoru kullanılarak immünohistokimya tekniği ile boyanmıştır. Zıt boyama için Nissl boyaması yapılmıştır (mavi). Ana OB'de burundan beyne iletilen duyuşsal bilgi için ilk aktarım istasyonunu temsil eden glomerüller (G) ve yoğun şekilde etiketlenmiş mitral hücre tabakası (MCL) ile Vomeronazal organdan kemosenşör nöronların projeksiyon yaptığı AOB belirgin şekilde görülmektedir (Elsaesser ve Paysan, 2007).

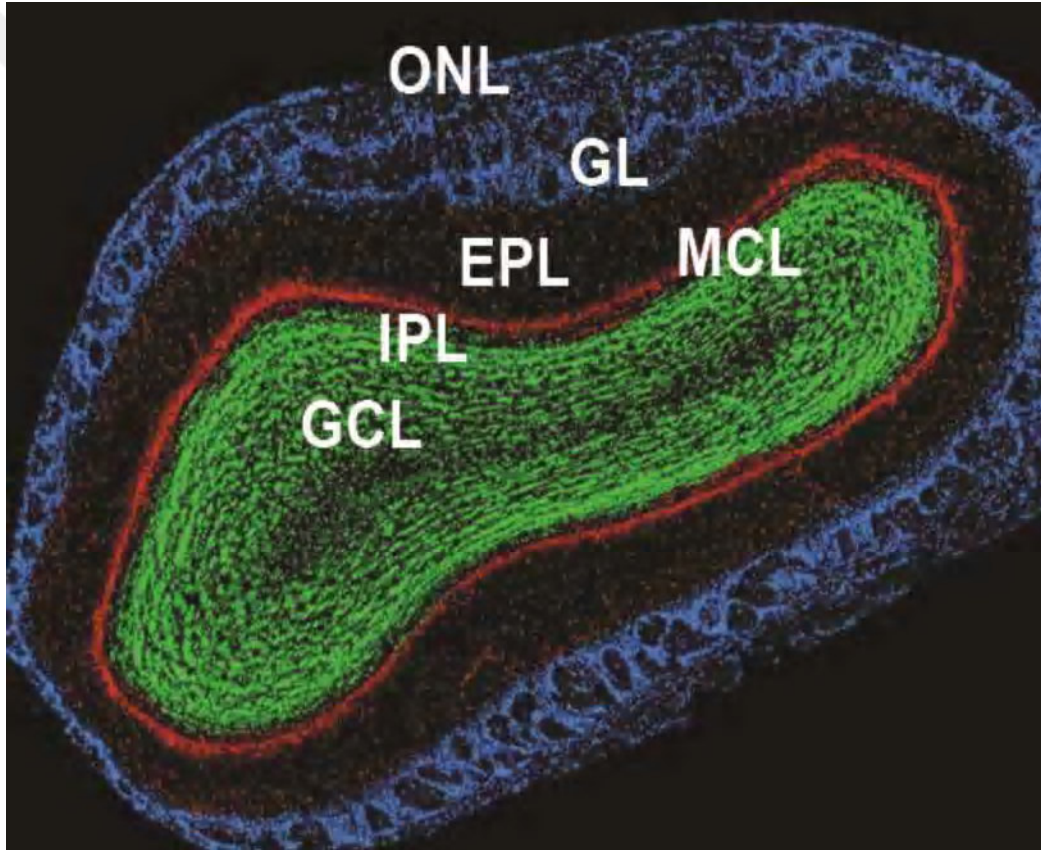


Şekil 2.18. Farede Olfaktör Bulbus'un yatay kesiti. (ONL: Olfaktör Sinir Telleri Katmanı; GL: Glomerüler Katman; EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; IPL: İç Pleksiform Katman; GCL: Granül Hücre Katmanı; AOB: Aksesuar Olfaktör Bulb (Coppola, 2012).



Şekil 2.19. Farede periferik ve merkezi koku alma yapılarına histolojik bakış (H&E). (A) OB'leri barındıran fare ön serebral boşluğunun koronal kesiti ve konkalar ile olfaktör mukozalı septumu içeren burun boşluğu. Dikdörtgen (B)'de büyütülen alanı sınırlamaktadır. ONL: Olfaktör Sinir Telleri Katmanı; GL: Glomerüler Katman; EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; IPL: İç Pleksiform Katman; GCL: Granül Hücre Katmanı. Bar = 500 µm (A), 100 µm (B) (Meyer ve ark., 2018).

1970'lerdeki yoğun Golgi analizleri, her katmandaki nöronların morfolojisini görselleştirmeyi başarmış ve farklı katmanların morfolojik olarak farklı nöronlardan oluştuğunu göstermiştir (Pinching ve Powell, 1971a; Price ve Powell, 1970a). Bu nedenle, OB'deki nöronlar, geleneksel olarak hücre gövdelerinin bulunduğu katmanlara göre kategorize edilmiştir. Bu nöronlar glomerüler katmanda jukstaglomerular (JG) hücreler, dış pleksiform katmanda püsküllü hücreler, mitral hücre katmanında mitral hücreler ve granül hücre katmanında granül hücreler olarak tanımlanmıştır. Son yıllarda yapılan çok sayıda çalışma bu hücre tiplerinin her birinin heterojen doğasını ortaya çıkarmış ve morfolojik, moleküler ve elektrofizyolojik özelliklerdeki farklılıklara dayalı olarak alt sınıflara ayrılmasına olanak sağlamıştır.

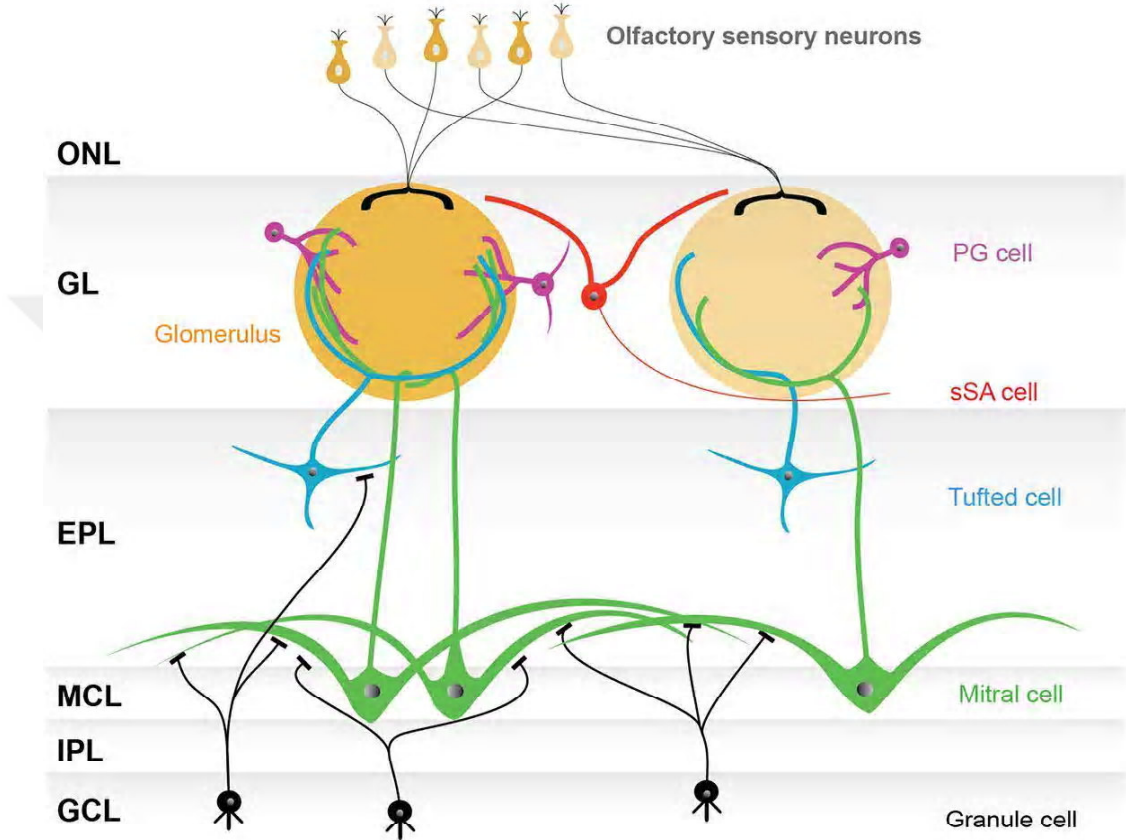


Şekil 2.20. Olfaktör bulbus (OB) katmanları.

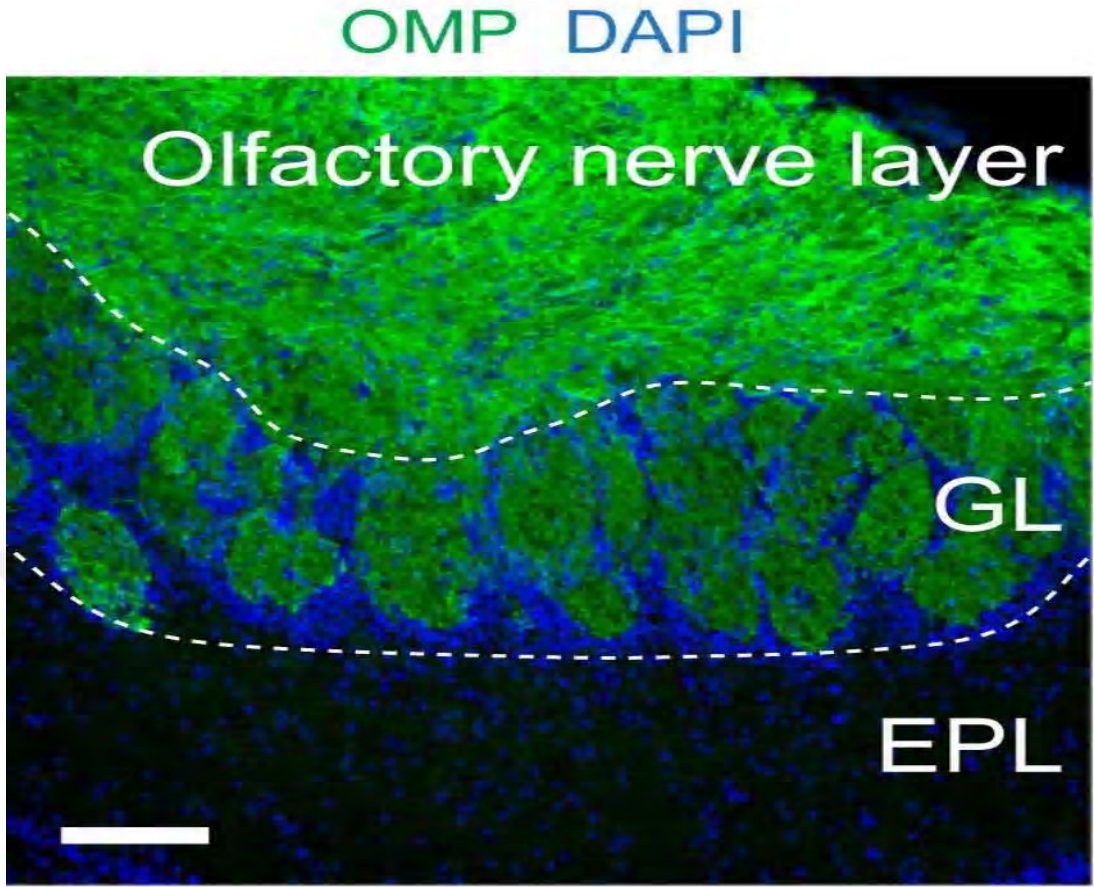
(<https://cdn.thescientist.com/assets/articleNo/67643/hImg/38273/olfactory-bulb-x.webp>, Erişim tarihi: 16 Mayıs 2023).

a. Olfaktör sinir telleri katmanı (ONL): Olfaktör mukozadaki ORN'lerin afferent özellikteki miyelinsiz akson demetleri ile bunlar arasındaki gliya hücrelerinin bulunduğu en dış katmandır. Bu hücrelerin hücre gövdeleri koku alma epiteli içinde yer alır ve aksonları reseptöre özgü glomerüllere dönüşür (Bywalez, 2016). Olfaktör

reseptör nöronlarının aksonları, kokularla ilgili bilgilerin işlendiği yüksek düzeyde organize olmuş OB'ye doğrudan uzanır. Olfaktör reseptör nöronları tarafından algılanan koku bilgisi önce OB'nin glomerüllerinde işlenir. Belirli bir OR tipini ifade eden ORN'ler tipik olarak aksonlarını OB'de biri medialde, diğeri lateralde olmak üzere iki glomerüle gönderir (Imai, 2014) (Şekil 2.21.; Şekil 2.22.).



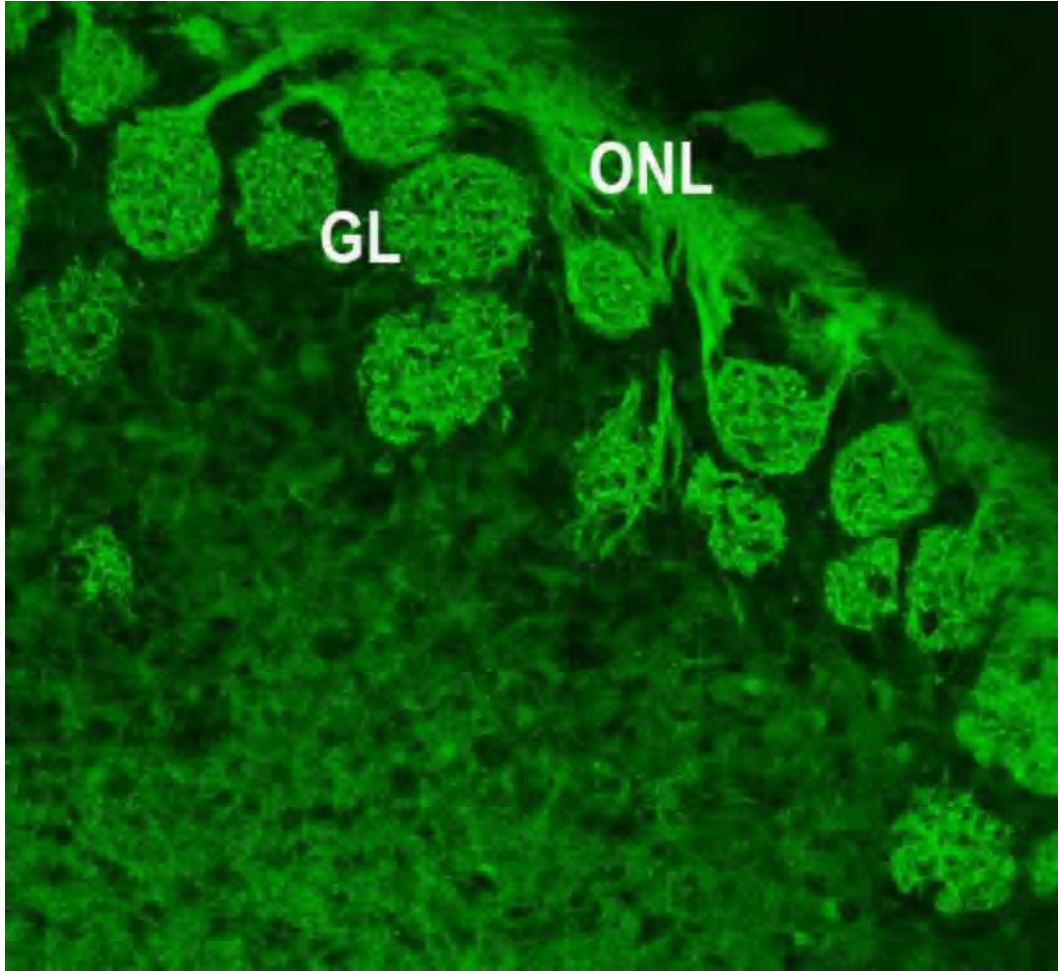
Şekil 2.21. Olfaktör bulbusda nöronların lokalizasyonu. Olfaktör reseptör nöronların (ORN) aksonları, glomerül adı verilen küresel yapılardan oluşan glomerüller katmanında (GL) sinaps yapar. Kemirgen OB'sinin yüzeyinde birkaç bin glomerül olmasına rağmen, aynı tip koku reseptörünü ifade eden ORN'ler aksonlarını sadece birkaç glomerülde birleştirir ve böylece her glomerül tek bir koku reseptörünü temsil eder. GL'daki glomerülleri çevreleyen nöronlara jukstaglomerular hücreler (JG hücreleri) adı verilir ve morfolojik olarak farklı üç hücre tipinden oluşur: periglomerular (PG) hücreler, dış püsküllü (ET) hücreler (gösterilmemiştir) ve yüzeysel kısa aksonlu (sSA) hücreler. Aksonlarını koku korteksine gönderen mitral hücreler ve püsküllü hücreler olmak üzere iki tip projeksiyon nöronu vardır. Mitral hücrelerin somaları (hücre gövdeleri) mitral hücre katmanında (MCL) bulunurken, püsküllü hücreler dış pleksiform katman (EPL) boyunca dağılmıştır. Hem mitral hem de püsküllü hücreler tek bir primer dendriti tek bir glomerulusa gönderirler ve burada ORN'nin aksonlarından sinaptik girdiler alırlar ve PG hücrelerin dendritleriyle karşılıklı sinapslar yaparlar. Mitral ve püsküllü hücrelerin ikincil dendritleri, granül hücre dendritleri ile karşılıklı sinapsların olduğu dış pleksiform tabakada (EPL) uzanır. Mitral hücrelerden gelen aksonların ve ET hücrelerin akson kollaterallerinin bulunduğu iç pleksiform katman (IPL) ve büyük ölçüde granül hücrelerinden oluşan granül hücre tabakası (GCL) MCL'nin altında yer alır. Granül hücreleri, dendritleri apikal olarak EPL'ye uzanan aksonsuz internöronlardır. ONL, Olfaktör sinir telleri katmanı (Nagayama ve ark., 2014).



Şekil 2.22. Fare OB'sinde olfaktör sinir telleri katmanı, glomerüller katman (GL) ve dış pleksiform katman (EPL). Olfactory Marker Protein (OMP) ile immunfloresan boyama (Tepe ve ark., 2018).

b. Glomerüller katman (GL): Ana OB'deki glomerüller beyindeki en belirgin yapılardan biri olup (Pinching ve Powell, 1971a, b) juktaglomerüler hücreler ile glial hücrelerden oluşan belirgin bir kabukla çevrili, küremsi yapıdaki nöropil alanlarıdır. Bu katmanda ORN'lerin miyelinsiz akson sonları ile JG hücrelerin dendritleri arasında oluşan sinapslar bulunur. Bilindiği üzere nöropil, sinir sisteminde, çoğunlukla miyelinsiz aksonlar, dendritler ve glial hücre uzantıları ile nispeten az sayıda hücre gövdesi içeren sinaptik olarak yoğun alanları tanımlar (Bywalez, 2016; Chao ve ark., 1997; Kasowski ve ark., 1999; Kosaka ve ark., 1997). Aksonlar, dendritler ve glial uzantılardan oluşan glomerüller nöropil içinde hücre gövdesi yoktur (Kasowski ve ark., 1999). Farelerde, tipik bir glomerulus ~1.000 ORN'den akson alır (Imai, 2014). Olfaktör reseptör nöronlarının miyelinsiz aksonları glomerulus içinde dağınık bir şekilde yayılmaz; bunun yerine birçok düzensiz kıvrımlı iplikçik veya ada oluşturacak şekilde kümelenirler (Şekil 2.23.). Memelilerde glomerülüslerin çapları 30-200 μm

arasında değişir (Lledove ark., 2008). Glomerüllerin sayısı sıçanda 4200, tavşanda ise 6300 olarak belirlenmiştir (Royet ve ark., 1998).

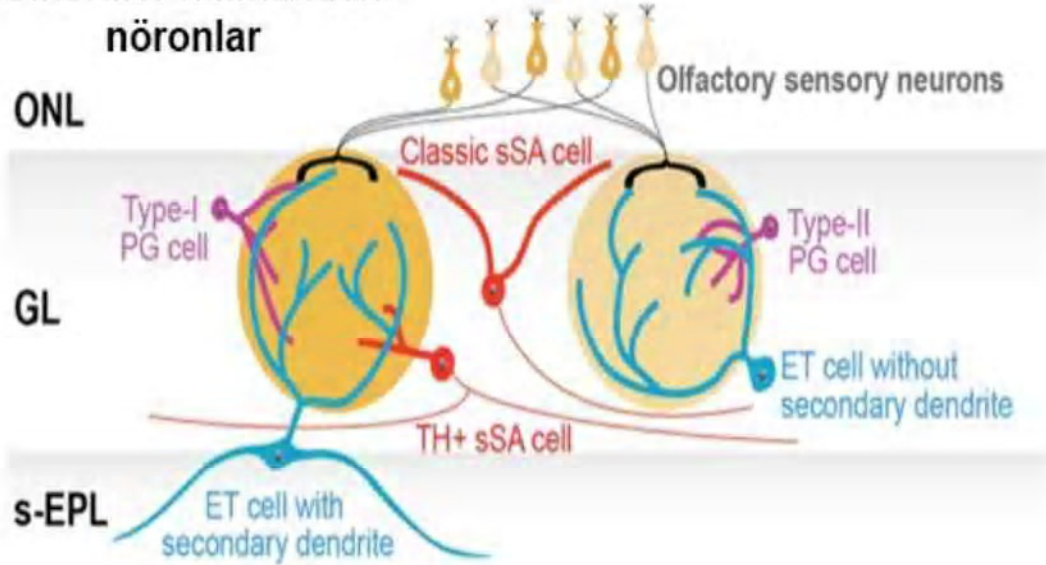


şekil 2.23. Camk2a-EGFP transgenik farenin OB'sinde ONL (olfaktör sinir telleri) ve GL'de miyelinsiz aksonların immünfloresan boyama ile görünümü. (<http://www.gensat.org/servlet/ImageProvider?code=4&imageID=24335&imgReqType=1>, Erişim tarihi: 16 Mayıs 2023).

Elektron mikroskopik düzeyde incelendiğinde glomerüllerde elektron-yoğun olfaktör akson kümelerinin elektron-opak dendritlerle karıştığı, ya da elektron-opak dendritlerin bazılarının olfaktör akson kümelerine nüfuz ediyor gibi izlenim sergilediği görülür. Bu nedenle, her glomerülün iki bölme veya bölgeden oluştuğu düşünülür: olfaktör sinir (ON) bölgesi (veya aksonal veya duysal alt bölme) ve olfaktör sinir olmayan bölge (veya dendritik veya merkezi alt bölme). Olfaktör sinir bölgesi esas olarak koku siniri preterminalleri ve terminalleri ile i nöronların ince dendritik uzantıları tarafından işgal edilir, bu da ON bölgesinin koku reseptör hücrelerinin hedefleri üzerinde sinaps yaptığı bölge olduğunu gösterir. Olfaktör sinir olmayan bölge esas olarak intrinsik nöronların dendritik uzantıları tarafından işgal edilir ve

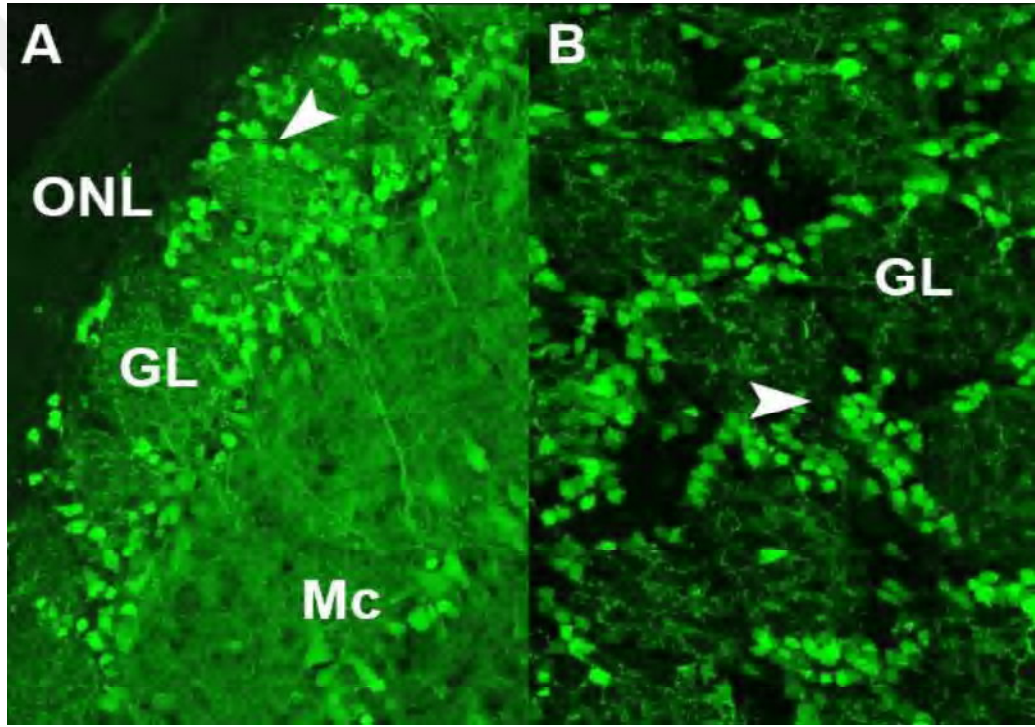
burada intrinsik nöronlar arasında dendrodendritik etkileşimler meydana gelir. Glomerüler tabakadaki glomerüller arasındaki hücreden zengin bölge ve glomerüler tabaka ile dış pleksiform tabaka arasındaki sınır bölgesi topluca "jukstaglomerüler bölge" olarak tanımlanır ve bu bölgede bulunan nöronlar da "JG nöronlar" olarak adlandırılır (Kosaka ve Kosaka, 2007). Jukstaglomerüler nöronların morfolojik olarak tanımlanmış üç tipi bulunmaktadır. Bunlar "periglomerüler (PG) hücreler", "dış püsküllü (tufted, ET) hücreler" ve "yüzeysel kısa aksonlu (sSA) hücreler"dir (Pinching ve Powell, 1971a) (Şekil 2.24.). Periglomerüler hücreler, sSA hücreler ve ET hücrelerin bir kısmı aslında internöronlardır ve OB dışındaki beyin bölgelerini innerve etmezler (Nagayama ve ark., 2014). Tipik bir glomerulus, 5-20'si mitral hücre olmak üzere 20-50 mitral/püsküllü hücrenin primer dendritleriyle innerve edilir (Ke ve ark., 2013; Sosulski ve ark., 2011).

Glomerüler katmandaki nöronlar



Şekil 2.24. Glomerüler katmandaki (GL) nöronların alt tipleri. (A) Periglomerüler hücrelerin (PG hücreleri; mor), yüzeysel kısa aksonlu hücrelerin (sSA hücreleri; kırmızı) ve dış püsküllü hücrelerin (ET hücreleri; mavi) alt tiplerinin şematik gösterimi. PG hücrelerinin iki alt tipi sinaptik bağlantılarına dayanmaktadır. Tip-I PG hücreler dendritlerinde hem ORN'den hem de OB'deki nöronlardan sinaptik girdiler alır. Tip-II PG hücreleri OB'deki nöronlardan girdi alır. PG hücreler ayrıca nörokimyasal alt tiplere ayrılabilir (şekilde gösterilmemiştir). Klasik olarak, sSA hücrelerin bir aksonu ve dendritleri vardır. Dendritler bir glomerulusa girmemiştir. Daha yakın zamanda bildirilen sSA hücre tipleri tirozin hidroksilaz (TH) için pozitifdir ve birkaç ila onlarca glomerüle bağlıdır. Püsküllü (ET) hücrelerin alt tipleri morfolojilerine göre belirlenir: ikincil dendritleri olanlar ve olmayanlar. İkincil dendritleri olan ET hücreler daha sık olarak GL ile yüzeysel dış pleksiform tabaka (s-EPL) arasındaki sınırda bulunur (Nagayama ve ark., 2014).

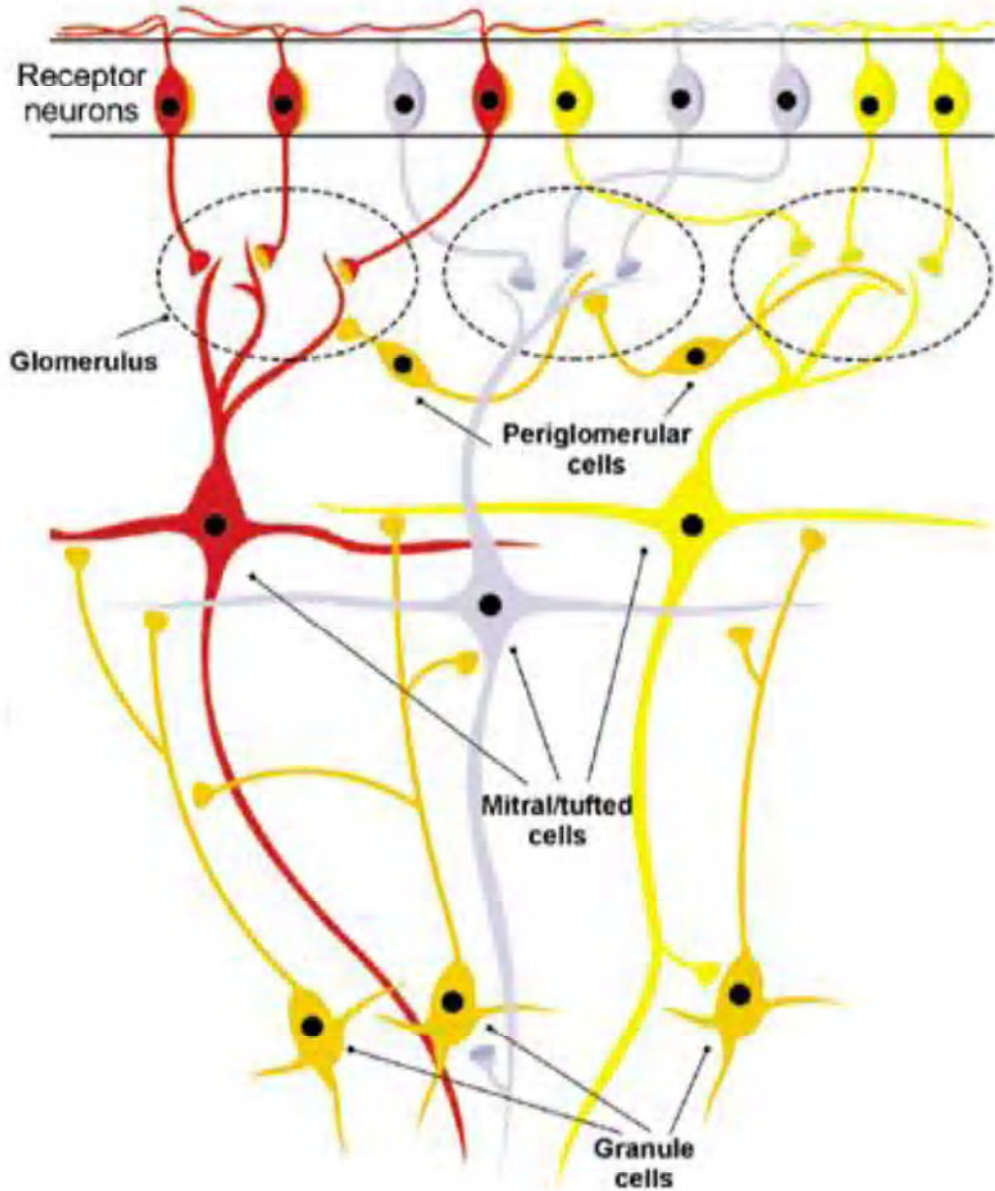
i) **Periglomerüler (PG) hücreler** GL'de üç hücre tipi arasında en küçük hücre gövdesine (5-10 µm çapında) sahip olan ve aynı zamanda en bol bulunan nöronlardır (Kosaka ve Kosaka, 2007; Parrish-Aungst ve ark., 2007). Periglomerüler hücreler tipik olarak dendritlerini tek bir glomerulusa ve sadece ara sıra çoklu glomerüllere gönderir (Şekil 2.25.; Şekil 2.26.). Dendritleri, ET hücrelerin dendritlerine göre glomerulusun daha küçük bir bölümünde dallanır. Periglomerüler hücrelerin genellikle bir akson taşıdığı düşünülür (Pinching ve Powell, 1971a), ancak aksonsuz alt tipler de mevcuttur (Kosaka ve Kosaka, 2011). Aksonun uzunluğu değişkendir ve 5-6 glomerüle kadar uzayabilir (~600 µm) (Pinching ve Powell, 1971a). Periglomerüler hücrelerin aksonları, interglomerüler boşlukta sonlanır.



Şekil 2.25. Yetişkin bir farenin OB'sindeki periglomerüler (A, B) ve mitral (A) nöronların immünfloresan boyama ile görünümü.
(<http://www.gensat.org/servlet/ImageProvider?code=4&imageID=24335&imgReqType=1>, Erişim tarihi: 16 Mayıs 2023).

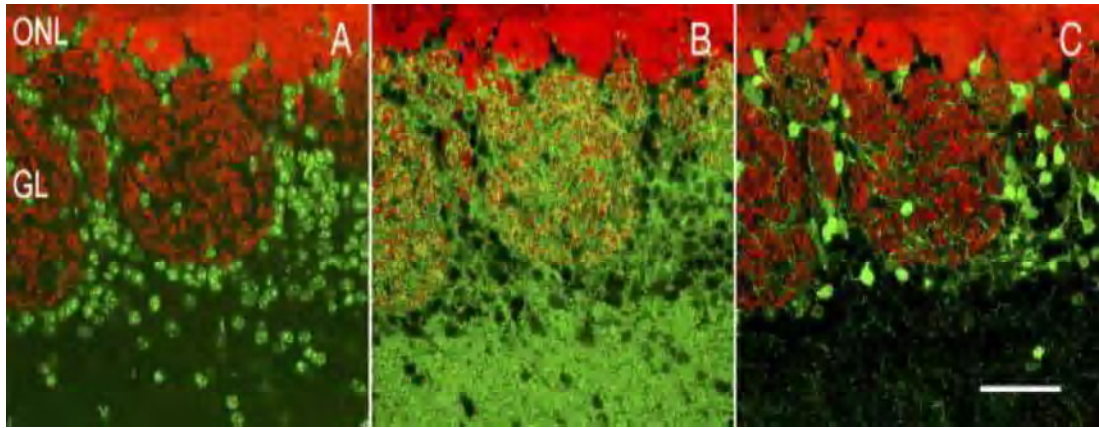
Periglomerüler hücreler ORN, püsküllü hücreler ve mitral hücreler tarafından aktive edilir (Murphy ve ark., 2005). Çoğu kemirgen memelide (Kosaka ve ark., 1988; Kosaka ve ark., 1995; Kosaka ve Kosaka, 2004; Kosaka ve ark., 2005; Kosaka ve Kosaka, 2007; Toida ve ark., 1998) yapısal özelliklerine dayanarak PG hücreler tip 1 ve tip 2 periglomerüler hücreler olarak ikiye ayrılır. Tip 1 periglomerüler hücreler intraglomerüler dendritlerini hem ON bölgesi hem de olfaktör sinir olmayan bölgeye

gönderirken, tip 2 periglomerüler hücreler intraglomerüler dendritlerini sadece olfaktör sinir olmayan olmayan bölgeye gönderir (Kosaka ve Kosaka, 2005). Ayrıca, birkaç elektro fizyolojik çalışma sıçan periglomerüler internöronlarında en az iki farklı tipte yanıt olduğunu göstermiştir. Bu da periglomerüler hücrelerin heterojenliğini doğrulamaktadır (Puopolo ve Belluzzi, 1998).



Şekil 2.26. Olfaktör bulbusun sinaptik organizasyonu. Üst: Farklı ORN tiplerinin her biri koku reseptör ailesinin farklı bir üyesini ifade eder. Orta: Koku glomerülleri öncelikle bir reseptör molekül tipini ifade eden ORN'lerden girdi alır (farklı renk koduyla gösterilmiştir). Alt: Mitral ve püsküllü hücreler granül hücrelerinden inhibitör girdiler aldıktan sonra aksonlarını koku korteksine gönderir (Carleton ve ark., 2002).

Sıçan OB'leri üzerinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalar (Kosaka ve ark., 1985; Kosaka ve ark., 1987a; Kosaka ve ark., 1987b; Kosaka ve ark., 1988; Kosaka ve ark., 1995; Kosaka ve ark., 1998) PG hücrelerin üç gruba ayrıldığını göstermektedir: 1) glutamik asit dekarboksilaz (GAD) ve/veya γ -amino bütirik asit (GABA)-pozitif (GAD/GABA-pozitif) periglomerüler hücreler, 2) kalretinin-pozitif periglomerüler hücreler ve 3) kalbindin D28k-pozitif periglomerüler hücreler. Ayrıca, kimyasal olarak tanımlanmış diğer JG nöronlar arasında, tirozin hidroksilaz (TH)-pozitif hücrelerin yaklaşık %80'inin GAD/GABA-pozitif olduğu ve bunun da GAD/GABA-pozitif hücrelerin yaklaşık %50'sine karşılık geldiği ortaya konmuştur (Gall ve ark., 1987; Kosaka ve ark., 1985; Kosaka ve ark., 1987a; Kosaka ve ark., 1988; Kosaka ve ark., 1995). Bu TH-pozitif hücreler bu nedenle GAD/GABA-pozitif periglomerüler hücrelerin önemli bir alt popülasyonu veya dördüncü bir periglomerüler hücre grubu olarak kabul edilmiştir. Sıçan OB'sinde, tip 1 periglomerüler hücrelerin hem GAD/GABA-pozitif hem de TH-pozitif periglomerüler hücreleri, tip 2 periglomerüler hücrelerin ise GAD/GABA-negatif kalbindin D28k-pozitif ve kalretinin-pozitif periglomerüler hücreleri içerdiği gösterilmiştir (Kosaka ve ark., 1997; Kosaka ve ark., 1998; Kosaka ve Kosaka, 2005) (Şekil 2.27.).



Şekil 2.27. Fare OB'sinin glomerüllerdeki bölmeleri (A) ve olfaktör marker protein (OMP)-pozitif olfaktör aksonların (kırmızı) GAD/GABA-pozitif tip 1 PG hücrelerinin glomerüler dentritleriyle (panel B'de yeşil) ve kalretinin (CR)-pozitif tip 2 PG hücrelerinin glomerüler dentritleriyle (panel C'de yeşil) ilişkisini gösteren immünfluoresan resimler. Bar = 50 μ m (Kosaka ve Kosaka, 2007).

Ayrıca, Gutierrez-Mecinas ve arkadaşları (2005), sıçan OB'sinde hem somatostatin-pozitif hem de kolesistokinin-pozitif periglomerüler hücrelerin (her ikisi de GABA-negatiftir) koku sinirlerinden sinaps aldığını bildirmiştir. Yazarlar böylece bu GABA-negatif periglomerüler hücrelerin de tip 1 periglomerüler hücreler olduğunu öne

sürmüşlerdir. Öte yandan, Crespo ve ark. (2003), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat diaforaz (NADPH-d)/nitrik oksit sentaz (NOS) içeren periglomerüler hücrelerin GABA-pozitif olduğunu ve NADPH-d/NOS-pozitif hücrelerin tip 1 periglomerüler hücreler olduğunu bildirmişlerdir.

ii) Yüzeysel kısa aksonlu (sSA) hücreler ilk olarak Pinching ve Powell (1971a) tarafından tanımlanmıştır. Kesin olmamakla birlikte, JG hücreler arasında sSA hücrelerin yüzdesinin küçük olduğu düşünülmektedir. Yüzeysel kısa aksonlu hücrelerin somaları 8-12 µm olup PG hücrelerininkinden biraz daha büyüktür. Bu hücreler, glomerüle uzanan bir akson ile yalnızca interglomerüler boşlukta seyreden dendritlere sahiptir (Pinching ve Powell, 1971a; Pinching ve Powell, 1971c). Bu popülasyon arasında hiçbir dendrodendritik bağlantı bulunmamıştır (Pinching ve Powell, 1971b; Pinching ve Powell, 1971c). Yüzeysel kısa aksonlu hücrelerin çeşitliliğini açıkça tanımlayan çok az literatür bulunmakla birlikte, iki tip sSA hücre tanımlanmıştır. Birinci tip, Pinching ve Powell tarafından keşfedilen sSA hücrelerdir (Pinching ve Powell, 1971a). İkinci tip sSA hücrelerin, Pinching ve Powell (1971a), tarafından tanımlanmış olan birinci tip sSA hücrelerden biraz farklı bir morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Aungst ve ark., 2003; Kiyokage ve ark., 2010). Birinci tip sSA hücrelerinin sadece bir veya iki glomerül boyunca uzanan bir aksonu ve interglomerüler boşlukta seyreden dendritleri bulunurken, ikinci tip sSA hücrelerinin 100 µm -1 mm arasında değişen uzunlukta olan bir aksonu vardır ve dendritleri 50'ye kadar glomerüle temas eder. Yüzeysel kısa aksonlu hücreler hem dopamin sentezi için gerekli bir enzim olan tirozin hidroksilaz (TH) hem de glutamik asit dekarboksilaz 67 (GAD67) için pozitif reaksiyon sergilerler (TH+/GAD67+ nöronlar) (Kosaka ve ark., 1995; Kiyokage ve ark., 2010). Bu hücreler Aungst ve ark. (2003) tarafından glutamaterjik sSA hücreleri olarak adlandırılmıştır. Kosaka ve Kosaka (2008), PG hücreleri "Küçük Soma" grubu olarak tanımlarken, TH+/GAD67+sSA hücrelerin büyük soma grubuna dahil olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle Nagayama ve arkadaşları (2014), TH+/GAD67+ hücrelerin TH-pozitif JG hücrelerin yalnızca bir alt popülasyonunu oluşturduğunu ileri sürmüşlerdir.

iii) Dış püsküllü (external tufted, ET) hücreler, JG hücreler arasında en büyük hücre somasına (10-15 µm) sahip nöronlardır (Pinching ve Powell, 1971a). Dış püsküllü hücrelerin primer (birincil) dendritleri genellikle mono-glomerülerdir, küçük

bir alt popölasyon ise di-glomerölüdür (Ennis ve Hayar, 2008). Yüzeysel kısa aksonlu hücrelerin aksine, ET hücrelerin dendritleri glomerulusun büyük bir hacmini işgal eder. Bugüne kadar, ET hücrelerin morfolojik olarak farklı üç alt tipi rapor edilmiştir (Macrides ve Schneider, 1982; Schoenfeld ve ark., 1985).

-İlk gruptaki ET hücreler sekonder (ikincil) dendritlerden yoksundur, hücre gövdesi yalnızca GL'de bulunur ve akson OB içinde sınırlandırılmıştır (Antal ve ark., 2006; Hayar ve ark., 2004a; Hayar ve ark., 2004b; Hirata ve ark., 2019; Liu ve Shipley, 2008; Macrides ve Schneider, 1982).

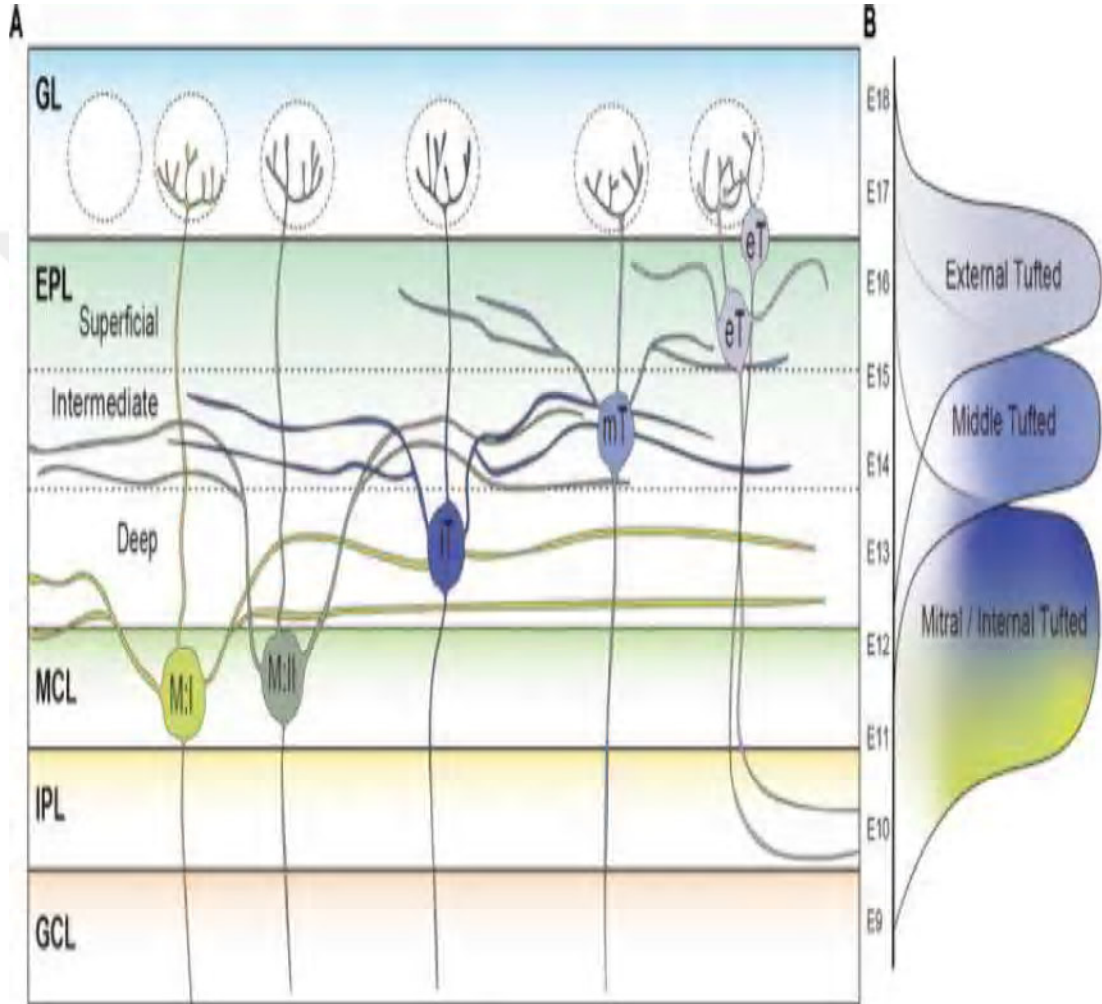
-İkinci gruptaki hücreler yoğun dallanmış sekonder dendritlere sahiptir.

- Üçüncü grup somadan bir yönde teğet olarak uzanan seyrek dallanmış ikincil dendritlere sahiptir.

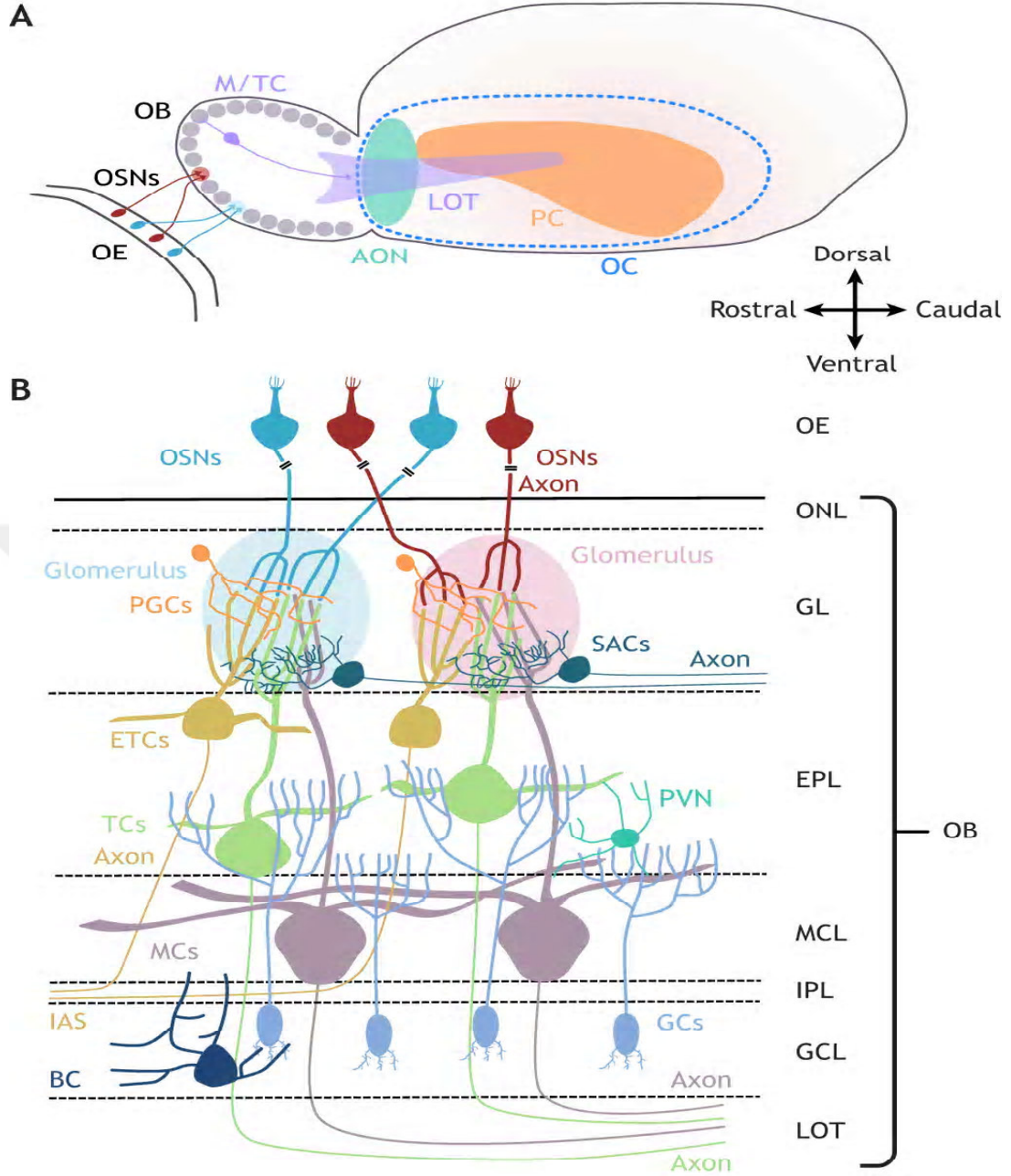
Sekonder dendritlere sahip dış püsküllü hücreler grubunun, hücre gövdeleri (somaları) genellikle GL'nin daha derin kısmında ve GL sınırına yakın EPL'de bulunur. Bu hücrelerin sekonder dendritlerini yüzeysel dış pleksiform katmanın (sEPL) en dış bölgesine uzattıkları gösterilmiştir (Macrides ve Schneider, 1982; Mori ve ark., 1983). Sıçan OB'sindeki dış püsküllü hücrelerin sekonder dendritlerinin toplam uzunluğunun ~1,200 µm olduğu gösterilmiştir (Antal ve ark., 2006). Sekonder dendritlere sahip dış püsküllü hücreler grubunun aksonları, aynı OB'nin diğer tarafının (medial-lateral) IPL'ye veya ön koku alma çekirdeğinin (AON) pars eksternasına (pE) uzanır. Ön koku alma çekirdeğinin pars eksternası, sağ ve sol OB arasında aynı koku verici reseptörü ifade eden ORN'de girdi alan homotipik glomerüllerle bağlantılı devreleri birbirine bağlar (Liu ve Shipley, 1994; Lodovichi ve ark., 2003; Yan ve ark., 2008).

c. Dış pleksiform katman (EPL): Bu katman koku almada sinaptik işlemenin ikinci seviyesinin gerçekleştiği yerdir. Olfaktör reseptör nöron aksonlarının mitral ve püsküllü (M/T) hücrelerin ve periglomerüler (PG) hücrelerin dendritleri üzerinde birleştiği glomerüllerin hemen altında yer alır. Dış pleksiform katman esas olarak, sırasıyla daha derin mitral hücre ve granül hücre katmanlarından EPL'a yükselen M/T hücre dendritleri ve GABAerjik granül hücre dendritleri tarafından oluşturulan yoğun bir nöropilden oluşur. Dış pleksiform katman içinde, M/T hücrelerin lateral dendritleri granül hücre dendritleri ile çok sayıda tip 1 (ultrastrüktürel olarak uyarıcı) ve tip 2 (ultrastrüktürel olarak inhibitör) sinapslar oluşturur (Price ve Powell, 1970b). Dış pleksiform katman, yüzeysel (s-EPL), ara (i-EPL) ve derin dış pleksiform katman (d-

EPL) olmak üzere alt katmanlara ayrılabilir (Nagayama ve ark., 2014). Diğer OB katmanlarıyla karşılaştırıldığında, EPL az sayıda hücre gövdesine sahiptir. En kapsamlı şekilde çalışılmış olan sıçan ve hamsterde, yine de önemli sayıda internöron (Kosaka ve ark., 1994; Schneider ve Macrides, 1978), çeşitli tiplerde püsküllü (tufted) hücreler (Macrides ve Schneider, 1982) ve astrositler (Bailey ve ark., 1993; Mirich ve ark., 2002) içerdiği gösterilmiştir (Şekil 2.28.; Şekil 2.30.).



Şekil 2.28. Kemirgen OB'sinde projeksiyon nöronlarının alt popülasyonları. (A) Kemirgen OB'sinde projeksiyon nöronlarının morfolojik farklılıkları. Tip I mitral hücreler (M:I) ikincil dendritlerini derin pleksiform katmanın (dEPL) en derin alt katmanında uzatırken, tip II mitral hücreler (M:II) ara EPL'a (iEPL) projekte olur. İç püsküllü hücrelerin (iT) somaları dEPL'de bulunur ve ikincil dendritleri iEPL'de uzanır. Orta püsküllü hücreler çoğunlukla iEPL'de bulunur. Yüzeysel EPL (sEPL) veya glomerüler tabakada (GL) bulunan püsküllü hücreler dış püsküllü hücreler (eT) olarak sınıflandırılır. Dış püsküllü hücreler ayrıca sEPL'ye projekte olan ikincil dendritleri olan veya ikincil dendritleri olmayan hücreler olarak iki alt tipe ayrılır. Projeksiyon nöronları hücre somalarının OB'deki konumu ne kadar derinse, ikincil dendritler o kadar uzun olur. (B) Gelişmekte olan fare beyinde MOB projeksiyon nöronlarının oluşma zamanları. Mitral hücreler E9 ile E13 arasında üretilir, bunu orta (E12-E16) ve dış (E13-E18) püsküllü hücreler izler (Imamura ve ark., 2020).



Şekil 2.29. Memeli koku alma sistemi ve olfaktör bulbus (OB) devresi. (A) Koku alma sistemine genel bakış. Burun koku epitelindeki (OE) olfaktör reseptör nöronlar (OSN) aksonlarını OB'deki glomerüllere (gri daireler) gönderir. OB'deki mitral ve püsküllü hücreler (M/TC'ler) apikal dendritlerini glomerüllere uzatır ve aksonları lateral koku alma yolu (LOT) aracılığıyla ön olfaktör nükleus (AON) ve piriform korteks (PC) dahil olmak üzere olfaktör korteksi (OC) alanlarına gönderir. (B) Olgun OB devresinin basitleştirilmiş diyagramı. Farklı renkteki OSN'ler, aksonları ayrı glomerüller halinde birleşen farklı koku alma reseptörlerini ifade eden popülasyonları temsil eder. BC, Blanes hücresi; EPL, Dış Pleksiform Tabaka; ETCs, dış püsküllü hücreler; GCs, granül hücreleri; GCL, Granül Hücre Katmanı; GL, Glomerüler Katman; IAS, İntrabulbar Birleşme Sistemi; IPL, İç Pleksiform Katman; LOT, Lateral Koku Yolu; MCs, mitral hücreler; MCL, Mitral Hücre Katmanı; OE, koku epiteli; ONL, Olfaktör Sinir Telleri Katmanı; PGCs, periglomerüler hücreler; PVN, parvalbumin eksprese eden EPL nöronu; SACs, kısa aksonlu hücreler; TCs, püsküllü hücreler (Tufo ve ark., 2022).

EPL internöronları, ilk olarak kedide Van Gehuchten ve Martin (1891), tarafından multipolar nöronlar olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Schneider ve Macrides (1978), hamster EPL'sinde Van Gehuchten (VG) hücrelerinin granül hücre dendritleri ile etkileşime girdiğini öne sürmüştür. Takiben sıçan EPL'sinde çeşitli nöropeptidler (Gall ve ark., 1986), NADPH-d (Scott ve ark., 1987) ve Ca^{2+} bağlayıcı proteinler (Briñón ve ark., 1992; Kosaka ve ark., 1994) için boyama yöntemleri kullanılarak VG hücreleri ve kısa aksonlu hücrelerin morfolojik özelliklerine sahip multipolar nöronlar tanımlanmıştır.

Püsküllü hücreler ve mitral hücre katmanındaki mitral hücreler OB'nin "projeksiyon nöronları" olarak tanımlanırlar (Zeppilli ve ark., 2021). Projeksiyon nöronlar hücre gövdeleri merkezi sinir sistemi içinde bulunan ve aksonları uzak beyin bölgelerine uzanan uyarıcı nöronlardır. Glomerülüs içinde işlenen koku sinyalleri, EPL'de mitral ve püsküllü hücrelerin primer (birincil) dendriti boyunca yayılır. Sinyal, EPL'deki püsküllü hücrelerin hücre gövdesine ve mitral hücre katmanındaki (MCL) mitral hücrelere ulaşır, ardından EPL'deki sekonder (ikincil) dendritler aracılığıyla yatay olarak geri yayılır. Geri yayılma sinyalinin zayıflatılmadığı, bunun yerine granül hücrelerinden gelen lokal inhibisyon tarafından engellenene kadar dendritler boyunca iletildiği düşünülmektedir (Xiong ve Chen, 2002). Yatay sinyal yayılımının, granül hücreleri ve diğer internöronlarla dendrodendritik etkileşim yoluyla diğer mitral/tufted hücrelerin aktivitesini engellediğine inanılmaktadır. Bu süreç "lateral inhibisyon" olarak adlandırılır. Dış pleksiform katman çoğunlukla mitral/tufted hücrelerin sekonder dendritleri ve granül hücrelerinin apikal dendritleri olan dendritik uzantılar tarafından işgal edilir (Nagayama ve ark., 2014) (Şekil 2.28.).

Dış pleksiform katman içinde püsküllü (tufted) hücreler genellikle dikey konumlarıyla ayırt edilirler (Bywalez, 2016). Hücre gövdelerinin yerleşimine göre püsküllü hücreler; ET hücreleri, orta püsküllü hücreler ve iç püsküllü hücreler olmak üzere üç tipe ayrılırlar (Shepherd ve ark., 2004). Püsküllü hücreler primer transmitter olarak glutamati kullanırlar. Glomerüler katmanda daha önce anlatıldığı üzere ET hücreleri GL ile EPL arasındaki sınırın etrafında bulunurlar (Pinching ve Powell, 1971a). Orta püsküllü hücreler, GL ve EPL arasındaki sınırın altında kalan yüzeysel (s-EPL) ve i-EPL'de bulunan bu hücrelerin hücre gövdesi orta büyüklüktedir (15-20 μm) (Shepherd ve ark., 2004). Orta püsküllü hücrelerin çoğunluğu yüzeysel ve orta EPL'de nispeten

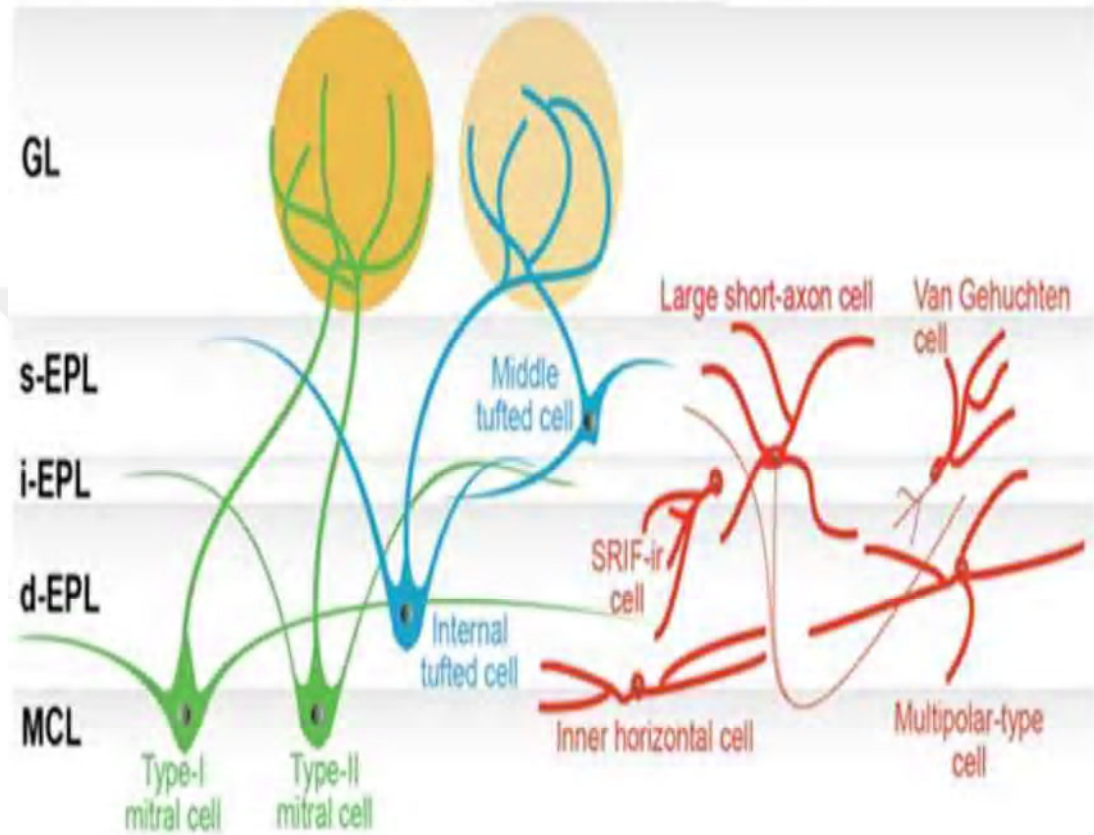
kısa sekonder dendritler uzatır. Akson kollateralleri iç pleksiform katmanı oluştururlar (Nagayama ve ark., 2014; Orona ve ark., 1984; Parrish-Aungst ve ark., 2007). Bunlar muhtemelen ET hücreleri gibi OB'nin diğer tarafıyla (lateral-medial) temas kurarlar (Belluscio ve ark., 2002). İç püsküllü hücreler nispeten büyük hücre gövdelerine ($>20\ \mu\text{m}$) sahiptir ve EPL'nin derin kısmında bulunurlar (Orona ve ark., 1984). İç püsküllü hücreler bazen yer değiştirmiş mitral hücreler olarak adlandırılır, çünkü mitral hücrelere benzer yapısal ve işlevsel özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir (Nagayama ve ark., 2014). Ayrıca orta püsküllü hücrelerde olduğu gibi yüzeysel ve orta EPL'de sekonder dendritler uzatırlar (Şekil 2.29.; Şekil 2.32.). Mori ve arkadaşları (1983) tavşan OB'sinde sekonder dendritlerin uzunluklarının ortapüsküllü hücrelerde $\sim 4.000\ \mu\text{m}$, iç püsküllü hücrelerde ise $\sim 12.000\ \mu\text{m}$ olduğunu bildirmiştir. Derin EPL'de ikincil dendritler uzatan hiç bir püsküllü hücre gözlenmemiştir (Nagayama ve ark., 2014).

d. Mitral hücreler katmanı (MCL): Bu katman, her biri bir glomerüle tek bir ana (primer) dendrit, dış pleksiform tabakaya sekonder (lateral) dendritler ve koku alma yoluna da tek bir akson gönderen mitral hücrelerin hücre gövdelerinden (soma) oluşan ince bir tabakadır. Ayrıca bu katmanda, mitral hücre tabakası boyunca dağılmış çok sayıda granül hücresinin somaları da bulunur. Aslında, granül hücreleri mitral hücre tabakasında somaya sahip hücrelerin çoğunluğunu oluşturur (Frazier ve Brunjes, 1988; Imamura ve ark., 2006) (Şekil 2.29.; Şekil 2.30.). Sıçanlarda $25\text{-}35\ \mu\text{m}$ çapa sahip olan (Pinching ve Powell, 1971a) mitral hücreler dış ve iç pleksiform katmanlar arasında, bulbus yüzeyine paralel olarak yerleşim gösterirler (Schneider ve Macrides, 1978). Her bir bulbustaki mitral hücre sayısı sıçanlarda ~ 56.200 , tavşanda ise ~ 59.600 olarak tespit edilmiştir (Royer ve ark., 1998).

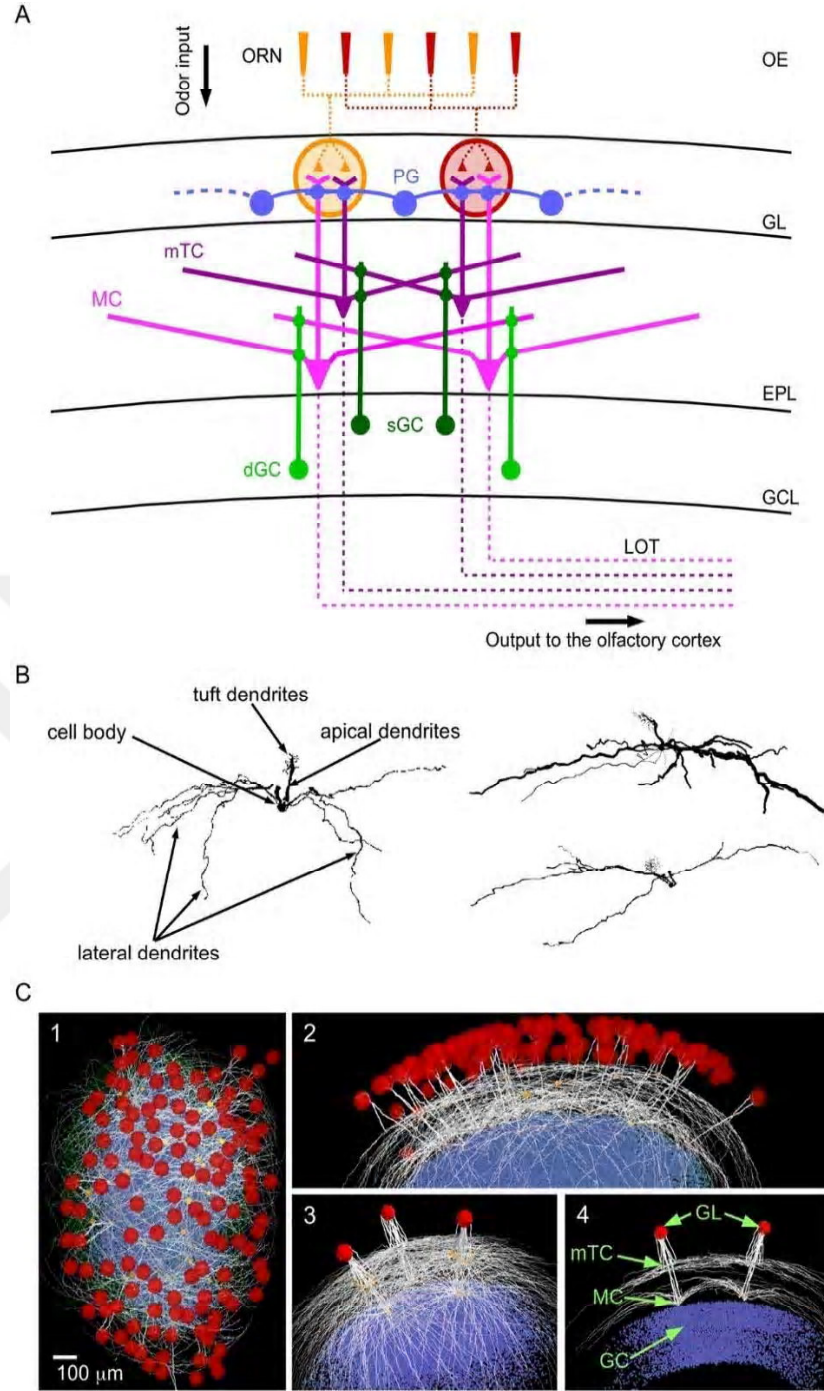
Hem mitral hem de püsküllü hücreler glutamaterjik (glutamatı serbest bırakan, glutamat tarafından aktive edilen veya glutamatı içeren) nöronlardır (Ennis ve ark., 2007) ve tek bir glomerüle projeksiyon yapan bir primer dendrit (uzun aksonal dendrit) ile GL'nin altındaki dış pleksiform katman (EPL) içinde uzanan farklı uzunluklardaki sekonder (lateral) dendritlere sahiptirler. Glomerüler tabakadaki primer dendrit, bu tabakada bulunan ve ORN'lere ait olan aksonlar ile sinaps yapar. Dış pleksiform tabakadaki sekonder (lateral) dendritler ise püsküllü hücreler ve granüler hücreler ile

sinaps yapar (Macrides ve Schneider, 1982; Mori ve ark., 1983). Yaklaşık 25 mitral hücre (ve 50 püsküllü hücre) tek glomerül ile ilişkilidir.

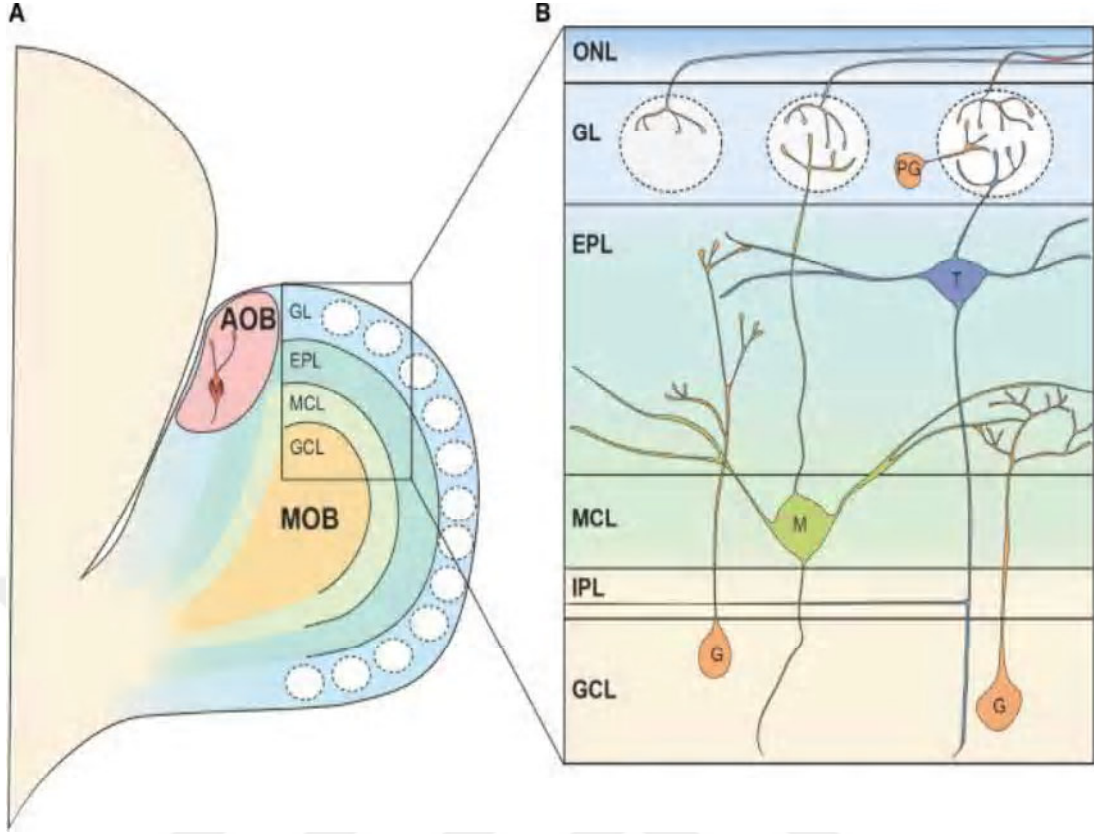
Dış pleksiform (EPL) ve Mitral hücre (MCL) katmanlarındaki nöronlar



Şekil 2.30. Püsküllü hücrelerin (mavi) ve mitral hücrelerin (yeşil) alt tiplerinin yanı sıra dış pleksiform tabaka (EPL) ve mitral hücre tabakasındaki (MCL) internöronların (kırmızı) şematik gösterimi. Püsküllü hücreler (ET) soma konumlarına göre dış, orta ve iç püsküllü hücreler olarak sınıflandırılır. EPL yüzeysel (s-EPL), ara EPL (i-EPL) ve derin EPL (d-EPL) olmak üzere birden fazla alt katmana ayrılabilir. Mitral hücrelerin iki alt türü, EPL alt katmanlarındaki ikincil (bazal) dendritlerinin derinliğine göre sırasıyla tip-I ve tip-II mitral hücreler olarak adlandırılır. Orta püsküllü hücreler iç püsküllü hücrelerden daha küçük hücre somalarına, iç püsküllü hücreler de mitral hücrelerden daha küçük hücre somalarına sahiptir. İnternöronlar arasında sadece büyük kısa akson hücrelerinin aksonları vardır. Başlangıçta kısa akson hücreleri olarak kategorize edilen bazı nöronlar akson benzeri bir uzantıya sahiptir, ancak herhangi bir karışıklığı önlemek için bu şekilde gösterilmemiştir. Van Gehuchten hücreleri aksonu olmayan hücrelerdir. İç horizontal ve multipolar tip hücreler ise morfolojik özellikleri ve konumları ile tanımlanır. İnternöronların çoğunluğu parvalbumin (PV) etiketlenmesi ile incelenmiştir. Ek olarak, somatostatin-immünoreaktif (SRIF-ir) hücreler i-EPL/d-EPL'de bulunur ve dendritlerini özellikle d-EPL'ye uzatırlar (Nagayama ve ark., 2014).



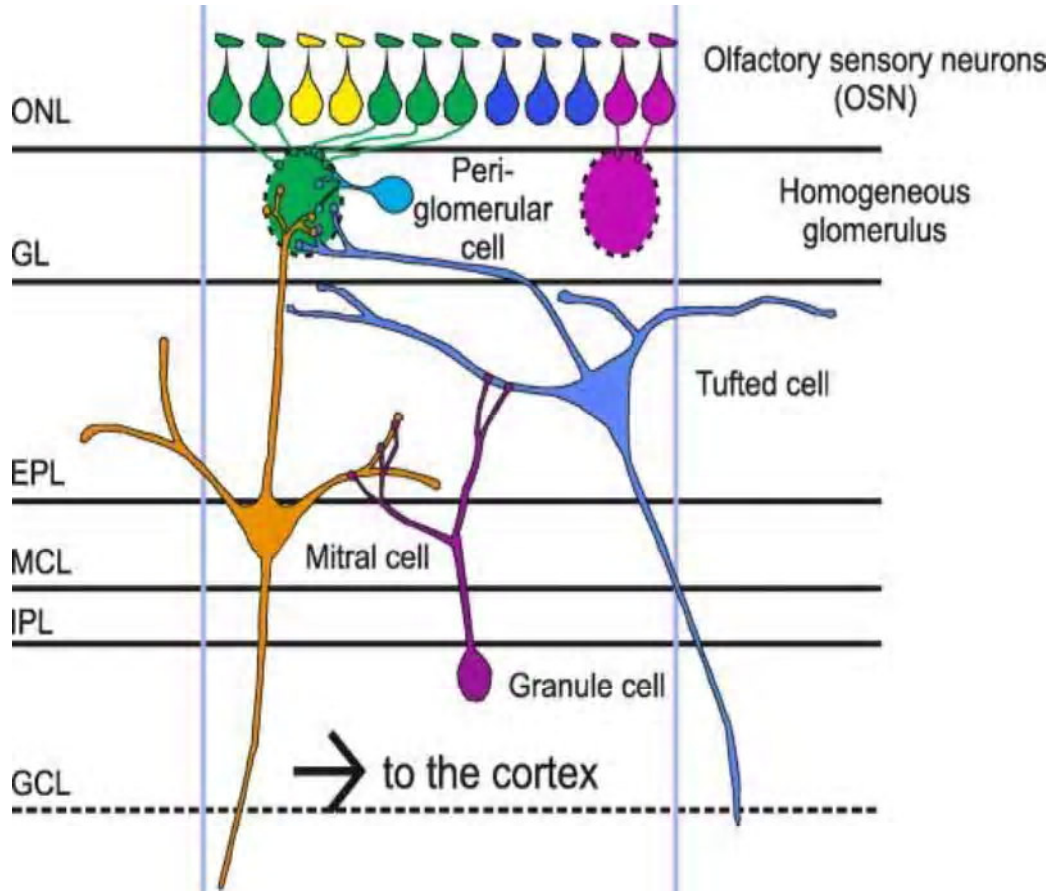
Şekil 2.31. Olfaktör bulbus'un şematik gösterimi. (A) OB'nin translaminar organizasyonu ve koku yolundaki konumu. Olfaktör epiteldeki (OE) olfaktör reseptör nöronlar (ORN'ler) OB'nin glomerüler hücre katmanına (GL) projeksiyon yapar ve burada periglomerüler (PG) hücrelerin yanı sıra granül (GC) hücrelerine bağlanan mitral (MC) ve orta püsküllü (mTC) hücrelere bağlanırlar. Glomerüler Katman (GL); Dış Pleksiform Katman (EPL); Granül Hücre Katmanı (GCL). OB çıkışı, lateral koku alma kanalındaki (LOT) MC ve mTC aksonları aracılığıyla koku alma korteksine (OC) yayılır. (B) Üç mTC rekonstrüksiyonu. (C) Glomerüllerin (kırmızı) yüzeysel (1) ve yandan (2) görülen modelleri; 3: MC'ler, mTC'ler ve GC'lerden oluşan üç tipik glomerüler birim; 4: EPL içindeki MC'lerin ve mTC'lerin dendritik arborizasyonlarının farklı uzamsal organizasyonlarını gösteren kesit görünüm (Cavarretta ve ark., 2018).



Şekil 2.32. Kemirgen OB'sinde temel nöral devre. (A) OB kemirgen beyninde telensefalonun en ön kısmında oluşur. Feromonal bilgiyi vomeronazal organdan alan aksesuar olfaktör bulbus (AOB) ana olfaktör bulbusun (MOB) posterio-dorsalinde yerleşir. AOB'deki mitral hücreler çoklu glomerüllere projekte olan çoklu apikal dendritlere sahiptir. Ana OB ORN'lerinin aksonları tarafından innerve edilir. (B) ORN aksonları, glomerüllere girmeden önce, olfaktör sinir telleri katmanı (ONL) içinde OB yüzeyinde teğetsel olarak ilerler. Mitral (M) ve püsküllü hücre (T) somaları sırasıyla mitral hücre tabakasında (MCL) ve dış pleksiform tabakada (EPL) bulunurlar ve birincil dendritlerini tek bir glomerüle gönderirler. Glomerülde ORN aksonları mitral ve püsküllü hücrelerin yanı sıra periglomerüler hücrelerle (PG) aksodendritik sinapslar oluştururlar. Mitral ve püsküllü hücrelerin ikincil dendritleri EPL'daki granül hücreleri (G) ile dendrodendritik sinapslar yaparlar. Periglomerüler ve granül hücrelerinin somaları sırasıyla glomerüler tabakada (GL) ve granül hücre tabakasında (GCL) bulunur. IPL, İç pleksiform tabaka (Imamura ve ark., 2020).

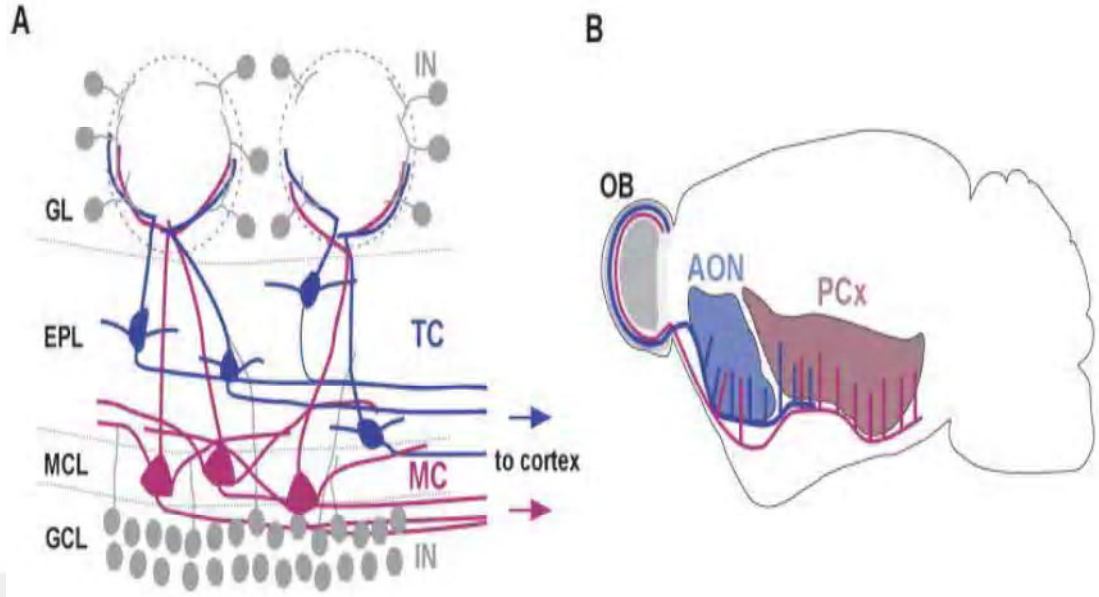
Dış pleksiform katman içinde, mitral ve püsküllü hücrelerin ikincil dendritleri, başka bir internöron türü olan granül hücreleri ile dendrodendritik sinapslar oluşturur (Price ve Powell, 1970b). Bunun yanı sıra mitral ve püsküllü hücreler GL'deki inhibitör periglomerüler internöronlarla dendrodendritik sinapslar oluştururlar (Pinching ve Powell, 1971b). Mori ve ark. (1983), tavşan OB'sindeki projeksiyon nöronlarını incelemiş ve tek bir mitral hücrenin $\sim 15,000 \mu\text{m}$ uzunluğunda olan ikincil dendritlere sahip olduğunu göstermiştir; bu, orta püsküllü hücrelerinkinden ($\sim 4,000 \mu\text{m}$) neredeyse dört kat daha uzundur (Mori ve ark., 1983). Ayrıca fare OB'sinde, bir mitral hücrenin toplam dendritik uzunluğunun ($\sim 15,000 \mu\text{m}$) bir orta püsküllü

hücreninkinden ($\sim 7.500 \mu\text{m}$) çok daha uzun olduğu bildirilmiştir (Igarashi ve ark., 2012). Şimdiye kadar elde edilen veriler, mitral ve püsküllü hücrelerin hücre somalarının OB'deki konumu ne kadar derinse, sekonder dendritlerin o kadar uzun olduğunu ve ayrıca sekonder dendritlerini EPL'nin farklı alt katmanlarında uzattığını göstermektedir. Mitral hücrelerin sekonder dendritleri MCL'nin proksimalinde EPL'nin en derin kısmında (dEPL) sınırlı kalırken, püsküllü hücrelerin dendritleri GL'nin proksimalinde EPL'nin en yüzeysel kısmında (sEPL) uzanmaktadır (Imamura ve Greer, 2015; Macrides ve Schneider, 1982; Mori ark., 1983; Orona ve ark., 1984) (Şekil 2.28.- Şekil 2.32.).

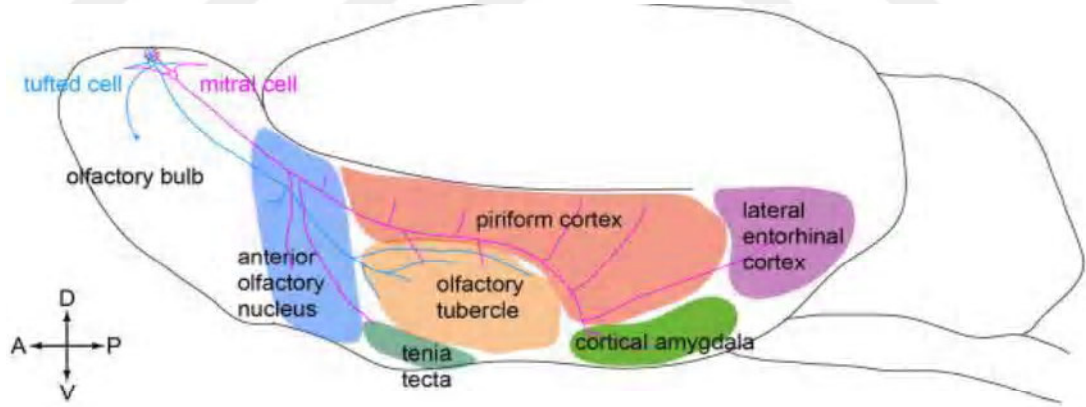


Şekil 2.33. Olfaktör Bulbus'daki nöronal devre. OB'deki pre ve postsinaptik hücreler arasındaki bağlantının şematik diyagramı. Her bir glomerül içinde, aynı koku reseptörünü (OR) ifade eden olfaktör reseptör nöronlar (OSN, aynı renkteki damla şekilleriyle gösterilir) postsinaptik hücrelerle, yani mitral hücreler (MC) ve püsküllü hücreler (TC) ile birlikte periglomerüler hücrelerle sinapslar oluşturur. MC ve TC tek apikal dendritlerini tek bir glomerulus içinde uzatırken, lateral dendritler dış pleksiiform tabaka boyunca uzanır ve OB'nin başlıca GABAerjik inhibitör internöronları olan granül hücreleri ile dendro-dendritik sinapslar oluşturur. Bu nedenle glomerulus, bir OR ile ilgili duyuşal bilginin işlendiği, koku kolonu olarak da bilinen işlevsel bir birimi tanımlar. ONL: Olfaktör Sinir Telleri Katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiiform Katman, MCL: Mitral Hücre Katmanı, IPL: İç Pleksiiform Katman, GCL: Granül Hücre Katmanı (Francia ve Lodovichi, 2021).

Mitral hücre katmanı sadece bir hücre gövdesi kalınlığında olduğundan, mitral hücrelerin heterojenliği derinlemesine araştırılmamıştır. Bununla birlikte, çeşitli kanıtlar mitral hücrelerin heterojen alt popülasyonlardan oluştuğunu göstermektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, mitral hücrelerin somaları MCL'de bulunsa da bazı mitral hücreleri sekonder dendritlerini genellikle dEPL'de uzatır; bunlar **“tip-I mitral hücreler”** olarak adlandırılır (Mori ve ark., 1983; Orona ve ark., 1984). Bazı mitral hücreler ise sekonder dendritlerini ara EPL'de (iEPL) uzatırlar. Bunlar ise **“tip-II mitral hücreler”** olarak adlandırılır (Mouradian ve Scott, 1988; Orona ve ark., 1984;). İlginç bir şekilde, tip-II mitral hücrelerin toplam sekonder dendrit uzunluğu orta püsküllü hücreninkinden daha uzun, ancak tip-I mitral hücrelerinkinden daha kısadır (Orona ve ark., 1984). Mitral hücreler moleküler ekspresyon profilleri bakımından çeşitlilik gösterir. Hücrelerin alt kümeleri GABAA reseptörünün $\alpha 3$ alt birimini ifade eder (Panzanelli ve ark., 2005) ve voltaj kapılı potasyum kanalını (örneğin: Kv1.2) ve hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı kanalı (örneğin HCN2) değişken şekilde ifade eder (Angelo ve Margrie, 2011; Padmanabhan ve Urban, 2010). Mitral hücreler ORN'lerden gelen uyarıları yuvarlak nöropil demeti olan glomerülün içinde alır. Mitral hücrelerin aksonları lateral olfaktor traktı oluşturur ve koku hakkındaki bilgileri olfaktör kortekse iletirler. Mitral hücreler aksonlarını olfaktör korteksin (ön olfaktör nükleus, olfaktör tüberkül, anterior ve posterior piriform korteks, amigdaloid korteks, entorinal korteks) tamamına uzatırken, püsküllü hücreler aksonlarını sadece olfaktör korteksin ön bölgelerine gönderir (ön olfaktör nükleus, olfaktör tüberkül, ön piriform korteksin rostroventral kısmı). Olfaktör korteksin ön bölgeleri, hem mitral hücre yolu hem de orta püsküllü hücre yolu tarafından taşınan bilgileri işleyebilir. Buna karşılık, olfaktör korteksin kalan arka bölgeleri, yalnızca mitral hücre yolu tarafından taşınan bilgileri işleyebilir (Nagayama ve ark., 2004) (Şekil 2.33.; Şekil 2.34.).



Şekil 2.34. Olfaktör bulbus'daki hücre tiplerinin dağılımlarının şematik gösterimi (IN: internöron, TC: püsküllü hücre, MC: mitral hücre, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman, MCL: Mitral Hücre Katmanı, GCL: Granül Hücre Katmanı). Püsküllü ve mitral hücreler aksonlarını aşağı kortikal bölgelere yansıtır. (B) Koku korteksindeki mitral ve püsküllü hücreler için farklı aksonal projeksiyon hedeflerinin şematik gösterimi (AON: anterior koku çekirdeği, PCx: piriform korteks). Püsküllü hücreler öncelikle AON'ye ve PCx'in ön kısmına projeksiyon yaparken, mitral hücre aksonları AON'yi, PCx'in ön ve arka kısımlarını hedef alır (Zeppilli ve ark., 2021).



Şekil 2.35. Mitral ve püsküllü hücrelerin kortikal izdüşümü. Beynin ventrolateral görünümü şematik olarak gösterilmiştir. Tipik bir glomerulus, 20-50 mitral/tufted hücre tarafından innerve edilir. Püsküllü hücreler, OB'nin diğer tarafına (intrabulbar projeksiyon) ve kontralateral OB'ye bağlanan AONpE'ye (Ön koku alma çekirdeğinin pars eksternası) topografik aksonal projeksiyon gösterir. Tufted hücreler ayrıca aksonlarını yan yana yerleştirilmiş ön koku alma çekirdeğinin posteroventral kısmına, ön piriform korteksin ventrorostral kısmına ve olfaktör tüberkülün başlık bölgesine yansıtır. Buna karşılık, mitral hücreler aksonlarını dağılmış bir şekilde piriform korteks, lateral entorinal korteks, kortikal amigdala, ön olfaktör nükleus, tenia tecta ve olfaktör tüberkülün kortikal bölgesi dahil olfaktör korteksin geri kalan kısımlarına yansıtır. Mitral ve püsküllü hücreler tarafından ayrılmış aksonal projeksiyon, iki yol tarafından paralel bilgi işlemeyi önerir. (Igarashi ve ark., 2012; Nagayama ve ark., 2010).

e. **İç pleksiform katman (IPL):** Bu katman mitral hücre katmanı altında ince bir tabaka olarak yer alır (Price ve Powell, 1970a). Az miktarda hücre içerirken, tabakanın çoğunluğunu granül hücrelerin dendritleriyle, mitral/püsküllü hücrelerin aksonları oluşturur. Esas hücresi horizontal hücrelerdir ve az miktarda multipolar nöron da içerebilir. Horizontal hücrelerin dendritleri mitral hücreler katmanına paralel yerleşmiştir, aksonları ise dış pleksiform katmana uzanır (Ennis ve ark., 2007).

f. **Granül hücre katmanı (GCL):** Olfaktör bulbusdaki en derin tabaka olup hücrelerinin çok büyük bir kısmını mitral hücre katmanı ile dendrodendritik sinaps yapan granül hücreler oluşturur. Hücre gövdesi 6-8 um çapında olan granül hücrelerin somaları (Price ve Powell, 1970a) çoğunlukla GCL'sinde lokalizedir, ancak bazı granül hücreler IPL ve MCL'sinde de bulunur (Nagayama ve ark., 2014). Bu hücrelerin apikal dendriti tipik olarak OB'nin yüzeyine doğru radyal olarak uzanır ve EPL'de dallanmadan önce nadiren GCL'de dallanır. Granül hücreler EPL'de, mitral ve/veya püsküllü hücrelerin ikincil dendritleri ile karşılıklı sinapslar oluşturan dendritik spinlere sahiptir. Aksonsuz morfolojileri nedeniyle, granül hücrelerin çıktısı yalnızca dendrodendritik sinapslara dayanır (Nagayama ve ark., 2014).

İlginç bir şekilde, granül hücreler de EPL'deki dendritik uzantı modellerine göre en az üç popülasyona ayrılır:

-Tip-I granül hücresi (GI) dendritlerini EPL'nin her tarafında dallandırır;

-Tip-II granül hücresinin (GII) soması derin GCL'sinde, dendritleri ise sadece derin EPL'de uzanır.

-Tip-III granül hücresi (GIII) soması yüzeysel GCL'den MCL'ye kadar değişen bir yerleşim gösterir ve dendritleri ağırlıklı olarak yüzeysel EPL'de dallanmıştır (Merkle ve ark., 2007; Mori ve ark., 1983; Orona ve ark., 1983; Schneider ve Macrides, 1978).

-Bununla birlikte, bu üç alt tip, tüm granül hücre popülasyonunu kapsamaz, çünkü bazı granül hücreler, bu tiplerin hiçbirine benzemeyen morfolojilere sahiptir. Bunun bir örneği “tip-S hücresi”dir. Tip-S hücresi soması GCL'nin ortasında yerleşir, dendritleri ise MCL'sinde uzanır (Nagayama ve ark., 2014).

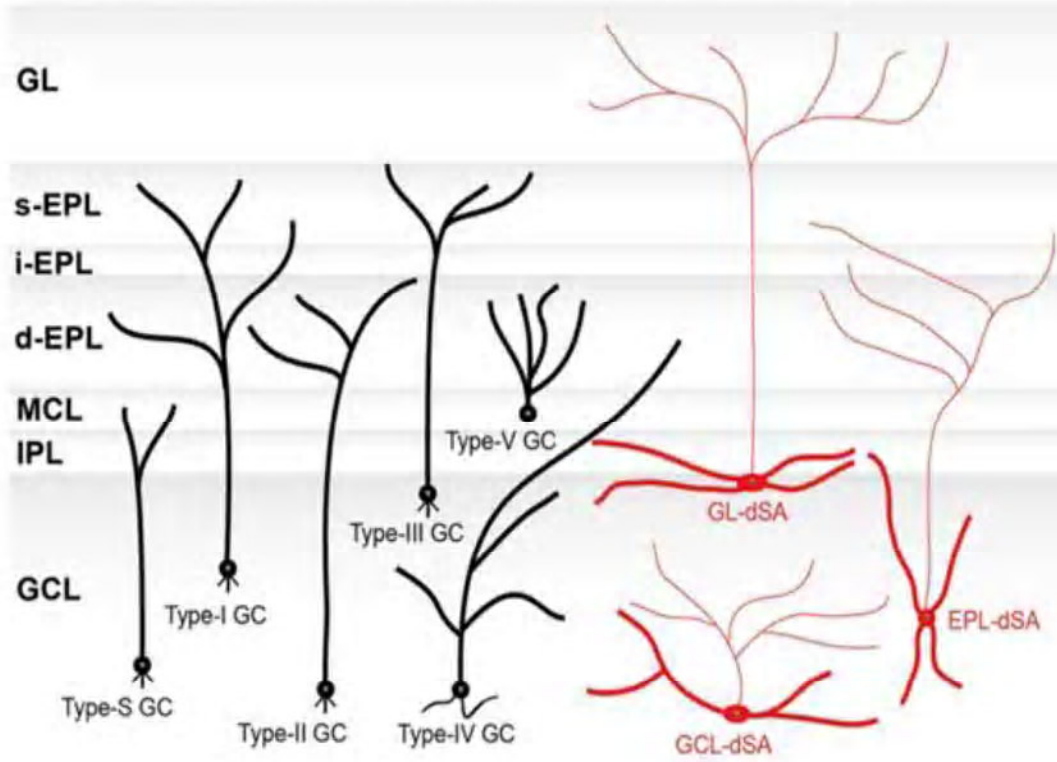
-Merkle ve ark. (2014) yetişkin farenin subventriküler zonunda (vSVZ) üretilen ve GCL'ye göç eden daha önce bilinmeyen dört internöron tipi bildirmiştir. Soma büyüklüğü/konumu, spin taşıyan dendritik dallanmalar ve aksonsuz morfolojiye dayanarak, hücrelerden ikisi “tip-IV granül hücreleri (GIV)” ve “tip-V granül hücreleri (GV)” olarak adlandırılmıştır. Tip IV granül hücre, GCL'sinde dendritik dallanma gösteren ve genellikle IPL'nin ötesine ulaşamayan granül hücresidir. Tip-V granül hücrelerinin somaları bazal dendritlerden yoksundur ve MCL'sinde yerleşir. Bu hücreler dikenli çalı benzeri apikal dendritlerini ağırlıklı olarak derin EPL'ye uzatmıştır. Karakteristik özellikleri nedeniyle yazarlar tip-IV ve tip-V granül hücrelerini sırasıyla “derin dallanan granül hücreleri (deep-branching granule cells)” ve “çalı granül hücreleri (shrub granule cells)” olarak da adlandırmışlardır (Şekil 2.36.).

Granül hücreleri inhibitör ara nöronlardır, mitral hücrelerle dentrodendritik, püsküllü hücrelerle ise dentrodendritik ve dentrosomatik sinapslar yaparak kontrol ederler. Hem kontrolateral hem de ipsilateral uyarıları alırlar. Mitral hücreleriyle yaptığı dentrodendritik sinapslar aracılığıyla, mitral hücrelerinin lateral inhibisyonundan sorumludurlar. Bu döngüde glutamaterjik ve GABAerjik reseptörler önemlidir. Lateral inhibisyon ile komşu glomerüllerdeki mitral hücrelerin farklı kokulara verdiği yanıt artar (Ennis ve ark., 2007). Granül hücresinin bir nörotransmitteri olarak sadece GABA tanımlanmıştır. Derin granül hücreler tarafından spesifik olarak eksprese edilen birkaç molekül tanımlanmıştır. Bir istisna olarak, elektrofizyolojik analizler, Grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR'ler) ekspresyon seviyelerinin yüzeysel ve derin granül hücreler arasında farklı olduğunu göstermiştir (Heinbockel ve ark., 2007).

Glisin, hem mitral/püsküllü hücrelerde hem de granül hücrelerde bir inhibitör tepki uyandırmasına ve OB'de glisin için immünoreaktivite, glisin reseptörü ve glisin taşıyıcıları bulunmasına rağmen (Trombley ve Shepherd, 1994; van Den Pol ve Gorcs, 1988), GCL'de glisinerjik nöronların varlığını düşündüren doğrudan bir kanıt yoktur (Zeilhofer ve ark., 2005). Bu nedenle, glisinerjik aksonlar OB'nin dışından kaynaklanabilir.

GCL'deki diğer internöronlar derin kısa aksonlu (dSA) hücrelerdir. Granül hücrelerle karşılaştırıldığında, dSA hücreleri daha büyük hücre gövdelerine sahiptir (10-20 μm çapında) ve dendritleri genellikle MCL'nin ötesine geçmez. Öte yandan, OB'nin farklı katmanlarına yansıyan aksonları vardır. Golgi emdirme tekniğini kullanan ilk çalışmalarda dSA hücreler somalarının morfolojilerine ve bulbusdaki yerleşim şekline göre (i) vertikal Cajal hücreleri, (ii) horizontal hücreler, (iii) Blanes hücreleri ve (iv) Golgi hücreleri olarak alt tiplere ayrılmıştır (Price ve Powell, 1970a; Schneider ve Macrides, 1978; Nagayama ve ark., 2014). Bu hücreler artık dSA hücreleri olarak yeniden sınıflandırılmaktadır (Eyre ve ark., 2008).

Granül hücre katmanındaki nöron tipleri



Şekil 2.36. Granül hücre katmanındaki (GCL) granül hücrelerin 6 alt tipinin (GC; siyah) ve 3 alt tip derin kısa aksonlu hücrenin (dSA hücreleri; kırmızı) şematik gösterimi. Granül hücrelerinin ve dSA hücrelerinin alt tipleri, hücre somalarının GCL'deki konumuna ve dendritlerinin uzandığı katmana veya alt katmana göre belirlenir. GC'nin bu alt tipleri, tip-I GC, tip-II GC, tip-III GC, tip-IV GC, tip-V GC ve tip-S GC hücreleri olarak adlandırılır. dSA hücrelerinin alt tipleri, aksonlarının dağılımını yansıtan GL-dSA, EPL-dSA ve GCL-dSA hücreleri olarak adlandırılır. Kısaltmalar: GL: Glomerüler Katman, ONL: Olfaktör Sinir Telleri Katmanı, IPL: İç Pleksiiform Katman (Nagayama ve ark., 2014).

Yetişkin fare SVZ'sinde tahmini 10.000 yeni nöron üretilir ve her gün rostral göç akımı yoluyla OB'ye girer. Bu yeni nöronların yaklaşık yarısı, mevcut nöronal devreye

yetişkin doğumlu (adult-born) granül hücreler olarak entegre edilir (Petreanu ve Alvarez-Buylla, 2002; Yamaguchi ve Mori, 2005). Öte yandan, önceden var olan birçok granül hücresi her gün apoptotik hücre ölümü yoluyla devreden çıkarılır. Belirli granül hücresi türlerinin yetişkin doğumlu granül hücreleriyle değiştirilip değiştirilmediği ilginç bir sorudur. Hem morfolojik hem de moleküler olarak, tip-S hücreleri hariç yukarıda bahsedilen tüm granül hücre tipleri yetişkin OB’inde üretilir (Merkle ve ark., 2007; Merkle ve ark., 2014). Bugüne kadar, tip-S hücrelerinin değişimi araştırılmamıştır. Yetişkin doğan granül hücreleri MCL, IPL ve GCL boyunca dağılmış olsa da çeşitli çalışmalar (Imayoshi ve ark., 2008; Lemasson ve ark., 2005) yetişkin doğan granül hücrelerinin derin GCL’inde daha yüksek yoğunlukta bulunduğunu, embriyonik/perinatal doğumlu granül hücrelerinin ise tercihen MCL, IPL ve yüzeysel GCL’de bulunduğunu öne sürmüştür. Kelsch ve ark. (2007), sıçanda, somaları yüzeysel GCL’inde bulunmasına rağmen, daha fazla yetişkin doğumlu granül hücresinin dendritlerini derin EPL’de dallandırdığını ortaya koymuştur.

Subependimal katman (SEZ), OB’nin en derin katmanı olup yetişkinlerde hücre bakımından fakir bir bölgedir. Olfaktör bulbus internöronlarının bazı progenitör hücrelerini barındıran bölgedir ve bu derin katman bazen ayırt edilir (Shipley ve Ennis, 1996). Lateral ventrikülün rostral kısmına karşılık gelen çok küçük olfaktör ventrikülü çevreler. Bazı türlerde OB içindeki embriyolojik bir boşluk varlığını sürdürür ve olfaktör bulbus ventrikülü (OBV) olarak adlandırılır (Marschner, 1970; McGregor ve ark., 2023; Rae, 1994; Smitka ve ark., 2009). Subependimal katmandaki hücreler olfaktör ventrikülü (eğer varsa) kaplar ve gelişim sırasında birçok OB hücresinin progenitörleri bu bölgeden türer. Ancak yetişkinde diğer ana OB internöronları (sadece birkaç juxtaglomerular hücre ile esas olarak granül hücreleri) daha rostral subventriküler ön beyin bölgelerinde üretilir ve daha sonra "rostral göç yolu (RMS)" boyunca bulbusa göç eder (Lois ve Alvarez-Buylla, 1994; Lois ve ark., 1996; Luskin, 1993; Yang, 2008).

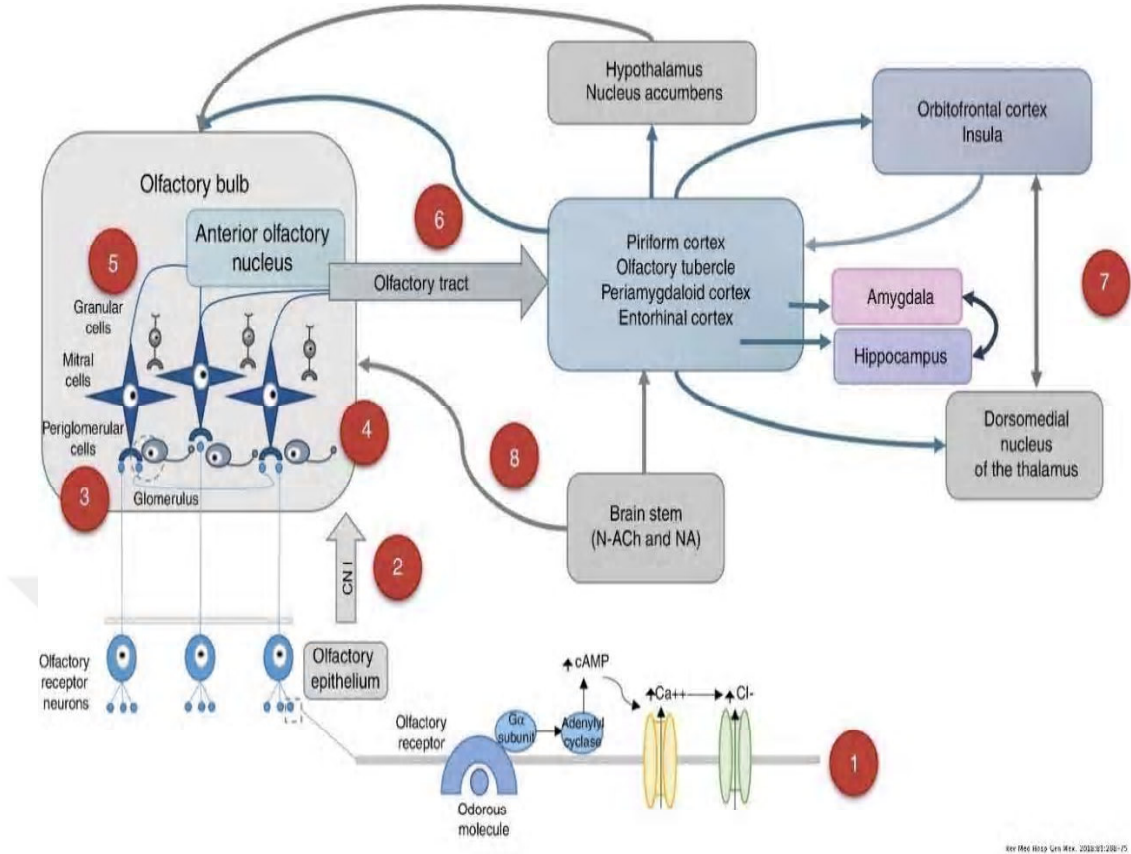
2.3. Koku Alma İşlevinin Düzenlenmesinin Özet Gösterimi

Kokuların tespiti, algılanması, ayırt edilmesi ve tanımlanmasını içeren koku alma işlemini, hiyerarşik bir şekilde özetlemek kolay değildir (Şekil 2.37.). Çünkü birçok

yapı aynı anda sürece katılmaktadır. Bu yapılar ve fonksiyonları Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Kokunun işlenmesi sırasında aktive olan beyin alanları (Aguilar Martínez ve ark., 2018).

Yapı	Koku alma işlevi (olfaktör fonksiyon)
Piriform korteks (PC)	Kokuların tanımlanması ve ayırt edilmesi
	Koku alma çalışma belleği
	"Koku nesnesinin" temsili için anahtar bölge
	Anterior PC: kokunun moleküler özelliklerini kodlar
	Posterior PC: koku türünü kodlar
Amigdala	Kokunun yoğunluğu
	Koku hafızası ve duygusal değer
Hipokampus	Koku hafızası
İnsula	Koku uyarınının hedonisitesi
	Kokudan tada entegrasyon
Orbitofrontal korteks (OFC)	Kokuyu tanımlama
	Koku uyarınının hedonisitesi
	Medial kısım: hoş kokular
	Lateral kısım: hoş olmayan kokular
	Duygusal rol ataması
	Koku hafızası
	Sol OFC: hoş olmayan kokular
	Sağ OFC: hoş kokular
	Koku bilgisinin çoklu duyuşsal entegrasyonu; anlamsal ilişkilendirme



Şekil 2.37. Kokunun algılanmasının özet gösterimi. (1) Kokulu moleküller, olfaktör mukozadaki bipolar nöronların silyumlarında bulunan spesifik reseptörleri (koku reseptörleri) aktive eder. Olfaktör sinyal → Olfaktör reseptör → G protein aktivasyonu $\alpha \rightarrow \uparrow$ Adenilil siklaz 3 → $\uparrow$ siklik AMP → Ca^{++} giriş → Cl^- çıkış → depolarizasyon (Benarroch, 2010; Connelly ve ark., 2013; Hasin-Brumshtein ve ark., 2009). (2) Reseptör nöronların aksonları olfaktör sinir (kraniyal sinir I) oluşturur, lamina kribrozayı geçer ve OB'deki mitral veya püsküllü hücrelerle sinaps yaparak bir glomerül oluşturur. (3) Her bir glomerül, belirli bir koku için aynı tip reseptörü ifade eden koku reseptörü nöronlarından uyarı alır (Chen ve Shepherd, 2005); ancak OB'de kemotropik harita yoktur (Wilson ve Mainen, 2006). Glomerüller aktivite, kokulu uyarıların tespit edilmesi için çok önemlidir. (4) Bu aksonlar aynı zamanda diğer mitral hücrelerle yerel karşılıklı inhibisyon oluşturan ve glomerülleri birbirine bağlayan internöronlar olan periglomerüler hücrelerle de sinaps yapar. (5) Granüler hücreler, belirli bir kokuya verilen yanıtı güçlendirmek için mitral hücrelerle dendrodendritik sinapslar oluşturur. (6) Mitral hücrelerin aksonları lateral koku yolu aracılığıyla ipsilateral koku korteksine projekte olur. Bu aksonlar anterior olfaktör nükleus, piriform korteks, anterior kortikal amigdaloid nükleus, periamigdaloid korteks ve entorhinal korteks gibi primer koku alanlarına projekte olur. (7) Piriform korteks, talamusun dorsomedial çekirdeği aracılığıyla doğrudan ve dolaylı olarak posterior orbitofrontal kortekse, ayrıca entorhinal kortekse ve amigdala bağlanır. Entorhinal korteks amigdala ve hipokampusa bilgi gönderir. Piriform korteks ve amigdala hipotalamusa, nükleus akumbense ve ventral pallidum aracılığıyla talamusun dorsomedial çekirdeğinin medial kısmına projeksiyon yapar. Posterior orbital korteks ve komşu anterior insula, tüm primer koku alanlarıyla karşılıklı bağlantılara sahiptir ve bilgiyi diğer duyuşal uyarılarınla entegre etmek için diğer kortikal alanlarla etkileşime girer (Aguilar Martinez ve ark., 2018). (8) Hem OB hem de birincil koku korteksi hipotalamus ve beyin sapından afferentler alır. Kolinerjik stimülasyon, modülasyon için periglomerüler ve granüler hücrelerde gama-amino bütirik asit (GABA) salınımını azaltarak M2 reseptörlerine etki eder (Pignatelli ve ark., 2008).

2.3.1. Koku Alma Fonksiyon Bozuklukları

Koku algısının bütünlüğü yani normal olfaktör fonksiyon (normosmi), koku alma duyusunun (1) kantitatif veya (2) kalitatif bozukluğunu belirten iki ana kategorideki değişiklikler ile bozulabilir. İlk kategori anosmi, hiposmi (veya mikrosmi) ve hiperosmiden oluşur. Koku alma duyusunun tamamen kaybı anosmi olarak bilinir. Anosmi her iki tarafta veya tek bir tarafta oluşabilir. Eğer burnunun sadece bir tarafında anosmi varsa tek taraflı anosmi, öte yandan, burnun her iki tarafında ise bilateral anosmi veya total anosmi olarak adlandırılır (Doty, 2009). Azalmış koku alma duyusu hiposmi olarak tanımlanır. Olfaktör sistemin normal fonksiyon görmesine rağmen kokuları tanımadaki yetersizlik olfaktör agnozi olarak adlandırılır. Hiperosmi, anormal derecede yükselmiş bir koku alma duyusu ile karakterize nadir görülen bir durumdur (Doty 2009).

İkinci kategoriyi oluşturan kalitatif olfaktör fonksiyon bozukluğu disosmidir. Disosmi koku alma duyusunun niteliğinin değişmesidir. Bu ya parosmi (koku bozulması) ya da fantazi veya koku halüsinasyonu (kaynak bulunmadan kokunun algılanması) şeklinde ortaya çıkar (Wrobel ve Leopold, 2004).

Olfaktör sistemin bozulma nedenleri olarak ilerleyen yaş, viral enfeksiyonlar (hepatitis, influenza, herpes vb.), toksik kimyasallar (herbisitler, pestisitler, solventler vb.), travma, bazı kanser türleri ile nörolojik hastalıklar (Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı, multi-infarct dementia, amyotrophic lateral skleroz, şizofreni, epilepsi vb.) (Álvarez-Comacco ve ark., 2017; Bakker ve ark., 2016; Doty ve ark., 1995; Doty, 2012; Gu ve ark., 2014; Hornix ve ark., 2019; Jung ve ark., 2019; Khurshid ve ark., 2019; Riva ve ark., 2017; Ruan ve ark., 2012; Schofield ve ark., 2014; Spotten ve ark., 2017; Quinn ve ark., 1987) sayılabilir. Nörogelişimsel hastalıklardan (Hornix ve ark., 2019) nörodejeneratif bozukluklara (Ruan ve ark., 2012) kadar çeşitli nörolojik hastalıklarda koku alma işlev bozukluğu hastalık fenotiplerinin kritik özellikleridir (Demarquay ve ark., 2007). Örneğin, hiposmi doğal yaşlanma (Doty ve Kamath, 2014), Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi ilerleyici nörodejeneratif hastalıklarda (Conti ve ark., 2013; Devanand ve ark., 2000; Doty, 2012) ortaya çıkar. Hiperosmi genellikle şizofreni ve manik bozukluklarla birlikte görülür (Moberg ve ark., 2014; Turetsky ve ark., 2009). Benzer şekilde, hiposmi ve

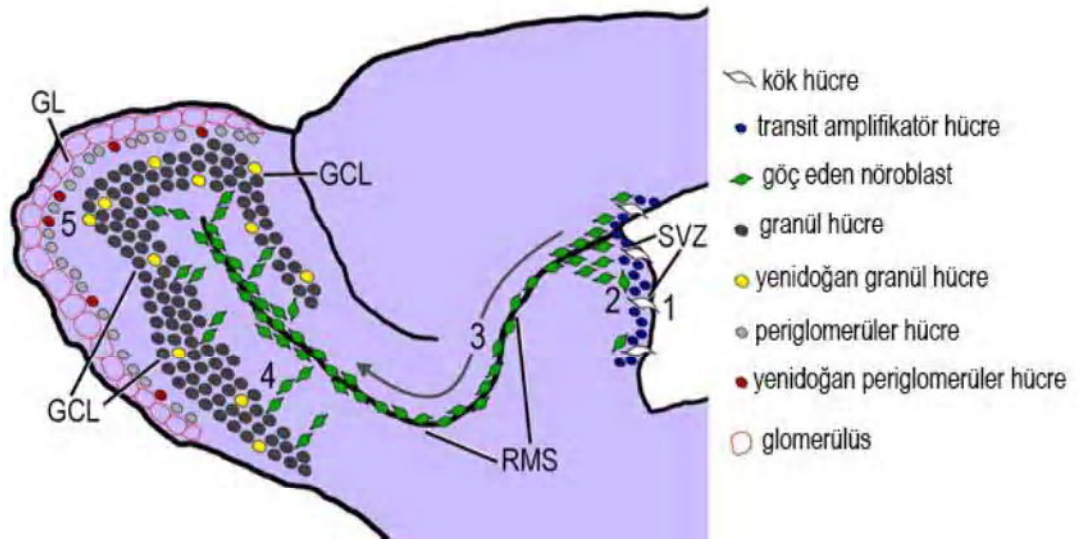
hiperosmi, duyu organlarındaki değişikliklerle ilişkili olan otizm spektrum bozukluğunun tanı kriterleri arasında yer almaktadır (Tonacci ve ark., 2017). Birbirinden farklı hastalıklarda koku alma fenotipinin tutarlı varlığı, koku alma sistemlerinin nörolojik hastalıklara karşı benzersiz bir şekilde savunmasız olduğunu ve koku alma sisteminin spesifik hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli bir anahtar olduğunu gösterir. Koku alma bozukluğunun yaşamın ilerleyen dönemlerinde bilişsel bozukluklarla ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Roberts ve ark., 2016). Nörodejeneratif bozukluklarda koku alma işlev bozukluğunun nöropatolojik substratı tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte olfaktör epitel, OB, primer olfaktör korteks ve bunların ikincil hedefleri dahil olmak üzere koku alma sisteminin çeşitli seviyelerindeki dejeneratif değişiklikleri yansıtmaları olasıdır (Benarroch, 2010). Nitekim, erken evre nörolojik hastalıkların, beyindeki en önemli duyu organı olan OB’de nöronal hasarlara neden olduğu ve koku alma disfonksiyonunun tipik olarak bilişsel bozukluktan önce şekillendiği gösterilmiştir (Graves ve ark., 1999; Velayudhan ve ark., 2013).

Çeşitli çalışmalar cinsiyet farklılıkları ile dolaşımdaki cinsiyet hormonlarındaki değişikliklerin olfaktör fonksiyonu etkilediğini göstermiştir. Örneğin: Menstrüel siklusun evrelerine göre kadınlarda, koku algılama eğiğinin ovulasyon evresinde önemli ölçüde düştüğü bildirilmiştir (Navarrete-ve ark., 2003). Oral kontraseptif kullanan kadınların kullanmayanlara kıyasla koku tanımlamalarının daha iyi olduğu ve postmenopozal dönemde hormon replasman tedavisinin koku hafızasının yanı sıra bilişsel işlevi de iyileştirdiğini ortaya konmuştur (Doty ve ark., 2015; Landis, 2004). Erkeklerde de düşük testosteron düzeylerinin koku alma fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (Kırgezen ve ark., 2021). Olfaktör fonksiyon bozukluklarının metabolik hormon olan tiroid hormonu bozukluklarından özellikle hipotroidizm durumunda yaygın klinik anormallikler arasında bulunduğu, tiroid hormonları ile tedavinin koku alma kusurlarını büyük ölçüde tersine çevirdiğini çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (Baskoy ve ark., 2016; Günbey ve ark., 2015; Mackay-Sim ve Sakal, 1987; McConnell ve ark., 1975).

2.3.2. Olfaktör Bulbus'da Nörogenez ve Tiroid Hormonları Arasındaki İlişkiler

Nöral kök hücreler (NSC) ektodermden köken alırlar. Nöral tüpün gelişimi ilerledikçe, rostral bölgeler erken prosensefalon da dahil olmak üzere üç ana vezikül oluşturacak şekilde genişler (Götz ve Huttner, 2005). Anterior nöral tüpten gelen NSC popülasyonu, telensefalik vezikülde multipotent radyal glia progenitörlerine dönüşür. Bunlar ventriküler bölgenin en apikal katmanında radyal glia hücrelerini (RGC'ler) oluşturmak üzere bölünürler. Kortikogenezin çoğunluğu kemirgenlerde embriyonik 10.5. günden embriyonik 18.5. güne kadar gerçekleşir ve burada RGC'ler serebral kortekste eksitator nöronların çoğunu oluşturur (Götz ve Huttner, 2005). RGC'lerin birincil bölünmeleri asimetrik ve yeni bir RGC ve ara progenitör oluşturur. Devam eden gelişimle birlikte, RGC'lerin ara progenitörleri apikal ventriküler bölgeden göç eder ve ikinci bir proliferasyon bölgesi olan subventriküler bölgeyi (SVZ) oluşturur (Noctor ve ark., 2004). Ara progenitörler RGC'lerin apikal uzantıları boyunca göç eder, ayrılır ve post-mitotik glutamaterjik nöronlara farklılaşmaya devam ettikleri kortikal plakayı oluşturmaya başlarlar. Her bir kortikal katman, daha önce üretilen progenitörlerin korteksin en derin katmanlarını doldurduğu ve yüzeysel katmanlarda yer alacak nöronların daha sonra üretildiği içten dışa doğru sıralı bir şekilde üretilir (Götz ve Huttner, 2005). Buna ek olarak, ventral gangliyonik eminenslerdeki NSC'ler, gelişmekte olan kortekse teğetsel olarak göç eden ve burada inhibitör internöron ağını kuran progenitörler üretir (Liodis ve ark., 2007; Silva ve ark., 2018). Korteksteki son konumlarına ulaştıklarında, her iki nöron türü de olgun sinir devreleri için gerekli sinaptik bağlantıları oluşturmak için dendritleri ve tek bir aksonu uzatmaya başlar. Postnatal SVZ, embriyonik SVZ'nin yetişkin SVZ'ye geçiş yaptığı postnatal yaşamın ilk haftasındaki geçici bir durumdur (Cayre ve ark., 2009; Merkle ve ark., 2004). Radyal glia hücreleri pia mater ile temas eden apikal uzantılarını geri çekmeye başlar ve proliferasyon hızları yavaşlar (Lacar ve ark., 2010; Tramontin ve ark., 2003). Subventriküler bölgedeki nörogenez, NSC'lerin popülasyonlarını genişlettiği ve gbu hücrelerin gelişen devrelere dahil olan nöroblastlara farklılaştığı sıkı bir şekilde düzenlenen bir olaydır (Platel ve ark., 2010). Nöral kök hücreler, “transit amplifikatör hücreler (TAC)” olarak adlandırılan ve oldukça proliferatif olan yavru hücrelere farklılaşır. Transit amplifikatör hücreler de nöroblastlara farklılaşarak SVZ'den RMS'ye göç eder ve OB'de olgun nöronlar haline gelir. Ayrıca, postnatal NSC'ler hem

nöron hem de glia popülasyonlarına katkıda bulunur ve yeni doğan nöronların çoğu OB'ye göç eder (Garcia ve ark., 2004; Parras ve ark., 2007; Relucio ve ark., 2012). Subventriküler bölgedeki postnatal ve yetişkin NSC'ler ağırlıklı olarak OB internöronlarına ve ayrıca korpus kallozum, fimbria ve striatumdaki bazı oligodendrositlere farklılaşır (Jackson ve ark., 2008). Kemirgenlerde yetişkin doğan olfaktör prekürsör (öncü) hücreler [kök hücreler/TAC'ler] öncelikle SVZ içinde çoğalır ve burada olgunlaşmamış nöronlara (nöroblastlar) farklılaşır (Alvarez-Buylla ve García-Verdugo, 2002; Doetsch ve ark., 1999; Luskin, 1993; Sanai ve ark., 2011). Nöroblastlar, kan damarları boyunca RMS'den OB'ye doğru zincirler halinde teğetsel olarak göç eder, bu yaklaşık 2-6 gün sürer (Lois ve ark., 1996; Whitman ve ark., 2009). Doğumdan sonraki 5-7. günlerde, yetişkin doğumlu nöroblastlar OB'nin granüler, periglomerüler ve dış pleksiform hücre katmanlarına doğru radyal olarak göç eder (Şekil 2.38.).



Şekil 2.38. Yetişkin kemirgen SVZ ve OB'de nörogenez. Yetişkin fare beyninin şematik sagittal görünümü (Sui ve ark. 2012). Bölge 1) Yetişkin doğan olfaktör prekürsör (öncü) hücreler [kök hücreler/transit amplifikatör (çoğaltıcı) hücreler] öncelikle SVZ içinde çoğalır ve burada 2) olgunlaşmamış nöronlara (nöroblastlar) farklılaşır. 3) Nöroblastlar daha sonra RMS boyunca teğetsel olarak ana OB'ye doğru göç eder, bu yaklaşık 2-6 gün sürer. Ok, RMS boyunca nöroblast göçünün yönünü göstermektedir. 4) Doğumdan sonraki 5-7. günlerde, yetişkin doğumlu nöroblastlar OB'nin granüler, periglomerüler ve dış pleksiform hücre katmanlarına doğru radyal olarak göç eder. 5) Doğumdan 15-30 gün sonra, OB'deki yetişkin doğan hücreler olgunlaşarak geniş dendritik arborizasyon gösteren yerel internöronlar oluşturur (Abrous ve ark., 2005; Ming ve Song, 2005; Petreanu ve Alvarez-Buylla 2002). GCL: Granüler Hücre Katmanı, GL: Glomerüler Katman, RMS: Rostral Göç Yolu, SVZ: Subependimal Bölge.

Doğumdan 15-30 gün sonra, OB'deki yetişkin doğan hücreler olgunlaşarak geniş dendritik arborizasyon gösteren yerel internöronlar oluşturur (Abrous ve ark., 2005; Ming ve Song 2005; Petreanu ve Alvarez-Buylla, 2002; Whitman ve Greer, 2007b). Genç yetişkinde, OB'ye göç eden yetişkin doğumlu hücrelerin yaklaşık %50'si OB devresine entegre olan internöronlar oluşturmak üzere farklılaşırken, diğer yarısı SVZ, RMS veya OB'de progenitörler, nöroblastlar veya genç nöronal hücreler olarak programlanmış hücre ölümüne uğrar (Lledo ve Saghatelian, 2005; Petreanu ve Alvarez-Buylla, 2002; Winner ve ark., 2002). Olfaktör bulbusa ulaşan en yeni üretilen hücrelerin yaklaşık %94'ü granül hücrelerine, geri kalanlar ise periglomerüler hücreler (%4) veya astrositlere (%2) dönüşür (Winner ve ark., 2002). Kemirgen SVZ nörogenezinin kokuyu ayırt etme, kokuyu öğrenme ve hafıza gibi çeşitli koku alma işlevlerini düzenledikleri ortaya konmuştur (Bath ve ark., 2008; Breton-Provencher ve ark., Enwere ve ark., 2004; Gheusi ve ark., 2000; Rochefort ve ark., 2002).

Bugüne değin yapılan çalışmalar OB'deki nörogenezin çeşitli hormonlar tarafından etkilendiği gösterilmiştir. Örneğin; Shingo ve ark. (2003), gebelik ve laktasyon periyodundaki farelerde OB'deki nörogenez oranının gebeliğin ilk üç ayında, emzirmenin ilk haftasında ve çiftleşmeyi takiben arttığını bildirmişlerdir. Maternal hormonlardan prolaktinin (PRL), bulbar nörogenezi tetikleyen anahtar bir faktör olduğu tespit edilmiştir. Doğumdan sonraki bu kritik ilk birkaç hafta boyunca, emziren annelerin OB'sindeki granül hücreleri de artmış yapısal stabilite gösterir, bu da artan sayıda internöronun stabil entegrasyonunun anne davranışının bazı yönleri için gerekli olduğunu ifade eder (Kopel ve ark., 2012). Olfaktör bulbus erişkin nörogenezinin de çiftleşme davranışında rol oynadığı görülmektedir. Baskın erkek fareler tarafından salınan feromonların dişilerde koku almayı ve hipokampal nörogenezi arttırdığı bulunmuş olup hücre proliferasyonundaki bu artış baskın eşler için erkek tercihinde gereklidir (Mak ve ark., 2007). Benzer şekilde, erkek farelerde, yavruların kokusunu tanıma yeteneği, PRL ile uyarılan nöronal proliferasyona dayanır (Mak ve Weiss, 2010).

Tiroid hormonunun da hem olfaktör epitel hem de olfaktör bulb gelişiminde önemli bir rol oynadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Paternostro ve ark. (1991), tiroid hormonu değişikliklerinin yeni doğan sıçanların olfaktör epiteli üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Yapay olarak oluşturulan hipo ve hipertiroid sıçanlar, olfaktör reseptör

nöronlarının (ORN) olgunlaşması, yüzey yoğunluğu ve toplam reseptör sayısı açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada, hipotiroid sıçanlarda koku epitelinin daha küçük olduğu, ORN'ler için olgunlaşmamış/olgunlaşmış oranında bir artışın şekillendiği, ancak toplam ORN'lerin aynı yoğunlukta olduğu saptanmıştır. Bu araştırmacılar tiroid hormonlarının postnatal olfaktör epitel proliferasyonu ve reseptör hücre olgunlaşması için gerekli olduğu ve aşırı dozda tiroid hormonlarının bu sonuçları iyileştirmeyeceği sonucuna varmışlardır. Benzer şekilde Dhong ve ark. (2003), hipotiroidizmin koku epiteli üzerindeki olası histolojik etkilerini araştırmış; immünohistokimyasal boyama kullanarak koku epitelinde daha düşük olgunlaşma skorları bulmuşlardır. Kemirgenlerde yapılan diğer çalışmalarda da postnatal hipotiroidizmin, olfaktör epitelin toplam yüzey alanında ve ayrıca olgun olfaktör reseptör nöronlarının sayısında bir azalmaya neden olduğu (Paternostro ve Meisami, 1993) ve olfaktör epitelin rejenerasyonunu (nörogenez ve proliferasyonu) etkilediği gösterilmiştir (Alvarez-Dolado ve ark., 2001; Beard ve Mackay-Sim 1987; Calza ve ark., 2000; Dhong, 2003; Mackay-Sim ve Sakal, 1987; Paternostro ve Meisami, 1993). PTU ile hipotiroidizm oluşturulan yetişkin farelerin koku epitelinin olfaktör reseptör nöronlarının gelişimlerinin bozulduğu ve bu hayvanların koku alma duyularının kaybolduğu (anosmi) rapor edilmiştir (Mackay-Sim ve Sakal, 1987). Benzer şekilde Paternostro ve Meisami (1993), hipotiroidizmin, olfaktör epitelde bulunan ORN'lerin sayısını azaltırken, süten kesilme sonrası dönemde devam eden tiroid hormonu eksikliğinin, koku alma epitelinde büyüme olaylarının neredeyse durmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar yaptıkları bir başka çalışmada tiroid hormonlarının ORN'lerin olgunlaşması ve yeni olgunlaşan ORN'lerin süt emme ve süten kesilme sonrası dönemdeki sıçan olfaktör epitelinde birikmesi için gerekli olduğunu tespit etmişlerdir (Paternostro ve Meisami, 1996). Bununla birlikte, hipotiroidizmin olfaktör epitel üzerindeki etkilerini, doğumdan itibaren PTU verilerek hipotiroidizm oluşturulmuş erişkin olmayan sıçanlarda gösterdiği, ancak erişkin sıçanlarda etkili olmadığı bildirilmiştir (Brosvic ve ark., 1996). Diğer araştırmacılar da doğumda PTU uygulamasıyla indüklenen hipotiroidizmin farelerde koku duyusunun kaybına neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Beard ve Mackay-Sim, 1987; Brosvic ve ark., 1996; Mackay-Sim ve Beard, 1987; Paternostro ve Meisami, 1993; Tong ve ark., 2007). Yetişkin sıçanlarda PTU ile indüklenen hipotiroidizmin OB'de

nöral kök hücre proliferasyonu artırdığı, hipertiroidizmin ise azalttığı tespit edilmiş ve böylece tiroid hormonlarının nöral kök hücre proliferasyonunu ve olgunlaşmasını yetişkinlikte de etkilediği ileri sürülmüştür (Fernandez ve ark., 2004).

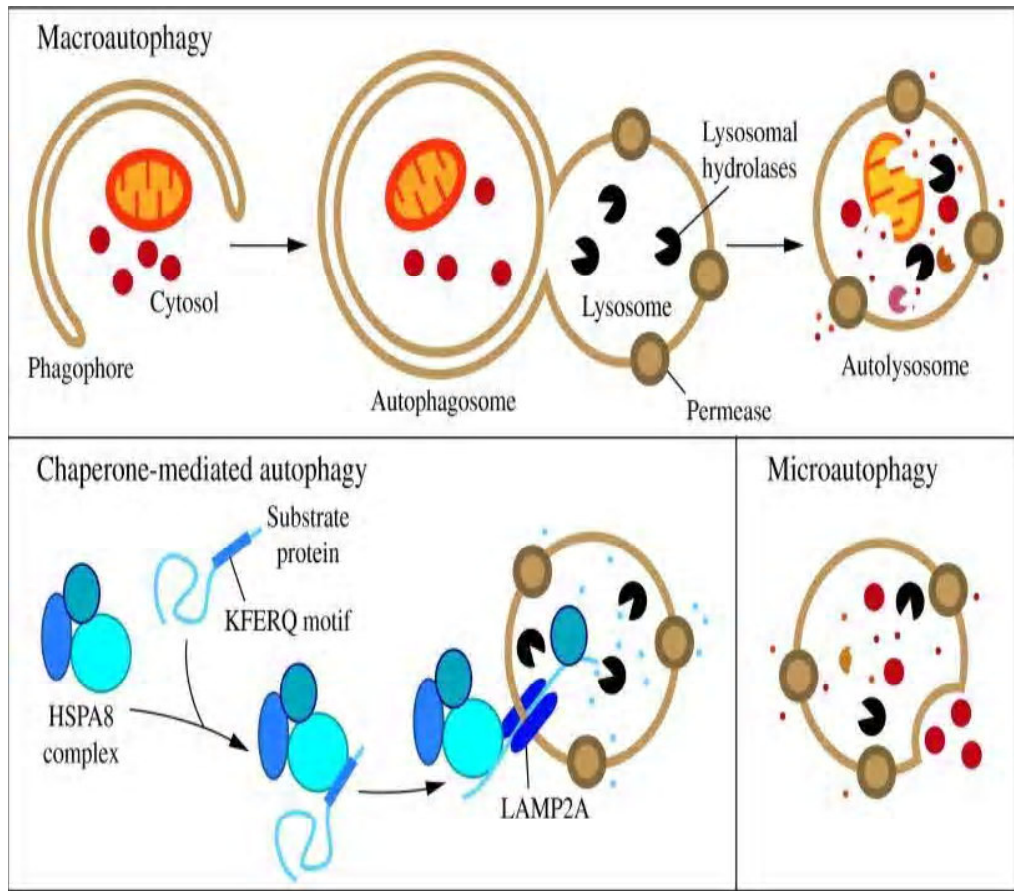
Hoyk ve ark. (1996), doğum öncesi PTU uygulanarak hipotiroidizm oluşturulan sıçanların OB'lerinde EPL'nin genişliğinde belirgin bir azalma ve tiroksin uygulanan hipertiroidili sıçanların OB'lerinin EPL katmanının genişliğinde belirgin bir artış gözlemişlerdir. Prenatal PTU verilen sıçanlarda mitral hücre dentritlerinde, postnatal PTU verilen hipotiroidili sıçanlarda granüler hücre dentritlerinde ve tiroksin verilen sıçanlarda glia hücrelerinin uzantılarında önemli bir azalmanın olduğunu belirlemişlerdir (Hoyk ve ark., 1996).

2.3.3. Otofaji, Nöronal ve Metabolik Hastalıklar İlişkisi

Otofaji, çeşitli sitoplazmik moleküllerin (proteinler, lipidler, nükleik asitler ve polisakkaritler) (Farré ve Subramani, 2004; Uttenweiler ve Mayer, 2008) ve mitokondri gibi organellerin (Farré ve ark., 2009) parçalanmak ve geri dönüştürülmek üzere izole bir membranla çevrelendiği ve lizozoma gönderildiği önemli bir hücre içi bozunma sürecidir.

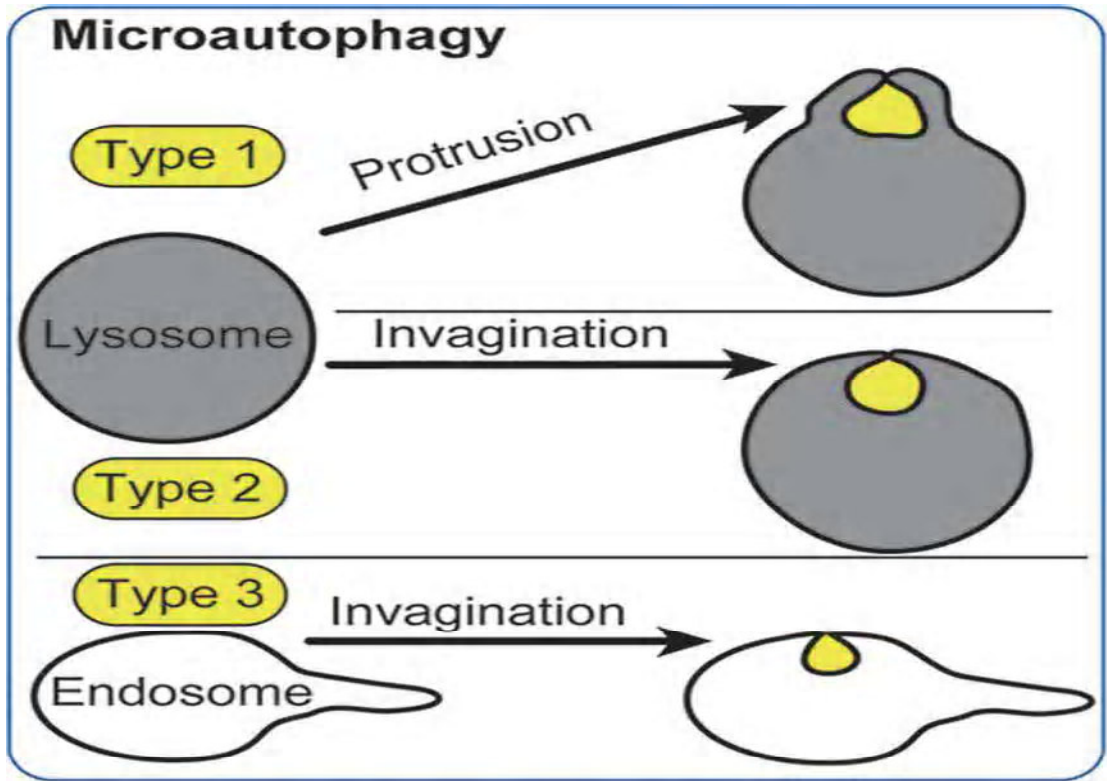
- Temel otofajik mekanizma maya, hayvanlar ve bitkiler dahil olmak üzere farklı ökaryotlarda meydana gelen evrimsel olarak korunmuş katabolik bir olay olup hasarlı organelleri, yanlış katlanmış protein agregatlarını ve uzun ömürlü proteinleri uygun şekilde elimine etmede vazgeçilmez bir rol oynar (Harris ve Rubinsztein, 2011).
- Herhangi bir hücrede bazal seviyelerde meydana gelir ve hücrel homeostazı sağlar.
- Büyüme faktörlerinin yokluğu, düşük oksijen seviyeleri veya besin açlığı gibi stres koşulları altında indüklenir ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar (Levine ve Klionsky, 2004; Mazure ve Pouyssegur, 2010; Wang ve ark., 2006; Williams ve ark., 2006).
- Ayrıca gelişim, farklılaşma, homeostaz ve belirli koşullarda hücre ölümü için de gereklidir (Levine ve Kroemer, 2008; Martinet ve ark., 2009; Wu ve ark., 2015).

Otofaji, hücre dışı ve plazma membranı proteinlerinin endositoz aracılı lizozomal yıkımından oldukça farklıdır. Memelilerde mikrootofaji, şaperon aracılı otofaji (CMA) ve makrootofaji adı altında üç tür otofaji çeşidi vardır ve "otofaji" terimi aksi belirtilmedikçe genellikle makrootofajiyi ifade eder (Cuervo, 2004; Klionsky, 2005; Klionsky, 2007; Levine ve Klionsky, 2004; Mizushima ve Klionsky, 2007; Shintani ve Klionsky, 2004; Wu ve ark., 2015). Her bir otofaji çeşidi morfolojik açıdan farklıdır ancak otofajinin üç çeşidi de kargonun parçalanma ve tekrar kullanılabilir formuna dönüşümü için lizozoma gönderilmesiyle sonlanır (Yang ve Klionsky, 2010) (Şekil 2.39.).



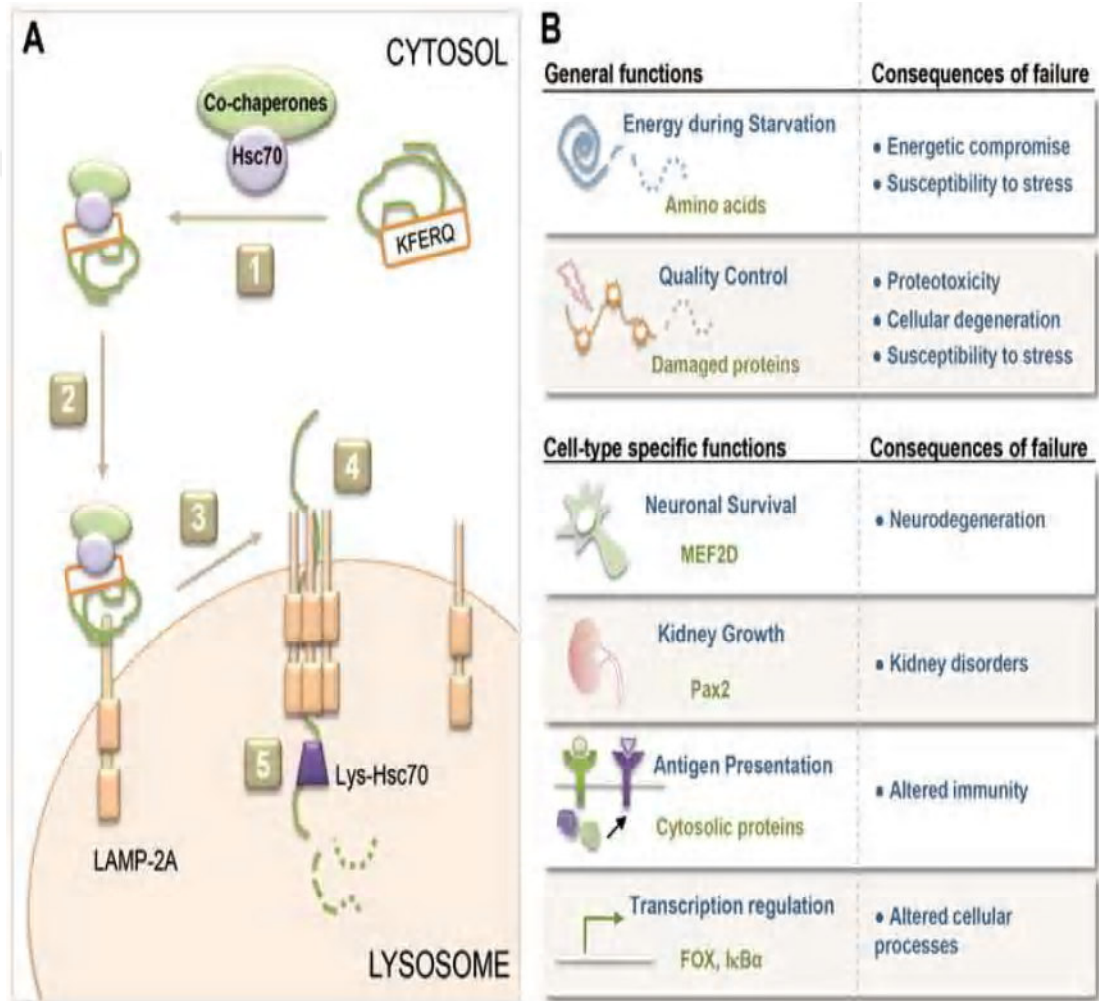
Şekil 2.39. Memeli hücrelerinde görülen otofaji çeşitleri. Makrootofaji, lizozom organelinin kargoyu ayırmak ve taşımak için sitozol kaynaklı çift membranlı veziküllerin, otofagozomlar oluşturması esasına dayanır. Organeller de dahil olmak üzere sitoplazmanın bir kısmı, bir otofagozom oluşturmak için fagofor adı verilen bir izolasyon membranı ile çevrelenir. Otofagozomun dış zarı daha sonra endozom ve ardından lizozom ile birleşir ve içeriği lizozomal enzimler tarafından parçalanır. Şaperon aracılı otofaji, tek tek katlanmamış yada yanlış katlanmış proteinleri direkt olarak lizozom membranına taşır. Mikrootofaji ise, lizozom membranının invaginasyon yapmasıyla taşınan moleküllerin doğrudan lizozoma alınımının gerçekleştiği diğer yoldur. Üç otofaji tipi de moleküllerin parçalanmasına ve parçalanma sonucu oluşan ürünlerin lizozoma taşınarak hücrenin tekrar kullanabilmesi için geri dönüştürülerek sitozole tekrar salınmasına yol açar (Parzych ve Klionsky, 2014).

Mikrotofaji: Mikrotofaji, sitoplazmik içeriklerin lizozomal membranın invajinasyonu veya deformasyonu yoluyla lizozoma girdiği bir süreci ifade eder. Organel boyutunun korunması, membran homeostazı ve nitrojen kısıtlaması altında hücrenin hayatta kalması mikrotofajinin ana işlevleridir (Mijaljica ve ark., 2011; Li ve ark., 2012). Marzella ve ark. (1980), izole edilmiş sıçan karaciğer lizozomlarının, lizozomal membranın çıkıntıları veya fincan benzeri invajinasyonları yoluyla Percoll partiküllerini in vitro olarak yuttuğunu ve lizozom içinde veziküller oluşturduğunu, bu partiküllerin bazılarının, muhtemelen veziküllerin yırtılması/lizizi yoluyla lizozomal lümen içinde serbestçe yüzdüğünü elektron mikroskobu ile göstermişlerdir. Son yıllarda yapılan bir çalışma ile taşıma için gerekli endozomal ayırma kompleksleri (ESCRT) makineleri tarafından intraluminal veziküllerin oluşumu olarak bilinen endozomal membran invajinasyonunun da sitoplazmik proteinlerin lizozoma dahil edilmesine katkıda bulunduğuna dair kanıtlar sunulmuş ve mikrotofaji benzeri bu süreç endozomal mikrotofaji olarak adlandırılmıştır (Sahu ve ark., 2011). Bu bulgulara dayanarak Oku ve Sakai (2018), mikrotofajiyi üç tipe ayırmıştır. Bunlar; tip 1, lizozomal çıkıntı ile mikrotofaji; tip 2, lizozomal invajinasyon ile ve tip 3, endozomal invajinasyon ile mikrotofajidir (Şekil 2.40.).



Şekil 2.40. Üç çeşit mikrotofajinin şematik gösterimi (Oku ve Sakai, 2018).

Şaperon aracılı otofaji (CMA): Şimdiye kadar sadece memeli hücrelerinde tanımlanmış olan bir otofaji türüdür. Mikrotofaji ve makrotofajinin aksine, CMA oldukça spesifiktir. Şaperon aracılı otofajide geri dönüştürülecek molekülü tutmak için membran yapıları yerine hedefi olan pentapeptit motifli (KFERQ motifi) kargo protein yapılarını tanımak için şaperonlar kullanılır (Massey ve ark., 2004). Şaperon aracılı otofaji, çok adımlı bir süreç olup şu aşamaları içerir: (a) kargoyu tanıma ve lizozoma gidiş; (b) kargoyu bağlayıp açma; (c) kargonun lizozoma taşınımı ve (d) lizozom lümeninde kargo bozunması (Cuervo ve Wong, 2014). (Şekil 2.41.A).



Şekil 2.41. Şaperon aracılı otofajinin (CMA) aşamaları ve fizyolojik işlevleri. (A) CMA tarafından parçalanmış proteinler sitosolde, substrat proteindeki hedef motifine bağlanıp açılma aşamasından sonra (1) kargoyu lizozom organellerinin yüzey kısmına getiren şaperon protein kompleksi tarafından tanınır (2). Kargonun reseptör protein olan lizozomla ilişkili membran proteini 2 (LAMP-2A)'nın sitosolik kuyruğa bağlanmasıyla birlikte translokasyon molekül kompleksi oluşumu için LAMP-2A'nın multimer protein kompleksini tetikler (3). Açılma aşamasından sonra, kargo molekülleri luminal şaperonun yardımıyla lizozomal membranı geçer (4) ve tamamen bozunmaya uğradıkları lizozomal matrise taşınır (5). (B) CMA'nın genel fonksiyonlarına ve hücre tipine özgü işlevleri ve bu hücre tiplerinde CMA yetersizliğinin doku ve organ bazında sonuçları (Cuervo ve Wong, 2014).

Substrat proteinlerinin tanınması sitozolde, tüm CMA substratlarının amino asit dizilerinde bulunan bir KFERQ motifine 70 kDa ağırlığında (hsc70) ısı şok-kognat proteini kurucu şaperonun [(ısı şoku 70 kDa protein 8) HSPA8/HSC70] bağlanması yoluyla gerçekleşir (Chiang ve ark., 1989; Kaushik ve Cuervo, 2012). Substrat, şaperona bağlandıktan sonra lizozomların yüzeyine hedeflenir ve burada lizozom ilişkili membran proteini tip 2A (LAMP-2A)'nın sitozolik kuyruğu ile etkileşime girer (Cuervo ve Dice 1996). Söz konusu protein, bir genin (lamp2) farklı alternatiflerle uç birleştirme özelliği olan ve değişken sitosolik ve transmembran bölgeleri bulunan, fakat birlikte bir luminal alana katılan 3 varyant proteininden birisidir. Lizozomla ilişkili membran proteini 2A, lizozom membranında monomerler halinde ve kargo taşınımı için gereken çoğul protein kompleksini (multimerik translokasyon kompleks proteinleri) oluşturabilmek için öteki protein kümeleriyle beraber bulunurlar (Bandyopadhyay ve ark., 2008). Lizozomla ilişkili membran proteini 2A'nın belirtilen komplekste toplanması dinamik bir durumdur ve kargonun reseptör proteine bağlanması ile yönlendirilir. Monodan multimer proteine geçişinde, LAMP-2A'nın kararlılığı, lizozom membranının luminal bölgesinde bulunan hsp90 formuyla etkileşmesine bağlıdır (Bandyopadhyay ve ark., 2008). Kargo molekülü katlı bir haldeyken membran reseptörüne bağlanır, fakat lizozom membranını geçmek için ise kargo molekülünün açılmaya uğraması gerekir (Salvador ve ark., 2000). Gerçekleşen akışa muhtemel olarak hsc70 ve lizozom membranında tespit edilen birtakım yardımcı şaperonlar yardım eder. Lizozomla ilişkili membran proteini 2A protein ve kompleksi lizozom membranına tamamen yerleşmeden hemen öncesi tamamlanmış olur. Lizozomla ilişkili membran proteini 2A'nın multimerizasyonu geçicidir ve substrat lümene transloke edilir edilmez LAMP-2A hsc70'e bağımlı bir şekilde bu kompleksten ayrılır (Bandyopadhyay ve ark., 2008). Substrat proteininin lizozomal membran boyunca translokasyonu, normalde lizozomlarda bulunan bir hsc70 formunun (lys-hsc70) varlığını gerektirir. Bu şaperonun translokasyona nasıl katkıda bulunduğu henüz aydınlatılamamış olsa da kargo moleküllerini fermuara benzeyen bir model gibi davranarak faal bir şekilde işlevsel olabileceği ya da ikinci bir yol olarak sitosole tekrar dönmesini engellemek için substratı aktif olmayan bir şekilde tutabileceği öne sürülmüştür (Agarraberes ve Dice, 2001). Substratın lizozomal lümene translokasyonunu takiben (kısmen luminal HSPA8'in etkisiyle) translokasyon

kompleksi sitozolik HSPA8 tarafından aktif olarak parçalanır ve LAMP2A translokasyon kompleksinden ayrılarak yeni substratı bağlayabileceği ve yeni bir translokasyon turu başlatabileceği monomerik bir duruma geri döner (Bandyopadhyay ve ark., 2008). Kargo moleküllerinin CMA tarafından tutulması ve taşınması koordineli adımlardır, fakat LAMP-2A'nın taşıma kompleksine toplanmasını riske atan durumlarda ayrılabilirler. Sonuçta, CMA seviyesi taşıma proteinlerinin monte/demontaj oranıyla değişebilir (Bandyopadhyay ve ark., 2008). Bu sürecin düzenlenmesine lateral hareketliliği etkileyen lizozomal membranın akışkanlığındaki değişimler ya da lizozom membranının protein dansitesindeki değişikliklere benzer birden fazla etken katılımı olabilir (Kaushik ve ark., 2006). Bugüne kadar, gliyal fibriler asidik protein (GFAP) ve uzama faktörü-1 kompleksinin alfa alt birimi (EF1 α) GTP'ye bağımlı bir şekilde LAMP-2A'nın montaj/demontajını spesifik olarak modüle ettiği tanımlanan ilk proteinler olmuştur (Bandyopadhyay ve ark., 2010). Gliyal fibriler asidik proteininin translokasyon kompleksine bağlanması stabilizasyona etki ederek LAMP-2A'ya fayda sağlar. Kargo molekülü kompleksi aştıktan sonra, GFAP formunun lizozomal membranda bulunan, normalde EF1 α tarafından kapsanan fosforile GFAP formlarını bağlamak üzere kompleksten mobilize olmasıyla demontaj gerçekleşir (Cuervo ve Wong, 2014).

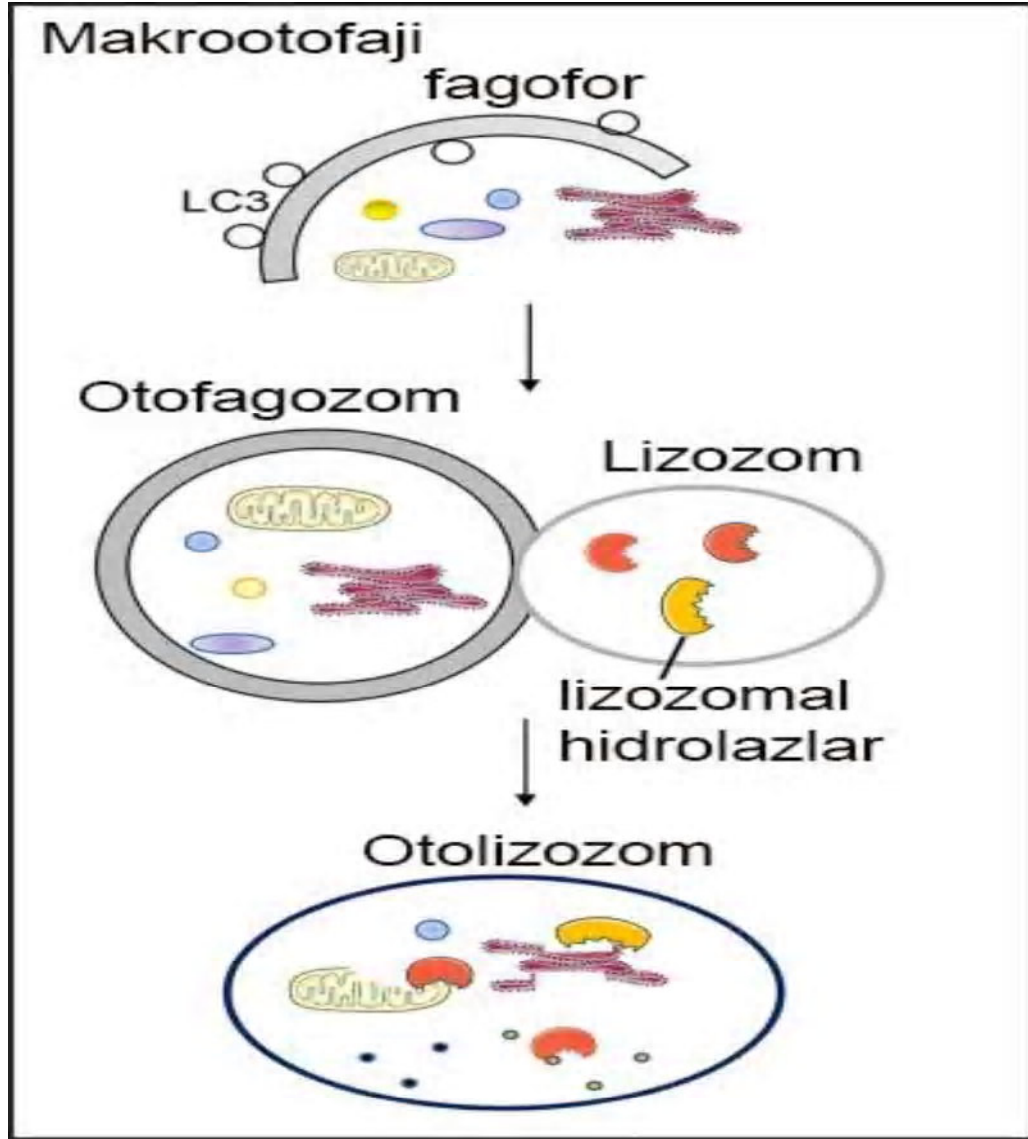
HSPA8 ve LAMP2A'nın ayrıca şaperon destekli seçici otofaji olarak adlandırılan bir tür makrotofajiye katıldığı öne sürülmektedir. Bu süreç sırasında, şaperonlar seçici olarak ubiquitine edilmiş organellerin ve protein komplekslerinin temizlenmesine yardımcı olur. Bu ubiquitine hedeflerin SQSTM1/p62 (Sekestozyom 1 proteini) ve NBR1 (BRCA1 geninin komşusu) gibi reseptörlerle ve HDAC6 gibi enzimlerle birleşmesi makrotofaji mekanizması tarafından tanınmasına, lizozoma iletilmesine ve parçalanmasına olanak sağlar (Alfaro ve ark., 2019).

Şaperon aracılı otofaji, kalsiyum ve lipid bağlayıcı proteinlerini, bazı glikolitik enzimlerini, proteazom alt birimlerini ve veziküler taşınmada yer alan proteinleri, transkripsiyon faktörlerini ve bu faktörlerin inhibitörlerini ve ayrıca çok çeşitli substrat protein moleküllerini degrade eder (Arias ve Cuervo, 2011). Translokasyon düzenlemesi hakkında çok şey bilinirken, genel CMA düzenlemesi hakkında çok daha az şey bilinmektedir (Arias ve Cuervo, 2011). Hafif oksidatif stres (Kiffin ve ark., 2004), protein yıkımlayan toksinler (Cuervo ve ark., 1999) ve uzun süreli besin

yoksunluğu dönemlerinin tümü (Auteri ve ark., 1983; Cuervo ve ark., 1995) CMA'yı yukarı doğru düzenler.

Makrootofaji: Makrootofaji (bundan sonra otofaji olarak anılacaktır), hücre içi ve sitosolik bileşenlerin bozunmasını, devrini ve yenilenmesini sağlayan evrimsel olarak korunmuş bir hücre içi katabolik yoldur. Otofaji, mitokondri, lipid damlacıkları, protein agregatları, bakteriler vb. gibi spesifik ve spesifik olmayan kargoların yakalanmasını ve asidik lizozoma taşınmasını sağlayan otofagozom olarak adlandırılan çift zarlı bir organelin oluşumunu gerektirir (Boya ve ark., 2013). Otofaji çoğu memeli hücresinde düşük seviyelerde işlev görür ve bu durum genellikle “bazal otofaji” olarak adlandırılır. Bazal otofaji sitozolik bileşenlerin yapısal dönüşümü için önemlidir. Bununla birlikte, besin(ler)den yoksunluk veya açlık, enfeksiyon, fiziksel veya mekanik ya da kimyasal stresler gibi stresle ilgili durumlara yanıt olarak şekillenen otofaji “uyarılmış otofaji” olarak tanımlanır (Mizushima, 2005).

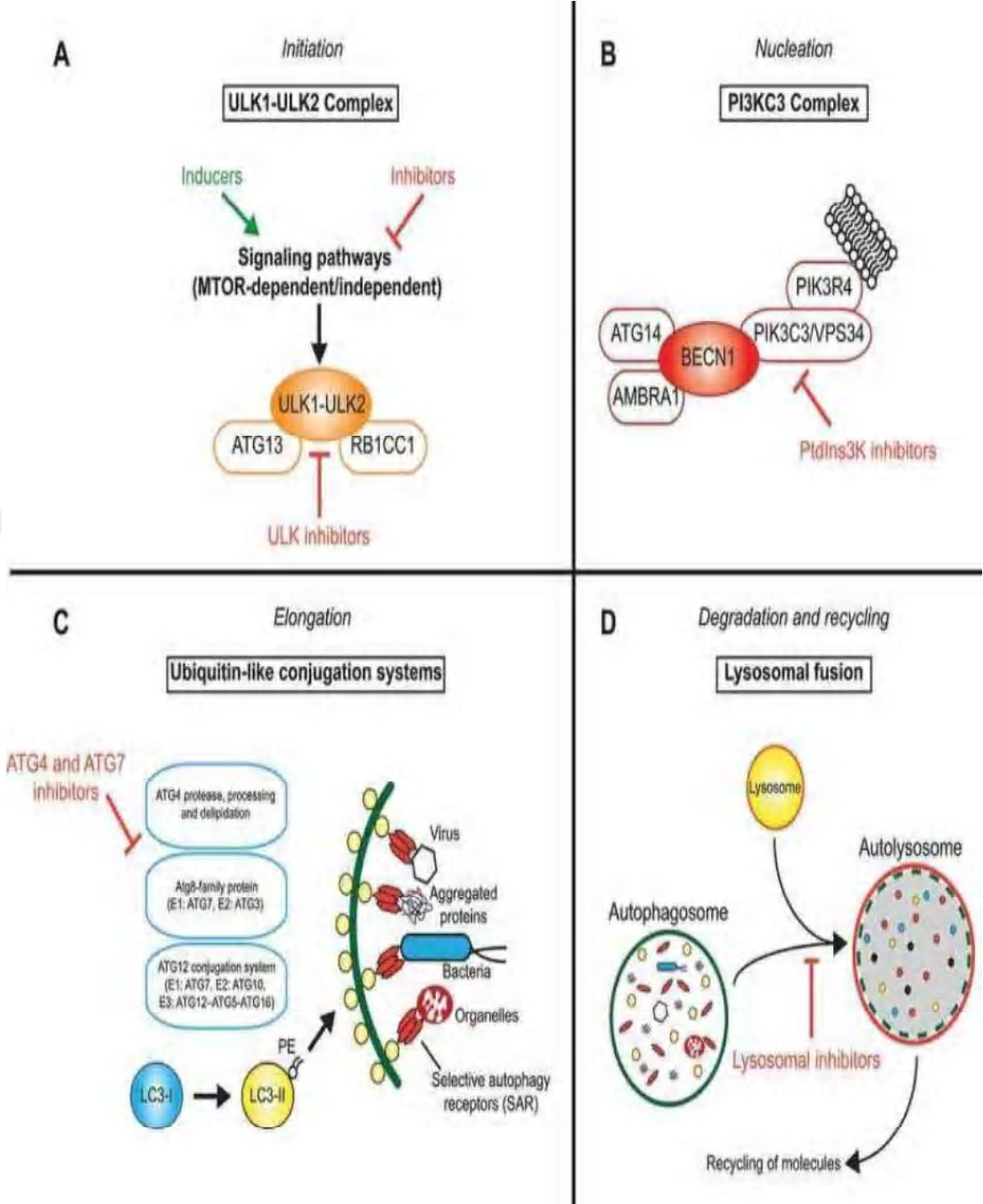
Şekil 2.42.'de özetlendiği üzere otofaji memeli hücrelerinde endoplazmik retikulum (ER) ve/veya trans-Golgi ve endozomların katkıda bulunduğu çift katlı lipid tabakasından üretilen “fagofor” adıyla da tanınan bir izolasyon membranının oluşumuyla başlar (Axe ve ark., 2008; Simonsen ve Tooze, 2009) (Şekil 2.42.). Bu fagofor, protein agregatları, organeler ve ribozomlar gibi hücre içindeki kargoyu invajinasyon için genişleyerek molekülleri çift kat membranlı bir otofagozom içinde hapseder (Mizushima, 2007). Yüklenen otofagozom, lizozomla füzyon yoluyla olgunlaşarak otofagozom içeriğinin lizozom içi asit proteazlar aracılığıyla parçalanmasını teşvik eder. Lizozom içi permeazları ve taşıyıcıları, amino asit yapı taşlarıyla diğer bozunma geri dönüşüm ürünlerini, makromoleküllerin inşası ve metabolizma için yeniden kullanılabilecekleri sitoplazmaya geri ihraç eder (Mizushima, 2007). Bu nedenle otofaji, ATP üretimi yoluyla enerji verimliliğini de destekleyen ve işlevsel olmayan proteinleri ve organeleri uzaklaştırarak hasar kontrolüne aracılık eden hücresel bir ‘geri dönüşüm fabrikası’ olarak düşünülebilir (Glick ve ark., 2010).



Şekil 2.42. Makrootofaji, otofagozomların da novo oluşumu ve otofagozomlar ile lizozomların füzyonu ile karakterize edilir. (Sun ve ark., 2023).

Otofaji, 4 kontrol noktası içeren çok aşamalı bir süreçtir. Bu aşamalar;

- başlatma,
 - fagofor oluşumu veya çekirdeklenme,
 - uzama ve
 - Rastgele veya seçici hedeflerin yakalanması, otofagozomun lizozomla kaynaşması, ardından yutulan moleküllerin lizozomal proteazlar tarafından proteolitik bozunması.
- Her adım gerçekleşen hücresel olaylar otofajinin çok işlevli olmasını sağlayabilir (Mizushima, 2007).



Şekil 2.43. Otofaji süreci dört aşamaya ayrılabilir: (a) Başlama, (b) çekirdeklenme, (c) uzama ve (d) parçalanma. Her adım, otofaji aktivatörleri (yeşil) ve inhibitörleri (kırmızı) tarafından sürecin belirli kritik noktalarında module edilebilir (Kocak ve ark., 2022).

Otofajinin düzenlenme mekanizmaları ve sinyal yolları şu şekilde özetlenebilir:

30'dan fazla otofaji ile ilişkili gen (ATG) ürünü, otofajinin temelini oluşturan otofagozom oluşumunu yönetir. Otofaji ile ilişkili gen fonksiyonunun bozulması, hücresel ve doku homeostazı, hücre metabolizması, bağışıklık ve gelişimdeki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Dikic ve Elazar, 2018). Otofagozomların biyogenezi, amino asit açlığı, hipertermi ve hipoksi gibi çeşitli stres faktörlerinin yanı sıra hormonlar gibi bazı fizyolojik koşullar altında da tetiklenebilir (He ve Klionsky, 2009). Moleküler düzeyde, adenosin monofosfat (AMP) ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonu ve/veya mTOR kinazların (rapamisin'inin memeli hedefinin) inhibisyonu, fagofor olarak bilinen ve olgun çift membranlı otofagozomu oluşturmak için ek lipidler alarak genişleyen ilkel bir membranın üretimiyle sonuçlanan bir dizi olayı serbest bırakır (Ryder ve ark., 2014). Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1 (ULK1)-ULK2 kinaz kompleksinin AMPK ve mTOR sinyalizasyonunun aşağı akışında aktivasyonu ilk adım olarak kabul edilir (Şekil 2.43.A). Unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1 -ULK2 kompleksi, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PtdIns3K) lipid kinaz kompleksini aktive ederek fagofor membranında fosfatidilinositol-3-fosfat (PtdIns3P) üretimi ve birikimine ve WIPI1 (WD tekrar alanı, fosfoinozitol etkileşimli 1)-WIPI2 ve WDR45B/WIPI3-WDR45/WIPI4 gibi fosfolipid bağlayıcı ATG proteinlerinin olaya katılmasına neden olur (Proikas-Cezanne ve ark., 2015; Sridharan ve ark., 2011) (Şekil 2.43.B). İki ubiquitin benzeri konjugasyon sistemi, ATG12-ATG5 ve LC3/ GABA tip aminobütirik asit reseptörü ilişkili protein ailesinin üyeleri (GABARAP)-fosfatidiletanolamin (PE), geleneksel olarak ULK1-ULK2 ve PtdIns3K sinyal komplekslerinin aşağı akışında görülür ve fagofor membranının genişlemesinde rol oynar (Kaufmann ve Wollert, 2014) (Şekil 2.43.C). Ubikuitin benzeri proteinler, ATG5, ATG12 ve LC3/GABARAP protein ailesinin üyeleri, ubiquitin ile karakteristik globüler 3D yapıyı ve protein/lipid substratlarına konjuge olma yeteneğini paylaşmaktadır. Otofaji ilişkili gen 12, E1 (ATG7) ve E2 (ATG10) enzimlerinin etkisiyle ATG5'e eş-translasyonel olarak konjuge edilirken, LC3/GABARAP proteinleri, önce ATG4 sistein proteaz ailesinin üyeleri tarafından proteolitik olarak aktive edilmesi gereken öncü proteinler olarak sentezlenir (Maruyama ve Noda, 2017). Otofaji ilişkili gen 7 (E1 ya da ATG7), E2 (ATG3) ve E3

(ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleksi) enzimlerinin katalitik aktivitesi yoluyla, çözünür LC3 (MAP1LC3 [mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3] protein ailesinin üyeleri) ve GABARAP, fagofor membranında zenginleştirilmiş lipid PE'nin amin grubuna kovalent olarak konjuge edilir (Şekil 2.43.C). Bu süreç, fagofor membranının genişlemesine ve kapanmasına aracılık eder. Daha yakın zamanlarda, LC3/GABARAP proteinlerinin ULK1-ULK2 kompleks aktivasyonunda (Birgisdottir ve ark., 2019; Grunwald ve ark., 2020) ve kargo tanımada (Kirkin ve Rogov, 2019) ek roller oynadığı gösterilmiştir. Sekestozom 1 (SQSTM1/p62), NBR1, OPTN, CALCOCO2/NDP52 (52 kDa'lık nükleer nokta proteini), TAX1BP1 ve diğerleri gibi seçici otofaji için reseptör proteinlerle etkileşime girerek eş zamanlı olarak kargo moleküllerini (örneğin protein agregatları, hasarlı mitokondri veya sitozolik bakteriler) bağlar ve hedeflenen otofagozom oluşumuna ve nihayetinde lizozomal degradasyona aracılık ederler (Kirkin ve Rogov, Mol Cell. 2019) (Şekil 2.43.D).

a) Başlama

Normal fizyolojik koşullar altında, hücresel otofaji aktivitesi çok düşük bir seviyede tutulur ve hasarlı veya gereksiz organelleri parçalayarak hücre bakıma yardımcı olur. Bu nedenle, makrotofaji öncelikle sitoprotektif bir mekanizmadır (Yang ve Klionsky, 2010). Basitliğine rağmen, son çalışmalar otofajinin açlığa adaptasyon, hücre içi protein ve organellerin temizlenmesi, gelişim, yaşlanmayı önleme, mikroorganizmaların ortadan kaldırılması, hücre ölümü, tümör baskılanması ve antijen sunumu gibi beklenenden çok daha çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik rollere sahip olduğunu açıkça göstermiştir (Mizushima, 2005). Buna göre, otofajik işlev bozukluğu akciğer, karaciğer ve kalp hastalıkları, nörodejenerasyon, miyopatiler, kanser, yaşlanma ve diyabet gibi metabolik hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli patolojiler ile ilişkili bulunmuştur (Wirawan ve ark., 2012).

Otofaji, beslenme açlığı ve aşırı besin stresi de dahil olmak üzere beslenme stresleri tarafından indüklenebilir. Açlığa yanıt olarak otofajinin indüklenmesine kısmen mTOR (mekanistik TOR olarak da bilinir) inaktivasyonu (Jewell ve ark., 2013) ve mitojen-aktivasyonlu protein kinaz (MAPK)/Jun N-terminal kinazın (JNK) aktivasyonu (Zhou ve ark., 2015) aracılık ederken, enerji kaybı AMPK'nın (Hardie, 2011) aktivasyonu ile otofajiyi indükler. Bununla birlikte, besin fazlalığı, özellikle de

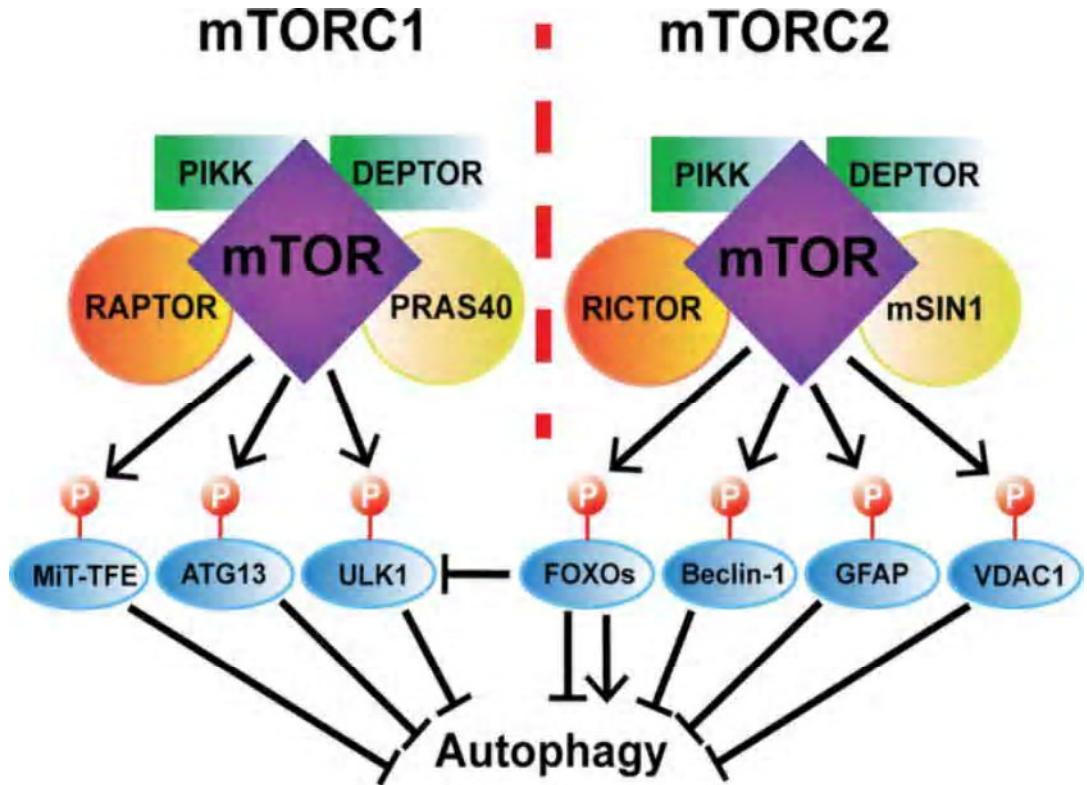
yüksek glikoz konsantrasyonları da otofajiyi indükler. Bu süreç esas olarak reaktif oksijen türleri (ROS) yolu ile aktive edilir (Chen ve ark., 2014). Yüksek konsantrasyondaki amino asitler otofajiyi inhibe ederken, amino asit eksikliği otofajiyi indükler (Mortimore ve Schworer, 1977).

Hücrede amino asitlerin ve büyüme faktörlerinin konsantrasyonuna yanıt hücre büyümesi ve protein sentezi için gerekli olan mTOR aktivitesi tarafından düzenlenir (Guertin ve Sabatini, 2009). Hücre çoğalması, büyümesi ve hayatta kalmasının kısaca metabolizmanın merkezi bir kontrolörü olan mTOR, amino asit sentez yolunu hızlandırarak hücre büyümesine aracılık eder (Deleyto-Seldas ve Efeyan, 2021). Hücrede mTOR, besinin yeterli olduğu durumlarda aktifleşir ve otofaji mekanizması üzerinde inhibe edici bir etki gösterir, besin yokluğu durumlarında ise mTOR aktivitesi baskı altına alınır ve otofaji aktifleşmiş olur.

Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi her yerde ifade edilen fosfatidilinositol 3-kinaz ilişkili kinazlar (PIKK) ailesinde yer alan bir serin (Ser)/treonin (Thr) protein kinazdır (Guertin ve Sabatini, 2009). Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi, birden fazla yardımcı protein ile bağlanarak mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTORC2 olmak üzere iki farklı sinyal kompleksi oluşturur. Hem mTORC1 hem de mTORC2 mTOR ile birlikte, mLST8 (mammalian lethal with sec13 protein 8 veya TORC alt birimi LST8) ve DEPTOR (DEP-alanı içeren mTOR ile etkileşen protein) içerir. DEP-alanı içeren mTOR ile etkileşen proteininin mTOR ve diğer kinazlar tarafından fosforilasyonu, mTORC'lerin bozunmasını ve aktivasyonunu teşvik eder. Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1'in bir parçası olarak mTOR, protein, lipid, kolesterol ve nükleotid sentezi dahil olmak üzere hücredeki çoğu anabolik süreci yönlendirirken, aynı zamanda hücre dışı besin alımını artırır ve otofajik katabolizmayı engeller (Saxton ve Sabatini 2017; Valvezan ve Manning, 2019). Rapamisin'in hedef alt birimi LST8, mTOR'nin kinaz aktivasyon döngüsünü stabilize ediyor gibi görünmektedir ancak aktivitesi için gerekli değildir. Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi 1 ayrıca RAPTOR (rapamisin'in memeli hedefinin düzenleyici ilişkili proteini, RPTOR) ve PRAS40'ı (40 kDa'lık prolin bakımından zengin AKT substratı) içerir. rapamisin'in memeli hedefinin düzenleyici ilişkili proteini ve mTOR arasındaki etkileşim mTORC1'in stabilitesi ve substratların alımı için gerekli olduğundan, RAPTOR'deki post-translasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon, bölünme veya

ubikitinasyon) mTORC1 aktivitesini düzenler. 40 kDa'lık prolin bakımından zengin AKT substratı, mTORC1'in substrat alım bölgelerini inhibe eder ve AKT (protein kinaz B) ve mTOR tarafından fosforilasyonu kompleksten ayrılmasını teşvik eder. Kısaca mTORC1, mTOR/RAPTOR/mLST8/PRAS40/FKBP38/Deptor'dan oluşur ve rapamisin ile türevlerine (rapaloglar) duyarlıdır.

Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 2, Rictor (mTOR'nin rapamisine duyarsız tipi), mSIN1 (memelide stresle aktive olan MAP kinazla etkileşen protein 1) ve rictor 1 ve 2 (PROTOR 1 ve 2)'yi içerir. Özetle mTORC2, mTOR/RAPTOR/mLST8/SIN1/Protor/Deptor'dan oluşur ve genellikle rapamisin/rapamisin türevlerine (rapaloglara) karşı ve besinlere duyarsız olarak tanımlanır (Saxton ve Sabatini, 2017) (Şekil 2.44).



Şekil 2.44. mTORC1 ve mTORC2 kompleksi ve bunların otofajiyi düzenlemesi. PIKK ve DEPTOR her iki mTOR kompleksinde de ortak olan bileşenlerdir; RAPTOR ve PRAS40 mTORC1'e, RICTOR ve mSIN1 ise mTORC2'ye özgüdür. mTORC1'in, otofajiyi pozitif olarak düzenleyemez hale gelen MiT-TFE faktörleri Otofaji ile ilişkili protein 13 (ATG13) ve Unc-51 benzeri kinaz 1'in (ULK1) fosforilasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Buna karşılık, mTORC2 Beclin-1, glial fibriller asidik protein (GFAP) ve Voltaja bağlı anyon seçici kanal 1'in (VDAC1) fosforilasyonunu indükler ve benzer şekilde otofajiyi aktive etmelerini önler. mTORC2 aracılı FOXO (Forkhead box O) proteinlerinin fosforilasyonu, otofaji düzenlemesi ile ilgili çeşitli sonuçlara yol açan subselüler lokalizasyonlarını modüle eder (Ballesteros-Álvarez ve Andersen, 2021).

Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1 sinyali çeşitli çevresel faktörler (oksijen seviyeleri, büyüme faktörleri, hormonlar, besinler ve stres faktörleri) ve hücre metabolik durumundan gelen bilgileri entegre eder. Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1, hücrede enerjinin en çok kullanıldığı süreçler için bir ana anahtardır, besin yeterliliği durumlarında hücre büyümesini ve hücrel biyokütlenin oluşturulmasını anabolik süreçleri kontrol ederek sağlar ve tersine, besin sınırlaması üzerine hücrel bileşenlerin otofajik geri dönüşümüne izin verir (Deleyto-Seldas ve Efeyan, 2021). Son çalışmalar mTORC2'nin, AKT, protein kinaz C (PKC), serum ve glikokortikoid ile indüklenen protein kinaz 1 (SGK-1) ve Forkhead box O (FOXO) transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere memelilerde otofajiyi modüle ettiği gösterilen çeşitli aşağı akım efektörlerine sinyal gönderme yeteneği aracılığıyla makrotofaji ve şaperon aracılı otofajinin negatif bir düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (Ballesteros-Álvarez ve Andersen, 2021).

Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1'in hormonlar, büyüme faktörleri, amino asitler ve yağ asitleri gibi çoklu girdi sinyalleri tarafından düzenlendiği bilinmektedir. Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1 aktivasyonunun ana etkilerinden biri, p70S6K [Ribozomal protein S6 kinaz beta-1 (S6K1), p70S6 kinaz olarak da bilinir] ve 4E-BP1 (ökaryotik başlatma faktörü 4E-bağlayıcı protein 1) dahil olmak üzere protein sentezinin bileşenlerini fosforile ederek besinlere/büyüme faktörlerine yanıt olarak translasyonu düzenlemesidir. Ribozomal protein S6 kinaz beta-1, 40S ribozomal protein S6'yı fosforile ederek mRNA'ların (Mesajcı Ribo Nükleik Asit) aktif translasyonuna yol açarken, mTORC1 tarafından çeşitli amino asidik kalıntılar (Thr37; Thr46; Ser65; Thr70) üzerinde 4E-BP1 fosforilasyonu ökaryotik başlatma faktörü 4E'nin (eIF4E) salınmasına neden olur (Dunlop ve Tee, 2009). Böylece mTORC1 mRNA'nın translasyonunu kolaylaştırır ve aşağı akış anabolik süreçlerini pozitif olarak kontrol eder. Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1'in protein sentezinin yanı sıra lipid sentezini, mitokondriyal metabolizmayı ve biyogenezi de kontrol edebileceği gösterilmiştir (Laplane ve Sabatini, 2009). Ayrıca mTORC1, organel yıkımı ve protein döngüsünde önemli katabolik bir süreç olan otofajiyi negatif olarak düzenler (Jung ve ark., 2010).

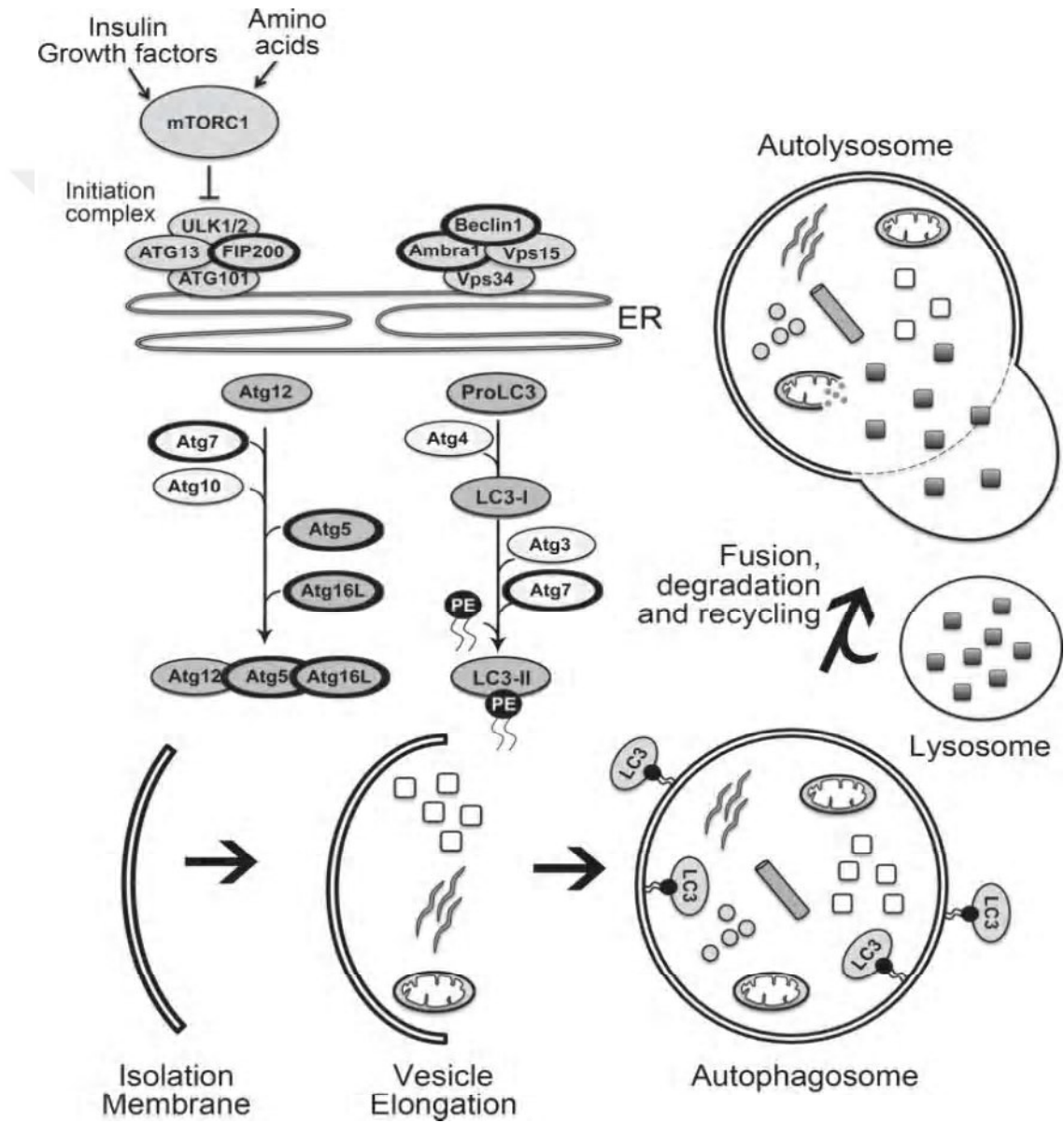
Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1 aktivitesinin baskılanmasının memelilerde besin yoksunluğu koşullarına dayanmak için gerekli olduğu

kanıtlanmıştır. Doğumdan hemen sonra, plasental besin kaynağının kesilmesi nedeniyle dolaşımdaki glikoz ve amino asit seviyeleri önemli ölçüde düşer ve fare dokularındaki mTORC1 doğumdan sonraki 1 saat içinde kolayca inhibe edilir. Bu hızlı ve güçlü inhibisyon, otofajiyi serbest bırakmak için kritiktir, bu da glisemiye sürdürmek için glukoneogenezi besleyen serbest amino asit seviyelerini artırır ve anne sütü oluşmadan önce yaşamın ilk saatlerinde açlığa dayanmanın anahtarını oluşturur (Efeyan ve ark., 2013). Rapamisin'in memeli/mekanistik hedefi kompleksi 1 hem amino asitler hem de büyüme faktörleri tarafından aktive edilebilir (Zheng ve ark., 2014). Rapamisin'in memeli/mekanistik hedefi kompleksi 1 farklı hücresel işlevleri modüle etmek için farklı aşağı akış sinyal olaylarını kullanır. Örneğin protein sentezi ve lipid sentezi gibi anabolik metabolizmayı teşvik etmek ve lizozom biyogenezi ve otofaji gibi katabolik yolları inhibe etmek için besin ve büyüme faktörü sinyalini entegre eder (Şekil 2.45.).

Otofajinin başlaması mTORC1 aktivitesinin aşağı regülasyonu ile ilişkilidir. Aktive edilmiş mTORC1, ATG13'ün hiperfosforilasyonuna neden olarak, ATG1/ULK1 ile etkileşimini azaltarak ve Vps34-Beclin1 kompleksi gibi otofaji efektörlerinin fosforilasyonunu kontrol ederek otofajiyi inhibe eder (Behrends ve ark., 2010) (Şekil 2.45.).

Büyüme faktörleri reseptör tirozin kinazları (RTK), fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (AKT) ve Ras/Erk (Hücre dışındaki sinyallerle düzenlenen kinaz) aşağı akış sinyal yollarını aktive ederek mTORC1'in önemli bir negatif düzenleyicisi olan tuberous skleroz tümör baskılayıcı kompleksini (TSC) etkisiz hale getirir (yani inhibe eder). Huang ve ark. (2008), memeli hücrelerinde yaptıkları çalışma ile, TSC'yi mTORC1'in önemli yukarı akış inhibitörleri olarak tanımlamıştır. Tuberöz skleroz kompleksi, TSC1 (hamartin), TSC2 (tuberin) ve TSC2/BUB2/cdc 1 domain ailesi üyesi TBC1D7'den oluşan heterotrimerik bir komplekstir. Tuberin, karboksil terminalinde, in vitro olarak mTORC1 ile birleşen ve mTORC1'i aktive eden beyinde zenginleştirilmiş Ras homoloğu olarak da bilinen Rheb (Beyinde zenginleştirilmiş Ras homoloğu) GTPaz'ı inaktive eden bir GTPaz aktive edici protein (GAP) alanı içerir ve bu nedenle TSC2, Rheb'i (Rheb-GDP) inaktive etmek için bir GAP olarak görev yapar. Beyinde zenginleştirilmiş Ras homoloğu, insanlarda ve diğer memelilerde her yerde ifade edilen bir GTP bağlayıcı proteindir. Bu protein büyüme

faktörleri ve amino asitler tarafından mTORC1'in zorunlu bir yukarı akış aktivatörüdür (Inoki ve Guan, 2009). Hamartin ve Tüberin'in fosforilasyonu, mTORC1'i düzenleyen çok çeşitli çevresel sinyaller için bir entegrasyon noktası oluşturur. Protein kinaz B (AKT), ribozomal S6 kinaz (Rsk) ve hücre dışındaki sinyallerle düzenlenen kinaz (Erk) olmak üzere MAPK, TSC2'yi doğrudan fosforile ederek onun inaktivasyonuna yol açar. Bunun yanısıra AKT ayrıca inhibitör protein PRAS40'ı doğrudan fosforile ederek mTORC1 aktivasyonuna neden olur.



Şekil 2.45. Memeli hücrelerinde makrotofaji süreci. Otofajide yer alan temel aşamalar ve otofaji yolunun kritik üyeleri gösterilmiştir (Dhaliwal ve ark., 2017).

Bu büyüme yanlısı uyarıcıların aksine, glikoz yoksunluğu ve düşük enerji seviyeleri gibi hücrel stres faktörleri ATP düzeyinin azalmasına ve AMP konsantrasyonunun

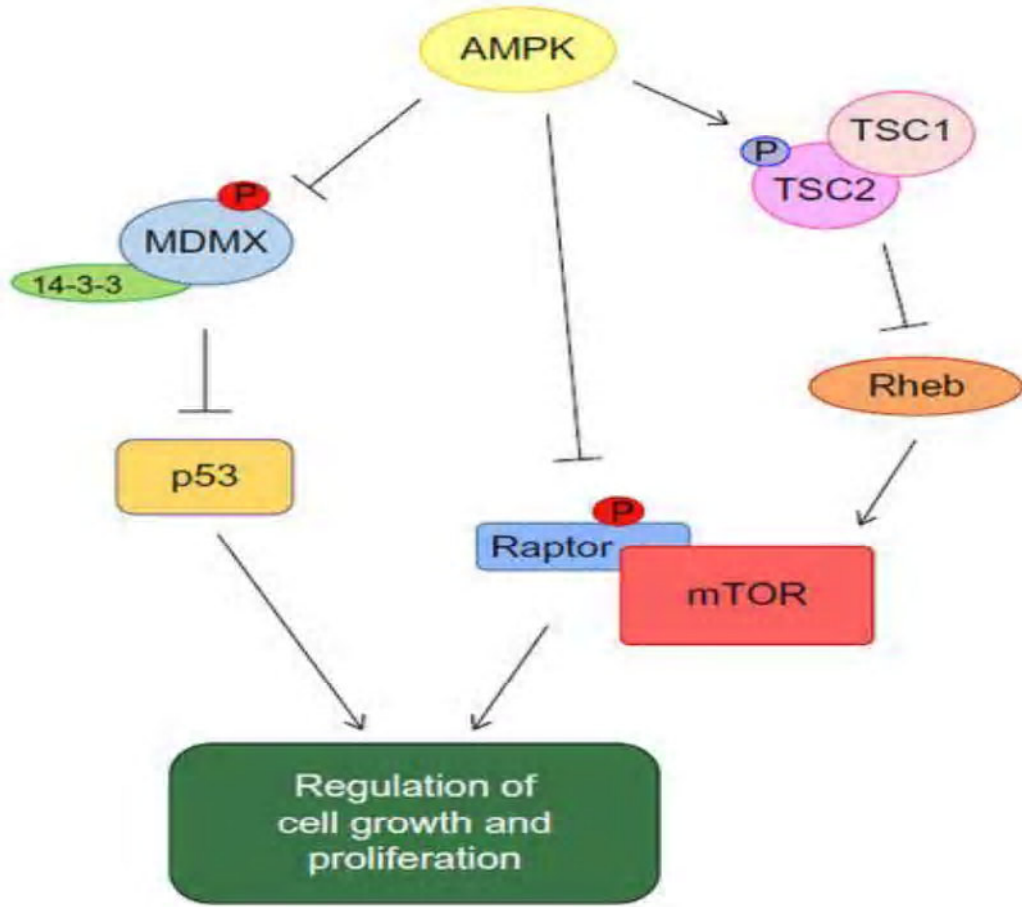
artmasına neden olur, yani AMP/ATP oranında bir yükseliş gerçekleşir. Adenin mono fosfat (AMP)/ATP veya Adenin difosfat (ADP)/ATP oranı yükseldiğinde hücrel enerji dedektörü olan AMPK upstream kinazlar aracılığıyla fosforillenerek aktifleşir (Hardie ve Hawley, 2001; Hardie, 2011; Stein ve ark., 2000). Aktifleşen AMPK, mTOR bağımlı protein translasyonu gibi yoğun enerji gerektiren süreçleri kapatarak hücrel ATP üretimini arttırarak ve ATP tüketimini azaltarak enerji tasarrufu sağlayan bir program koordine eder (Towler ve Hardie, 2007) ve hem TSC2'yi hem de RAPTOR'yi doğrudan fosforile ederek mTORC1 aktivitesini inhibe eder (Dalle ve ark., 2016; He ve ark., 2018) ve böylece otofajiyi indükler (Gwinn ve ark., 2008).

Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz besin açlığı, kuvvetli egzersiz veya ısı şoku koşulları altında aktif hale gelen bir metabolik stres sensörü/efektörüdür (Corton ve ark., 1994; Moore ve ark., 1991). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz, büyümenin düzenlenmesinde ve metabolizmanın yeniden programlanmasında kritik rollere sahiptir. Besin öğeleri ile hücre içi enerji seviyelerindeki farklılıklara tepki olarak glikoz ve lipid metabolizmasını idare eden merkezi bir metabolik kilit olup hücre büyümesi ve otofajiyi kontrol eder (Mihaylova ve ark., 2011; Mihalova ve Shaw, 2012).

Bütün ökaryotlarda var olan AMPK bir adet katalitik (α) alt birim ve iki adet katalitik olmayan (β ve γ) alt birimden oluşan heterotrimerik serin/treonin protein kinaz kompleksidir (Kahn ve ark., 2005). Metabolik stres koşulları altında aktive olurlar (Turnley ve ark., 1999). Alfa alt birimi katalitik bir alt birim iken, β ve γ AMPK aktivitesine yanıt veren düzenleyici birimlerdir. Adenin mono fosfat, ADP veya ATP, AMPK'nın γ alt birimini doğrudan bağlayabilir (Hardie ve ark., 2016). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz başlangıçta karaciğerden izole edilmiş olmasına rağmen, üç alt birim çok çeşitli dokular tarafından ifade edilir (Gao ve ark., 1995, Gao ve ark., 1996; Mitchelhill ve ark., 1994; Stapleton ve ark., 1996). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz alt birim izoform tipleri akciğer, böbrek, kalp, iskelet kasında (Gao ve ark., 1995, Gao ve ark., 1996; Mitchelhill ve ark., 1994; Stapleton ve ark., 1996) yoğun bir şekilde ifade edilirken, beyinde daha yoğun olmak üzere $\alpha 2$, $\gamma 1$, $\beta 1$ ve az oranda $\alpha 1$ ve $\beta 2$ bulunduran daha sınırlı bir tip gösterir (Turnley ve ark., 1999). Bu izoformlardan bazıları dokuya özgü bir ekspresyon modeli sergiler. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz- $\alpha 1$ farklı ve kendine özgü koşullar

altında çekirdeğe yer değiştirebilse de AMPK α 2 izoformu özellikle çekirdekte bol miktarda bulunur (Lamia ve ark., 2009; Salt ve ark., 2018). Ayrıca, β izoformlarının miristoilasyonu AMPK aktivasyonu ve membranlara lokalizasyonu için önemli bir ön koşuldur (Oakhill ve ark., 2010). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın aktif olması için katalitik α -alt biriminin aktivasyon halkasında korunmuş bir treonin kalıntısının (T172, insanda α 1) (Hawley ve ark., 1996; Stein ve ark., 2000) upstream kinazlar aracılığıyla fosforilasyonu birinci şarttır. Hücresel enerji düzeyleri bittiğinde ve AMP/ATP oran değeri arttığında, AMP'nin AMPK γ alt-ünitesine allosterik olarak bağlanması ile AMPK aktive olur ve bu komplekste bir konformasyonel farklılık meydana getirerek AMPK α -alt biriminin upstream kinazlar için bir substrat olma şansını artırmış olur. Bugüne kadar AMPK aktivatörleri olarak birçok AMPK fosforile edici kinaz tanımlanmıştır. Bunlar arasında her yerde eksprese edilmiş ve yapısal olarak aktif kinaz olan liver kinaz B1(LKB1) (Woods ve ark., 2003), Ca^{2+} ile aktive Ca^{2+} /kalmodulin-bağımlı kinaz kinaz β (CaMKK β) (Woods ve ark., 2005) ve transforme edici büyüme faktörü β -aktive kinaz-1 (TAK1) (Momcilovic ve ark., 2006) sayılabilir.

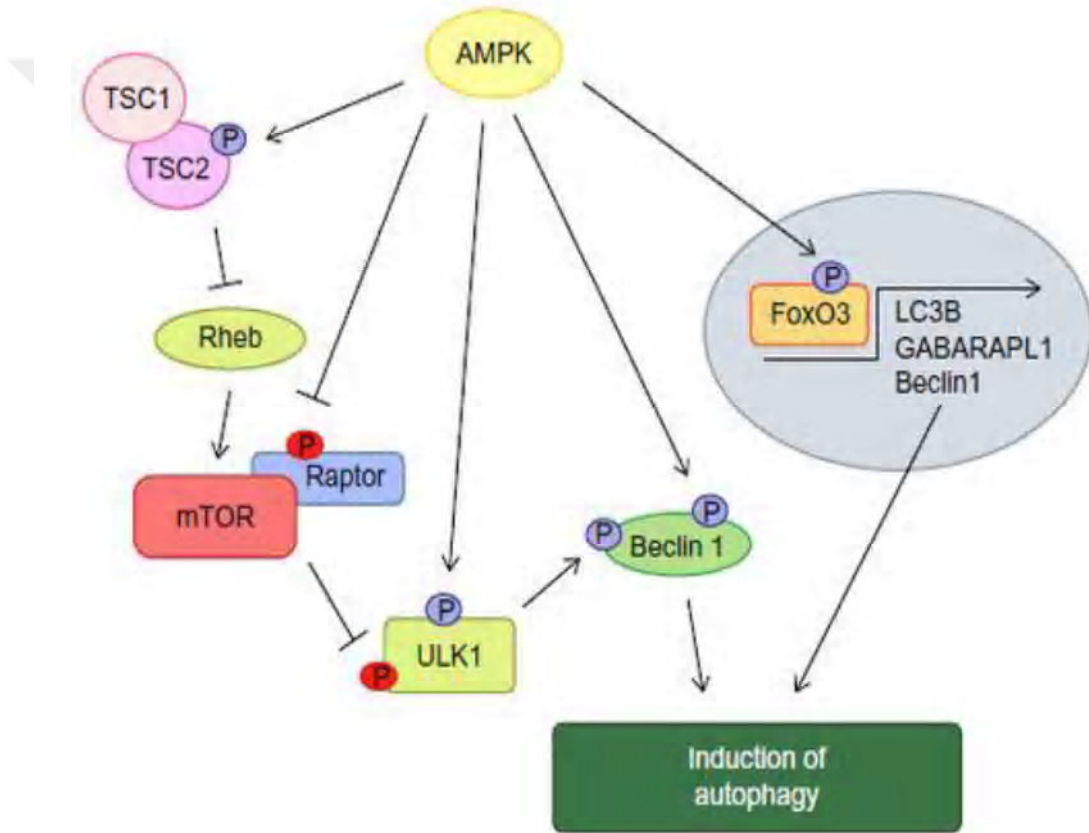
AMPK otofaji ve hücre proliferasyonunu düzenler. Ökaryotik hücreler, hücre büyümesini ve çoğalmasını engelleyerek düşük besin koşullarına adaptif olarak yanıt verir. Bu olaylara AMPK, p53'ün aktivasyonu, mTORC1'in inhibisyonu ve otofajinin indüksiyonu yoluyla aracılık eder. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz tarafından indüklenen hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonu, AMPK tarafından indüklenen hücre döngüsü ilerlemesinin engellenmesi, Ser342 üzerindeki MDMX'in (tümör baskılayıcı p53'ün negatif düzenleyicisi) fosforilasyonu yoluyla gerçekleşir. Fosforilasyonu takiben MDMX'in inaktivasyonu bir hücre döngüsü kontrol noktasını tetikleyen p53'ün stabilitesine ve aktivasyonuna neden olur (He ve ark., 2014). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz, p53 üzerindeki etkilerinin ötesinde, tümör baskılayıcı tüberoskleroz kompleksi 2'yi (TSC2) doğrudan fosforile ederek Rheb'e karşı GAP aktivitesini uyarır ve bu da mTORC1'in inaktivasyonuna ve hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yol açar (Inoki ve ark., 2003; Moussa ve Li, 2020). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz ayrıca RAPTOR'nin doğrudan fosforilasyonu yoluyla mTORC1'in pozitif trofik etkilerini de bloke eder (Gwinn ve ark., 2008) (Şekil 2.46.).



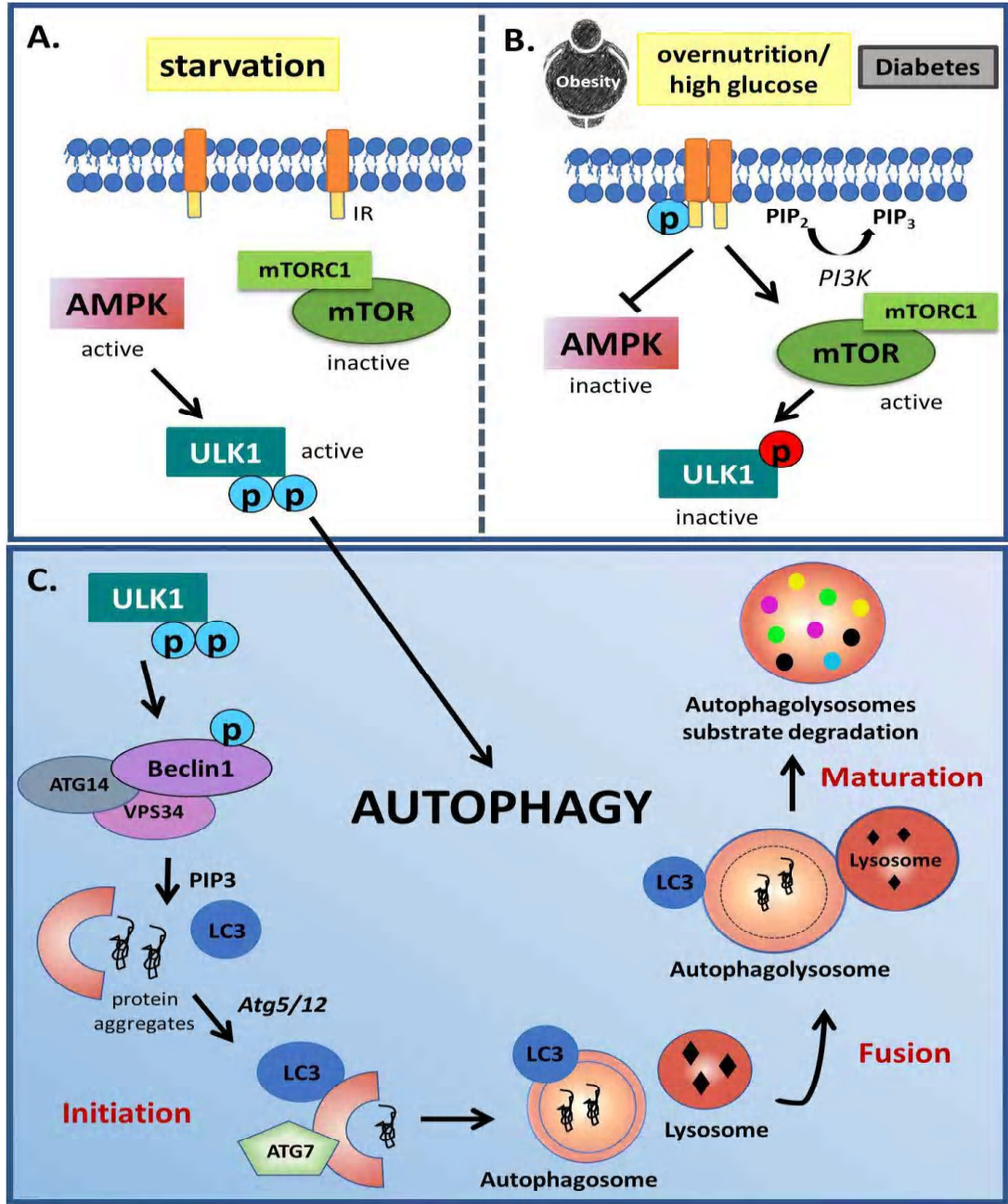
Şekil 2.46. AMPK hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre büyümesini modüle eder. Hücre büyümesinin engellenmesi esas olarak mTORC1'i içeren en iyi bilinen anabolik yollardan birinin düzenlenmesiyle sağlanır. AMPK, TSC1/2 kompleksini aktive ederek mTOR'nin kendisi ve ilişkili protein RAPTOR'den oluşan mTORC1'in aşağı regülasyonuna yol açar. AMPK ayrıca RAPTOR'un doğrudan fosforilasyonu yoluyla mTORC1'i inaktive edebilir. Buna ek olarak, AMPK MDMX'in aktivitesini bloke ederek p53'ün stabilizasyonuna ve ardından hücre döngüsünün durmasına yol açar. İnhibitör fosforilasyonlar kırmızı, aktive edici fosforilasyonlar ise mavi ile gösterilmiştir (Rosso ve ark., 2016).

Rapamisin'in memeli/mekanistik hedefi kompleksi 1 tarafından işletilen inhibitör düzenlemenin aksine, çeşitli deneysel kanıtlar AMPK'nın ULK1'in birkaç serin kalıntısında (örneğin, Ser317, Ser555 ve Ser777) doğrudan fosforilasyonu yoluyla otofajiyi teşvik ettiğini göstermiştir (Bach ve ark., 2011; Kim ve ark., 2011). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaza bağlı ULK1 kompleksinin uyarılması, besin açlığı, hipoksi ve ilaç uygulaması gibi farklı koşullar altında meydana geldiğinden, otofajinin indüksiyonu için evrensel bir olay olarak görünmektedir. Bu aktivasyon yolu sadece seçici olmayan otofajinin değil aynı zamanda seçici otofajinin de teşvik edilmesiyle sonuçlanır: örneğin, AMPK stres koşulları sırasında ULK1'in fosforilasyonu yoluyla mitofajiyi tetikler ve bu yol fizyopatolojik durumlarda hasarlı

mitokondrinin temizlenmesi için de gereklidir (Di Nardo ve ark., 2014; Egan ve ark., 2011; Kume ve ark., 2012; Lee ve ark., 2010; Mihaylova ve Shaw, 2011). Ayrıca, son veriler AMPK'nın Beclin1'i Ser91/94'te fosforile ettiğini ve bu olayın besin stresi yanıtında otofajinin indüksiyonu için gerekli olduğunu göstermiştir (Kim ve ark., 2013). Sanchez ve ark. (2012), tarafından yayınlanan ilginç bir çalışma, AMPK'nın en azından iskelet kasında LC3B (Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 ek varyantı), GABARAPL1 ve Beclin1 gibi otofaji ile ilişkili proteinlerin FOXO3'e bağlı artışı da belirlediğini ileri sürmüşlerdir. Bu veriler AMPK'nın otofajiyi birden fazla düzeyde yönlendirdiğini göstermektedir (Şekil 2.47.; Şekil 2.48.).



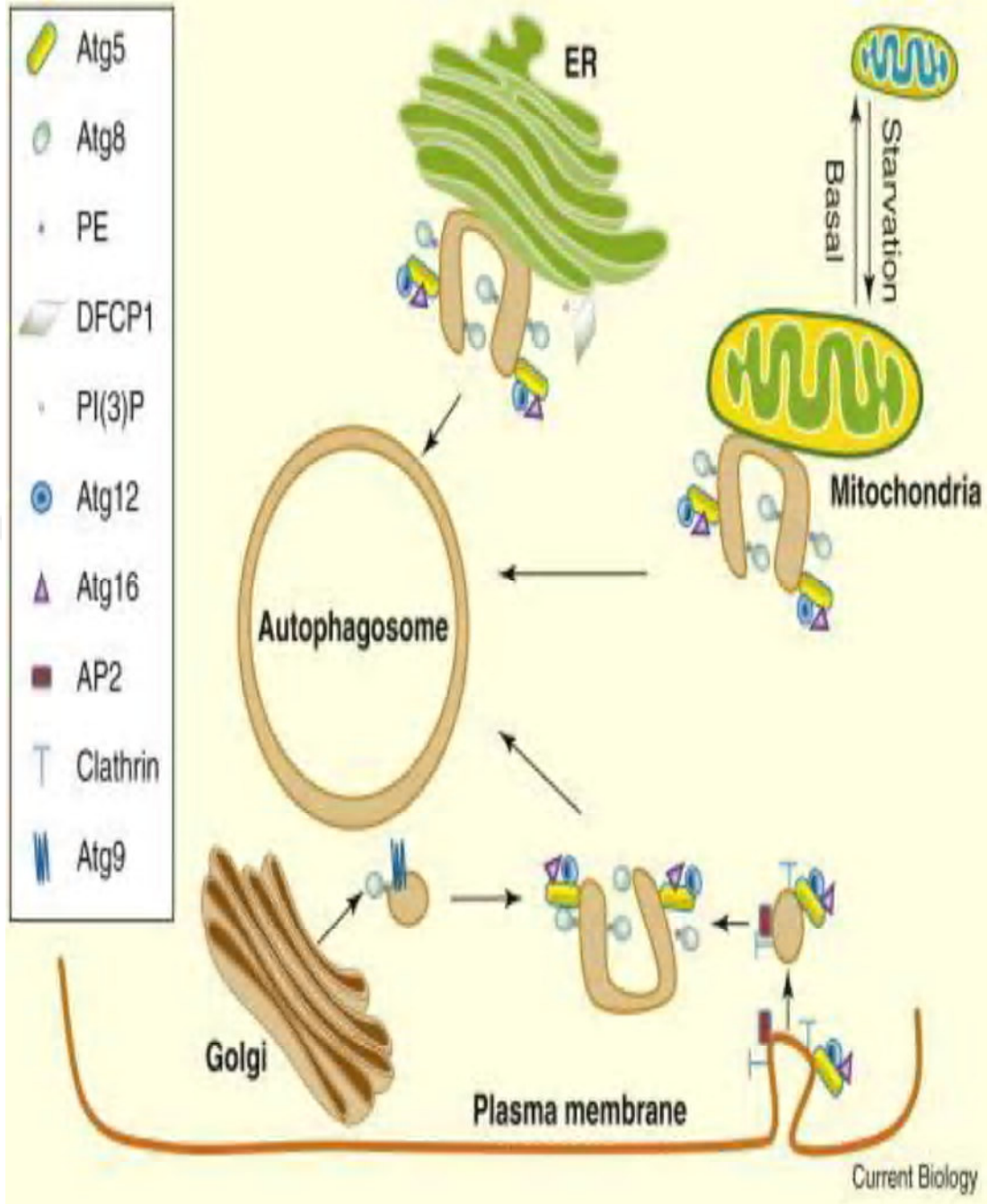
Şekil 2.47. AMPK kısa ve uzun süreçli mekanizmalarla otofajiyi yönetir. AMPK, ULK1 ve Beclin1 gibi otofajinin başlama ve çekirdeklenme aşamalarında yer alan proteinleri doğrudan fosforiller ve aktive eder. AMPK'nın otofaji üzerindeki izin verici etkisine mTOR yolunun inhibisyonu da aracılık eder. Ayrıca AMPK, FOXO3'ü fosforile ederek otofaji ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun artmasına neden olur. İnhibitör fosforilasyonlar kırmızı, aktive edici fosforilasyonlar ise mavi ile gösterilmiştir (Rosso ve ark., 2016).



Şekil 2.48. Açlık ve insülin sinyali ile otofaji modülasyonu. (A) Otofaji klasik olarak açlık koşullarında ULK1 aktivitesi yoluyla aktive edilir. Düşük besin koşullarında AMPK sinyali aktive olur ve ULK1'i iki farklı aktivasyon bölgesinde fosforile eder. Açlığın tersine, (B) aşırı beslenme koşullarında veya diyabette, PI3K'ın tip I büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilmesi mTOR aktivasyonu ve AMPK inaktivasyonu ile sonuçlanır. mTOR kompleksi TORC1, memeli otofajisinin başlatıcısı olan ULK1'i (kırmızı daireler) fosforiller ve inaktive eder. (C) Bu süreç sırasında, protein agregatları veya hasarlı organeller otofagozom adı verilen çift membranlı yapılar tarafından yutulur ve bunlar lizozomlar veya vakuollerle birleşerek kargo materyallerinin otofagolizozomlarda parçalanmasını sağlar. Bu karmaşık süreç ULK1'in 2 farklı aktivasyon kalıntısında (mavi dairelerle gösterilen) fosforilasyonu ile başlar. Aktif ULK1 Beclin 1'i fosforile eder, bu da diğer bileşenlerle birlikte izolasyon membranının ilk membran bileşeni olan fagoforun oluşumunu indükler, daha sonra ATG5-ATG12 etkisine bağlı iki konjugasyon yolu ile LC3 lipidasyonuna bağlı olarak genişler, kıvrılır ve kapanır, tamamlanmış bir otofagozoma dönüşür (de Mello ve ark., 2019).

b) Fagofor oluşumu veya çekirdeklenme

Özellikle besin yoksunluğu ile uyarılan otofajik yanıt, sonunda sitoplazmik materyalin (protein agregatları, patojenler veya hasarlı organeller gibi) yeni oluşan bir otofagozom tarafından tutulmasına ve parçalanma için lizozoma teslim edilmesine yol açacak birkaç temel adım gerektirir. Bu dinamik olaylar dizisi ilk olarak otofagozomun oluşumunu ve olgunlaşmasını, sitoplazma içinde taşınmasını ve lizozomla füzyonunu sağlamak için özel proteinlerin, lipidlerin ve membranların spesifik olarak harekete geçirilmesine izin verecek karmaşık bir sinyalizasyon gerektirir. Otofagozom biyogenezi, otofajik kargoları yakalayan ve olgun bir otofagozom oluşturmak için kapanan otofagozomal fincan (kase) şeklindeki bir membranın yani “fagofor” (“izolasyon membranları” olarak da adlandırılır) membranının montajı ile başlar (Şekil 2.49.). Fagofor, besin yoksunluğu da dahil olmak üzere çeşitli streslere yanıt olarak otofagozomdan önce oluşan ilk otofaji ile ilişkili organeldir. Fagofor büyük olasılıkla lipid kazanımı yoluyla büyür ve lipidli LC3'ün sabitlenmesiyle "geleceğin otofagozomu" olarak işaretlenir. Membranla ilgili bu olayların çoğu, ATG proteinleri ve çoğunlukla hücre içi sinyalizasyon ve membran transportunda görev alan ATG-olmayan (non-ATG) proteinler tarafından düzenlenir (Walker ve Ktistakis, 2019). Fagofor oluşumu, kapanması ve olgunlaşmasında rol oynayan düzenleyici proteinlerin çoğu tanımlanmış olmasına rağmen, biyogenezine doğrudan katılan membran(lar)ın kökeni(leri) hala tam olarak bilinmemektedir. Fagoforlar, otofagozomlara dönüşmek için lipid ve proteinlere ihtiyaç duyar. Bu nedenle bu geçici yapının Golgi ve endozomal veziküller, mitokondri ve ER gibi organellerden kaynaklandığı öne sürülmektedir. Endoplazmik retikulum, fagofor oluşumu ve uzaması için gerekli olan omegazomların oluşum yeridir. Mitokondri açlık üzerine büyür ve fagofora lipid vezikülleri sağlar ve Golgi, Atg9 içeren veziküllerin fagofora taşınması için gereklidir. Plazma membranı hem bazal hem de açlık koşullarında fagoforlara ve otofagozomlara membran katkısında bulunur (Axe ve ark., 2008; Morel, 2020; Tooze, 2013).

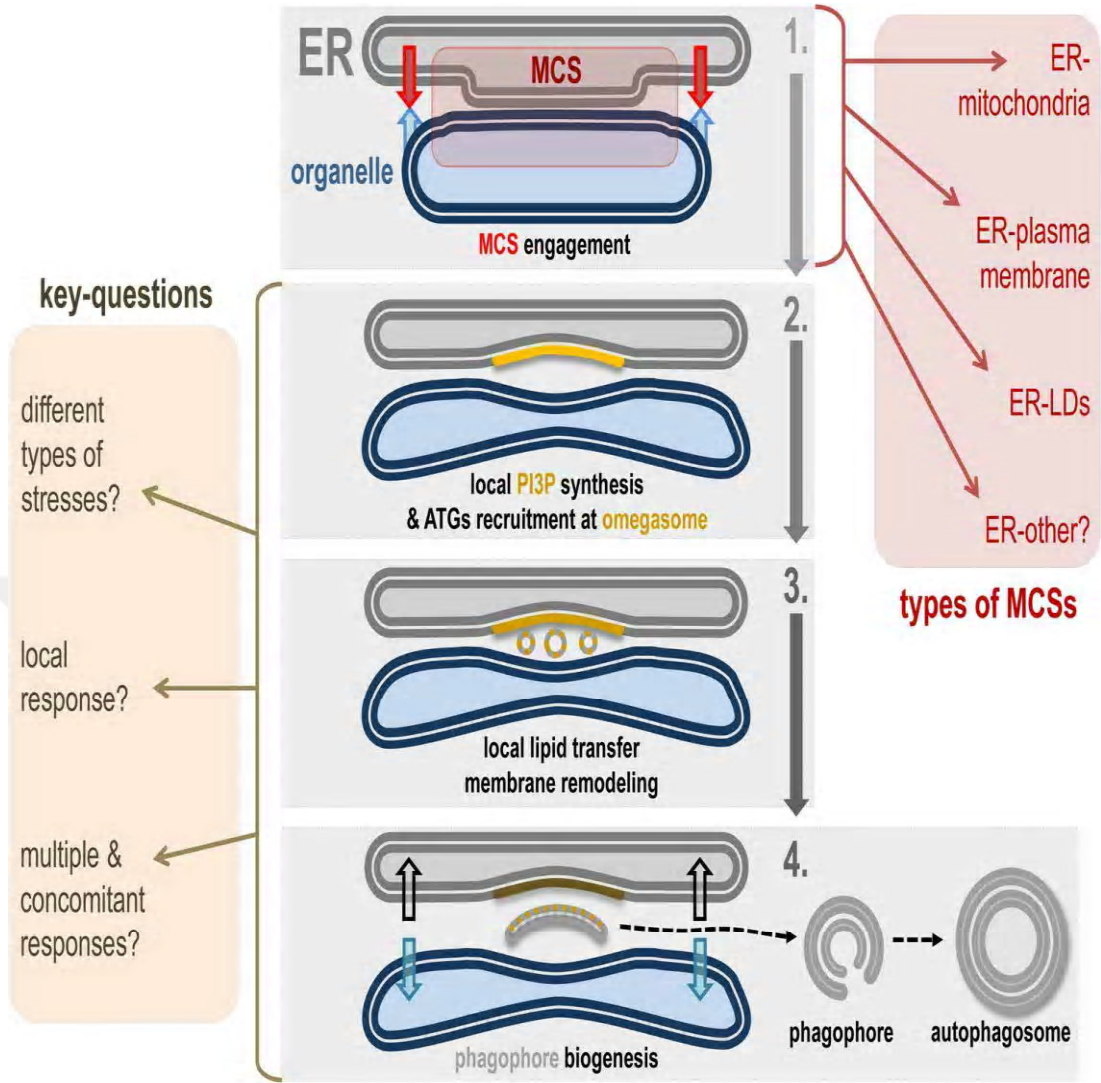


Şekil 2.49. Fagoforlar için membran kaynakları (Rubinsztein ve ark., 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla ER alt alanları olan omegazomlar ile ER aracılı temas bölgelerinin (MSC), özellikle de ER-mitokondri, ER-lipid damlacıkları ve ER-plazma membranı MCS'nin fagofor oluşum sürecini başlatmak için gerekli olduğu ortaya konmuştur (Molino ve ark., 2017; Prinz ve ark., 2020). Endoplazmik retikulum üzerinde konumlanmış olan omegazomlar, fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P veya PtdIns3P olarak kısaltılır) ve PI3P bağlayıcı proteinlerle zenginleştirilmiş çift katmanlı membranlardan oluşan ve otofaji süreciyle ilişkili bir hücre organeli (Axe ve ark.,

2008; Biazik ve ark., 2015) olup Yunanca büyük harf Omega'yı (Ω) andıran bir morfolojiye sahiptir. Omegazomlar, fagoforların oluştuğu bölgelerdir (Axe ve ark., 2008; Biazik ve ark., 2015). Bunlar otofagozomlara dönüşen fincan veya kase benzeri yapılardır ve otofagozomların içeriğini bozmak için lizozomlarla kaynaşırlar (Kern ve ark., 2015). Omegazom oluşumu çeşitli faktörlere bağlıdır, ancak genel olarak omegazom oluşumu açlığa bir yanıt olarak artar (Axe ve ark., 2008) ve bazı biyokimyasal durumlarda PI3P varlığı omegazom oluşumuna yol açar (Karanasios ve ark., 2013). Bu bağlamda, bir ER membran geçici alt alanı olan omegazomun, fagofor biyogenezini teşvik etmek için bir montaj platformu olarak hizmet ettiğini öne süren bir fikir birliği vardır (Ktistakis, 2020).

Membran temas bölgeleri (MSC) ise, endomembranlar arasındaki birleşme bölgeleridir. Organellerin yeniden şekillenmesi ve membran dinamiklerinin yanı sıra metabolit ve lipid alışverişi ile bir kompartmandan diğerine transfer için moleküler merkezler olarak kabul edilirler (Cohen ve ark., 2018; Prinz ve ark., 2020; Scorrano ve ark., 2019). Endoplazmik retikulum, tüm sitoplazmaya yayıldığı ve hücresel alan içindeki diğer tüm membrana bağlı yapılarla sıkı temas halinde olduğu için MCS'nin oluşumunda ve dinamiklerinde merkezi bir oyuncudur. Endoplazmik retikulum, mitokondriyal bölünme/füzyon döngülerini doğrudan etkileyen mitokondri (Friedman ve ark., 2011), plazma membranı, peroksizomlar, endozomlar, lizozomlar, lipid damlacıkları ve Golgi ile membran temas bölgeleri (MCS) oluşturur (Atakpa ve ark., 2018; Costello ve ark., 2017; De Matteis ve ark., 2015; Friedman ve ark., 2011; Raiborg ve ark., 2015). İlginç bir şekilde, ER aynı zamanda çeşitli endomembran türleri ile MCS'ye de katılır ve farklı organeller arasında membranla ilgili süreçlerin yerel olarak düzenlenmesine ve özellikle ER-mitokondri MCS'sinde karmaşık sinyal iletim düzenlemesine izin verir. Membran temas bölgelerinin moleküler, fiziksel ve biyolojik özellikleri hakkında eksiksiz ve güncellenmiş bilgiler, son zamanlarda yapılan birkaç ayrıntılı incelemede mevcuttur (Cohen ve ark., 2018; Prinz ve ark., 2020; Scorrano ve ark., 2019) (Şekil 2.50.).

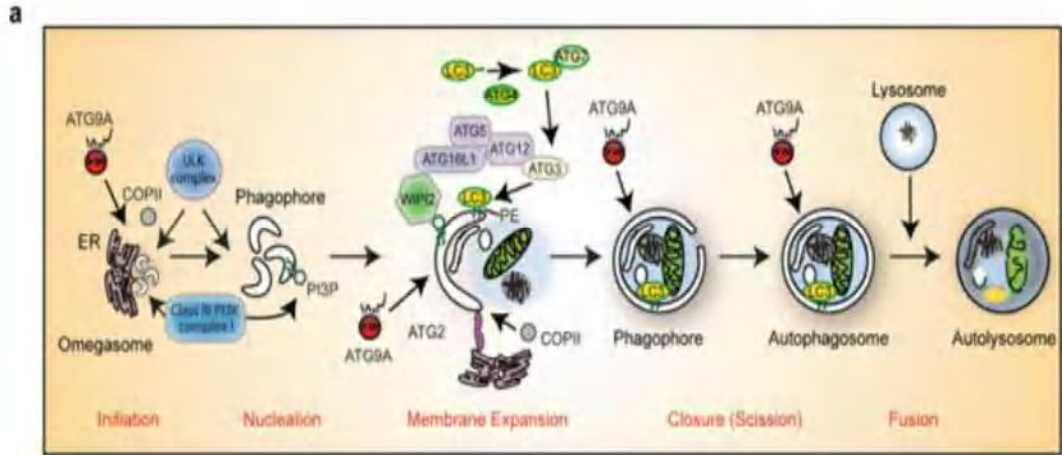


Şekil 2.50. Fagofor biyogenezinde ER temas bölgesi rolünün varsayımsal modeli. Bu şema, ER güdümlü MCS'lerin fagofor biyogenezi membran dinamiklerine nasıl dahil olabileceğine dair varsayımsal bir modeli temsil etmektedir. 1. aşama: Uygun koşullar altında ER membranı, belirli bir membran ile mebran temas bölgeleri (MCS) oluşturur. Otofagozom oluşumu ve olgunlaşmasına katıldığı bilinen ER güdümlü MCS türleri sağda listelenmiştir. 2. aşama: ER-bağlı MCS tarafından oluşturulan spesifik alan, otofajik makinelerin mobilizasyonuna ve omegazom adı verilen ER alt alanında yerel PI3P sentezine izin verir. Buna karşılık, omegazom otofaji ile ilişkili sinyalizasyon ve membran dinamikleri ile ilişkili protein etkileşimi için bir merkez olarak kabul edilir. Özellikle, PI3P-pozitif membran, doğrudan fagofor montajında yer alan PI3P bağlayıcı proteinlerin görev almasını teşvik eder. 3. aşama: PI3P ve ilişkili otofajik membran modulatorlerinin varlığı ve ER ile angaje organel arasındaki MCS boşluğu tarafından oluşturulan kendine özgü sitoplazmik özellikler, fagofor montajı için gerekli olacak membran yapılarının (doğrudan veya dolaylı lipid transferi ve/veya yakalama yoluyla) de novo biyogenezine (yeniden sentezlenmesine) izin verir. 4. aşama: Yeni oluşan veziküller ve/veya membrana bağlı yapılar, omegazom tarafından sınırlandırılan "fincan veya kase benzeri" membranlar arası boşlukta birleşir ve bu da fagofor izolasyonuna yol açar. Bu aşamada, kapalı bir çift membranlı otofagozom haline gelmesinden sorumlu kargoları ve spesifik moleküler kompleksleri alacak olan fagoforun fiziksel olarak sökülmesine izin vermek için MCS'nin ayrılması veya kapatılması gerektiği düşünülebilir. MCS'nin otofagozom biyogenezindeki rol(ler)i hakkındaki sorular solda listelenmiştir (Morel, 2020).

Otofagozom oluşumu ATG proteinleri tarafından yönlendirilir, ancak bu dinamik membran yeniden şekillenmesi sırasında lipidler otofajik membranların ana bileşenleridir. Otofagozomların lipid bileşimi belirsizliğini korusa da fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P) ve PE otofagozom oluşumu için çok önemlidir. Fosfatidilinositol-3-fosfat küçük bir lipiddir, ancak oluşumu ATG proteinlerinin membrana alınması ve otofagozom oluşumunun erken aşaması için çok önemlidir. Buna karşılık PE, ökaryotik hücrelerde önemli bir fosfolipiddir. Açlık koşulları altında, Atg8/LC3/GABARAP proteinleri, PE'ye kovalent konjugasyon yoluyla bağlanır (Mizushima ve ark., 2011).

Otofaji ile ilişkili gen proteinleri işlevsel olarak ayrı multiprotein kompleksleri oluşturarak otofajik süreci düzenler. Bu kompleksler sınıf III fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) kompleksi, Ulk1 kompleksi, iki transmembran proteini ATG9 ve WIPI4 kompleksleri ve iki ubiquitin benzeri protein konjugasyon sistemi (ATG12-ATG5-ATG16L1 sistemi) ve PE-hafif zincir 3 (LC3) sistemidir (Lamb ve ark., 2013; Mizushima ve Komatsu, 2012).

Otofaji ile ilişkili proteinler, otofaji indüksiyonuna yanıt olarak ER ve otofajik membranlara sırayla toplanır. Bunların lokalizasyonu otofagozom oluşumunun farklı aşamalarına bağlı olarak değişir. Memeli hücrelerinde, ULK kompleksi ilk olarak otofajiyi başlatmak için ER membranına alınır. Otofagozom oluşumunun orta ve geç aşamalarında ULK kompleksi ayrıca omegazoma, fagofora ve otofagozoma da lokalize olur (Koyama-Honda ve ark., 2013; Nishimura ve ark., 2017). Memeli PI3KC3-C1'in bir bileşeni olan ATG14L, PI3P üretmek için hem ER ile ilişkili membranları hem de fagoforu hedeflerken (Matsunaga ve ark., 2010), lipid transfer proteini ATG2 özellikle ER ve fagofor temas bölgelerine lokalize olur (Valverde ve ark., 2019). Otofaji ilişkili gen 2'nin benzersiz lokalizasyonu muhtemelen çift membran hedefleme ve bağlama işlevini yansıtmaktadır. WD tekrar alanı fosfoinozotid etkileşimli protein 2 beta ve ATG16L1, açlık koşulu altında PI3P'ye bağlı olarak esasen fagofora lokalize olur (Dooley ve ark., 2014). Endoplazmik retikulum-Golgi ara bölmesinin (ERGIC) LC3 lipidasyonu için önemli bir membran kaynağı olduğu (Ge ve ark., 2013), ATG12-5-16L1 ve ATG3'ün LC3 lipidasyonunu gerçekleştirmek için fagofor membranına ek olarak ERGIC'ye de bağlandığı düşünülmektedir (Şekil 2.51.).



b

	Initiation complex	ER (puncta)	ERES (puncta)	ERGIC (puncta)	Omeosome	Phagophore		Autophagosome
						edge	body	
ULK1	+	+	+	+	+	+	++	-/+
ATG13	+	+	-/+	+	+	+	++	-/+
FIP200	+	+	+	+	+	+	++	-/+
ATG9A	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
ATG14L	-	+	-/+?	+	+	+	++	-/+
ATG2	-	+	-/+?	+	+	++	-/+	-/+
WIPI2B	-	-?	-?	+	+	+++	+++	-/+
ATG12-5-16L1	-	-?	-?	+	+	+++	+++	-/+
LC3-PE	-	-	-?	+	+	+++	+++	+++

Şekil 2.51. Otofagozom oluşumuna katılan ATG proteinleri ve lokalizasyonları. Otofagozom oluşumu beş farklı adıma ayrılabilir: başlangıç, çekirdeklenme, zar genişlemesi, kapanma ve füzyon. b, Memeli hücrelerinde açlıkla indüklenen otofaji altında ATG/Atg proteinlerinin hücre içi dağılımı. Lokalizasyonları beş gruba ayrılmıştır: -, tespit edilemez; -/+, geçici; +, zayıf tespit edilebilir; ++, kolayca tespit edilebilir; +++, açıkça tespit edilebilir. ATG/Atg proteinleri tipik ER benzeri bir modelden ziyade ER ile ilişkili membranlar üzerinde noktasal yapılar gösterir. ERES, ER çıkış bölgeleri, ERGIC, ER-Golgi ara bölgesi (Nishimura ve Tooze, 2020).

Burada otofagozom oluşumunda görev alan bazı kompleksler hakkında bilgi verilmiştir. Otofagozom oluşumunda devreye giren ilk otofajiye özgü kompleks, unc-51 benzeri kinaz 1'in (ULK1) kendisi, otofaji ile ilişkili protein 13 (ATG13), FIP200 (200 kDa'lık fokal adezyon kinaz ailesi etkileşimli protein) ve ATG101'den oluşan ULK1 kompleksidir. Unc-51 benzeri kinaz 1 bir serin/treonin protein kinazdır ve mayadaki ATG1'in memeli ortoloğudur. Beş ULK1 homoloğu vardır (ULK1, ULK2, ULK3, ULK4 ve STK36 (serin/treonin kinaz 36). Bunlardan sadece ULK1 ve

ULK2'nin geleneksel otofaji sinyalizasyonunda yer aldığına inanılmaktadır. Çoğu hücre hattında, bir protein kinaz için beklenebileceği gibi, ULK1'in kinaz aktivitesi otofajinin başlatılması için gereklidir (Lee ve Tournier, 2011). Unc-51 benzeri kinaz 1 ve ULK2 yaklaşık %52 protein dizisi özdeşliğini ve kinaz alanları içinde %78 homolojiyi paylaşır, aynı bileşenlerle etkileşime girer ve çok benzer bir şekilde düzenlendiğine inanılır. Bu iki ULK formunun neden var olduğu açık değildir ve otofaji indüksiyonu için hangi kinazın baskın olduğunu belirleyen doku ekspresyon seviyeleri olabilir. Unc-51 benzeri kinaz 1'in otofaji başlatmadaki önemi çok sayıda çalışmada vurgulanmıştır. Unc-51 benzeri kinaz 1, ULK1'in aşağı regülasyonunun otofajiyi inhibe etmek için yeterli olduğu insan embriyonik böbrek (HEK) 293 hücre hattı hücrelerinde tanımlanmıştır (Chan ve ark., 2007) ve ULK1/2 nakavt farelerden türetilen fare embriyonik fibroblastlarının amino asit yoksunluğuna yanıt olarak otofajiyi indükleyemedikleri ortaya konmuştur (Cheong ve ark., 2011).

Hücrelerde, ULK1 (ve ULK2) en az üç protein (ATG13, FIP200 ve ATG101) ile kompleks halinde bulunur (Ganley ve ark., 2009; Hosokawa ve ark., 2009a; Hosokawa ve ark., 2009b; Jung ve ark., 2009; Mercer ve ark., 2009). Unc-51 benzeri kinaz 1'in ATG13 veya FIP200 ile etkileşimi ULK1 kinaz aktivitesinin ve stabilitesinin artmasına neden olur (Hosokawa ve ark., 2009b; Jung ve ark., 2009; Mercer ve ark., 2009). Üçüncü kompleks üyesi ATG101 hakkında daha az şey bilinmektedir. ATG101 de otofaji için gereklidir ve ATG13'e doğrudan bağlanma yoluyla ULK1 kompleksi ile etkileşime girer (Hosokawa ve ark., 2009a; Mercer ve ark., 2009).

ULK1 kompleksinin normal koşullar altında tam lokalizasyonu belirsizdir, ancak amino asit açlığı üzerine ER'ye yakın noktasal yapılar oluşturur. Bu noktasal yapılar, otofagozom biyogenezini destekleyen ER'nin omegazomlarıyla birlikte lokalize olur (Karanasios ve ark., 2013). Unc-51 benzeri kinaz 1'in bu yapılara lokalizasyonu, otofaji başlangıcı sırasında gözlemlenebilen en erken olaylardan biridir.

Normal koşullar altında yani amino asitlerin varlığında mTORC1 aktiftir. Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1 alt birimi olan RAPTOR aracılığıyla ULK1 ile doğrudan etkileşime girer ve ULK1 ile ATG13'ü fosforile ederek ULK1 kompleksinin katalitik aktivitesini baskılar. Bu durumda ULK1 kompleksi devre dışı kalır ve böylece mTORC1 otofajiyi inhibe eder (Ganley ve ark., 2009; Hosokawa ve ark., 2009b; Jung

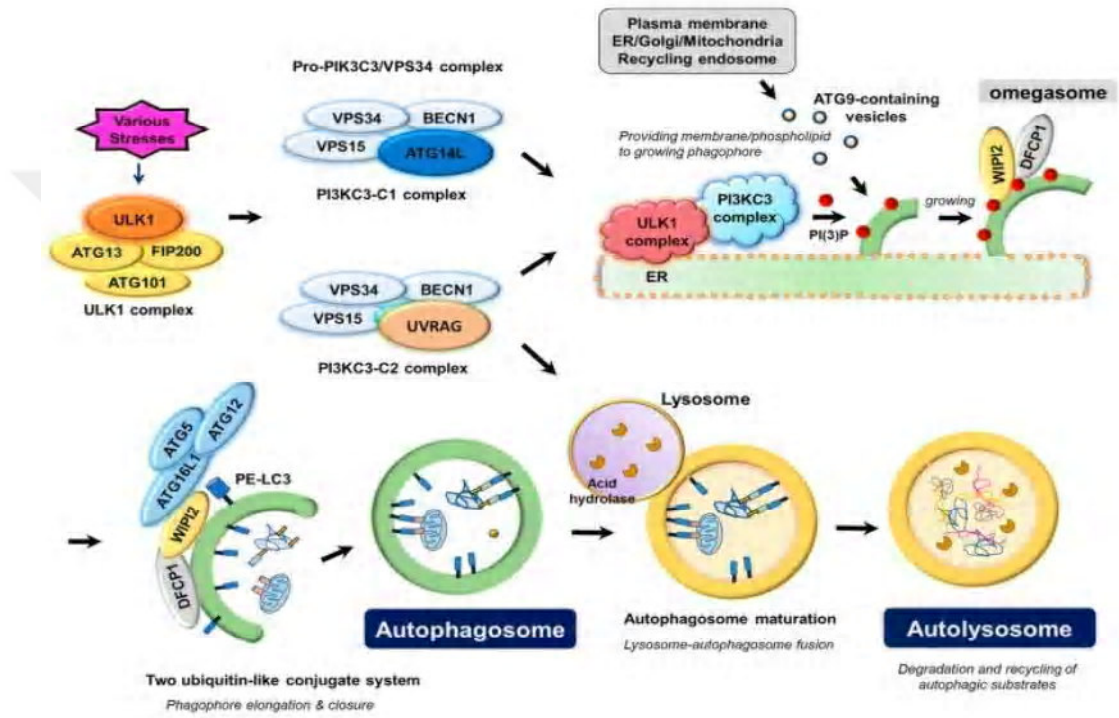
ve ark., 2009; Kim ve ark., 2011; Puente ve ark., 2016; Shang ve ark., 2011). Benzer bir şekilde, mTORC1'e bağılı ATG13 fosforilasyonu ile hem ULK1 aktivitesini hem de otofaji başlatma bölgelerine ULK1 kompleksinin translokasyonunu da olumsuz etkiler (Puente ve ark., 2016).

Amino asitlerin veya büyüme faktörlerinin yokluğunda mTOR'nin inaktivasyonu ULK1'in aktivasyonunun anahtarıdır. Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1'in inhibisyonu ULK1 kinaz aktivitesini artırır, bu da ATG13 ve FIP200 fosforilasyonunu tetikler. Unc-51 benzeri kinaz 1 ayrıca otofagozom oluşumunda bir başka kilit oyuncu olan ATG101 ile ATG13'e bağımlı bir şekilde etkileşime girer (Ganley ve ark., 2009; Hosokawa ve ark., 2009b; Jung ve ark., 2009; Shang ve ark., 2011). Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1'in aksine AMPK, otofagozom biyogenezini desteklemek için ULK1 ve ATG13'ü fosforile eder (Puente ve ark., 2016; Sanchez ve ark., 2012; Shang ve ark., 2011). Araştırmalar, AMPK'nın ULK1'i doğrudan veya dolaylı yoldan aktifleştirerek otofajiyi aktive ettiğini göstermiştir (Kim ve ark., 2011). Öncelikle AMPK otofajiyi indüklemek amacıyla doğrudan ULK1'i fosforile ederek aktifleştirir. İkinci olarak, AMPK ULK1'i fosforile ederek ULK1-AMPK etkileşimini bozan mTORC1'i inhibe eder ve böylelikle ULK1'i dolaylı yoldan aktive etmiş olur. Unc-51 benzeri kinaz 1 ve mTORC1'in bu koordineli düzenlemesi, zarar görmüş olan mitokondriyi ortadan kaldırır ve besin açlığı esnasında mitokondriyal bütünlüğü korumuş olur (Kim ve ark., 2011). Aktif olan AMPK, ULK1 ve TSC2'yi doğrudan fosforile eder (Kim ve ark., 2011; Moruno ve ark., 2012). Fosforillenmiş ULK1; Atg13 ve FIP200 ile otofajinin indüksiyonuna sebep olan bir kompleks oluşturur. Fosforillenmiş ve aktifleşmiş TSC2 ise mTORC1'i inhibe eder (Inoki ve ark., 2003). Aktif AMPK, aynı zamanda mTORC1'in RAPTOR alt birimini direkt olarak fosforilleyerek mTORC1 aktivasyonunu inhibe eder ve otofajiyi indükler (Gwinn ve ark., 2008; Kim ve ark., 2011) ve ULK1'in daha fazla uyarılmasına yol açar. Glikoz açlığı altında AMPK, Ser317 ve Ser777'nin fosforilasyonu yoluyla ULK1'i doğrudan aktive ederek otofajiyi teşvik eder. Besin yeterliliği durumunda, yüksek mTOR aktivitesi ULK1 Ser757'yi fosforile ederek ve ULK1 ile AMPK arasındaki etkileşimi bozarak ULK1 aktivasyonunu önler. Bu koordineli fosforilasyon, otofaji indüksiyonunda ULK1 için önemlidir (Kim ve ark., 2011).

Otofagozomların çekirdeklenmesi için gerekli olan sınıf III PI3K kompleksi I (PI3KC3-C1), Vps15/p150, Vps34/VPS34, Atg14/ATG14L ve Vps30/BECN1'den oluşur (Itakura ve ark., 2008; Sun ve ark., 2008). Fosfolipid fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P) oluşturmak için PI3KC3-C1'in membranlarla doğrudan etkileşime girmesi ve substrat lipidi olan fosfatidilinositolü (PI) tanınması gerekir. Çeşitli çalışmalar PI3KC3-C1 kompleks bileşenleri arasında Vps34/VPS34, Vps30/BECN1 ve ATG14L'nin lipid bağlayıcı alanlara sahip olduğunu ortaya koymuştur (Fan ve ark., 2011; Huang ve ark., 2012; Rostislavleva ve ark., 2015). Otofaji ilişkili gen 14L, PI3KC3-C1'in ER-hedeflemesinde önemli bir rol oynar (Matsunaga ve ark., 2010). Rapamisin'in memeli/mekanistik hedefi inhibisyonunu takiben, aktifleşen ULK1 kompleksi otofaji başlatma bölgelerinde fagofor membranlarına lokalize olur ve bir lipid kinaz kompleksi olan beclin-1-VPS34-AMBRA1 (Beclin1 tarafından düzenlenen otofajiyi aktive edici molekül) kompleksini aktive eder. Vakuolar protein ayırma proteini 34 kompleksi, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz olan VPS34'ün (Vakuolar protein ayırma proteini 34) yanı sıra VPS15 (Vakuolar protein ayırma proteini 15), Beclin 1, ve ATG14L'den (ATG14 benzeri) oluşur. Bu kompleks, fagofor oluşum bölgesinde fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P) bağlayıcı proteinler için bir sinyal molekülü görevi gören PI3P üretiminden sorumludur. Fosfolipid PI3P otofaji, endositoz, fagositoz ve vakuolar protein ayırma gibi çeşitli hücre içi olayların düzenlenmesinde önemli roller oynar. Amino asit açlığı veya mTOR inhibisyonunu takiben, aktifleşen ULK1 VPS34 kompleksindeki ATG14L'ye bağlanarak Beclin 1'i, Ser14 ve Ser30 üzerinde doğrudan fosforile eder (Park ve ark., 2018; Russell ve ark., 2013) ve böylece ATG14L içeren VPS34 komplekslerinin aktivitesini artırır ve yeni oluşan otofagozomda PI3P üretimini aktive ederek VPS34-Beclin 1 komplekslerine alınır. Beclin 1, Ser14 fosforilasyonu, memelilerde tam otofajik indüksiyon için gereklidir (Russell ve ark., 2013) (Şekil 2.52.; Şekil 2.53.). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz ise glikoz açlığına yanıt olarak Beclin 1, Ser93 ve Ser96'yı fosforile eder (Kim ve ark., 2013). Maya Atg6/Vps30'un memeli ortoloğu olan ve sınıf III PI3-kinaz kompleksinin temel bir alt birimi olan beclin 1 otofagozom çekirdeklenmesinde rol oynar.

Beclin 1, ilk olarak anti-apoptotik bir protein molekülü olan Bcl-2'nin (B hücreli lenfoma 2) etkileşim ortağı olarak tanımlanmıştır (Liang ve ark., 1998). B hücreli lenfoma 2 antiapoptotik proteinleri Beclin 1 aracılı otofajiyi inhibe eder. Bu nedenle

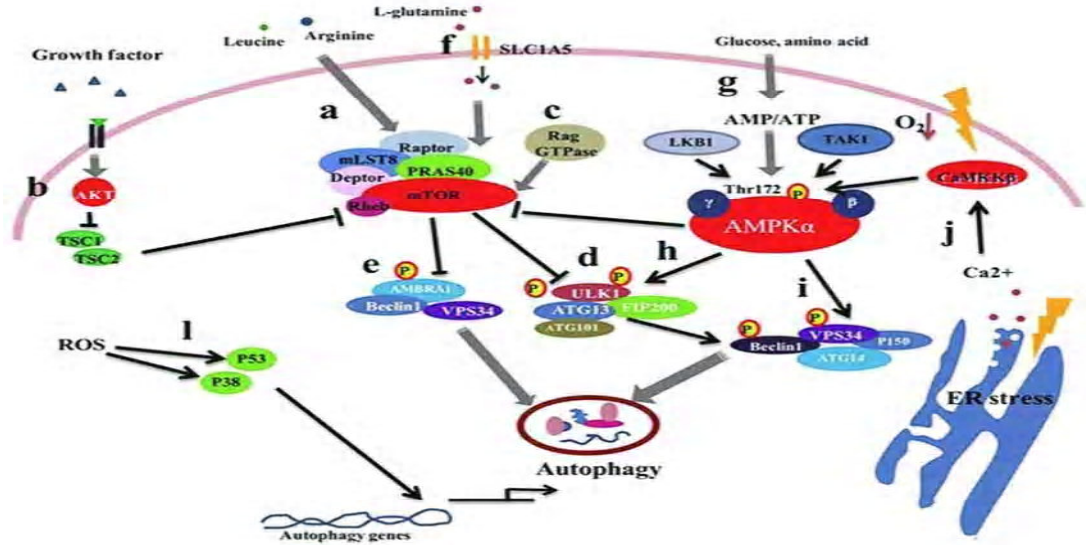
Beclin 1-Bcl-2 etkileşiminin fizyolojik işlevi Beclin 1 tarafından başlatılan otofajiyi kontrol etmektir (Pattingre ve ark., 2005). Bu Bcl-2-Beclin 1 etkileşimine Beclin 1'deki bir BH3 alanı aracılık eder (Maiuri ve ark., 2007). Açlık sırasında Beclin 1 ve Bcl-2'nin (veya Bcl-XL) açlığa bağlı ayrışması, Beclin 1'in otofajik aktivitesini artırır ve otofajiyi indüklemesine yol açabilir (Maiuri ve ark., 2007; Pattingre ve ark., 2005). Endoplazmik retikulum hedefli ancak mitokondriyal hedefli olmayan Bcl-2 otofajiyi etkili bir şekilde baskılar (Pattingre ve ark., 2005).



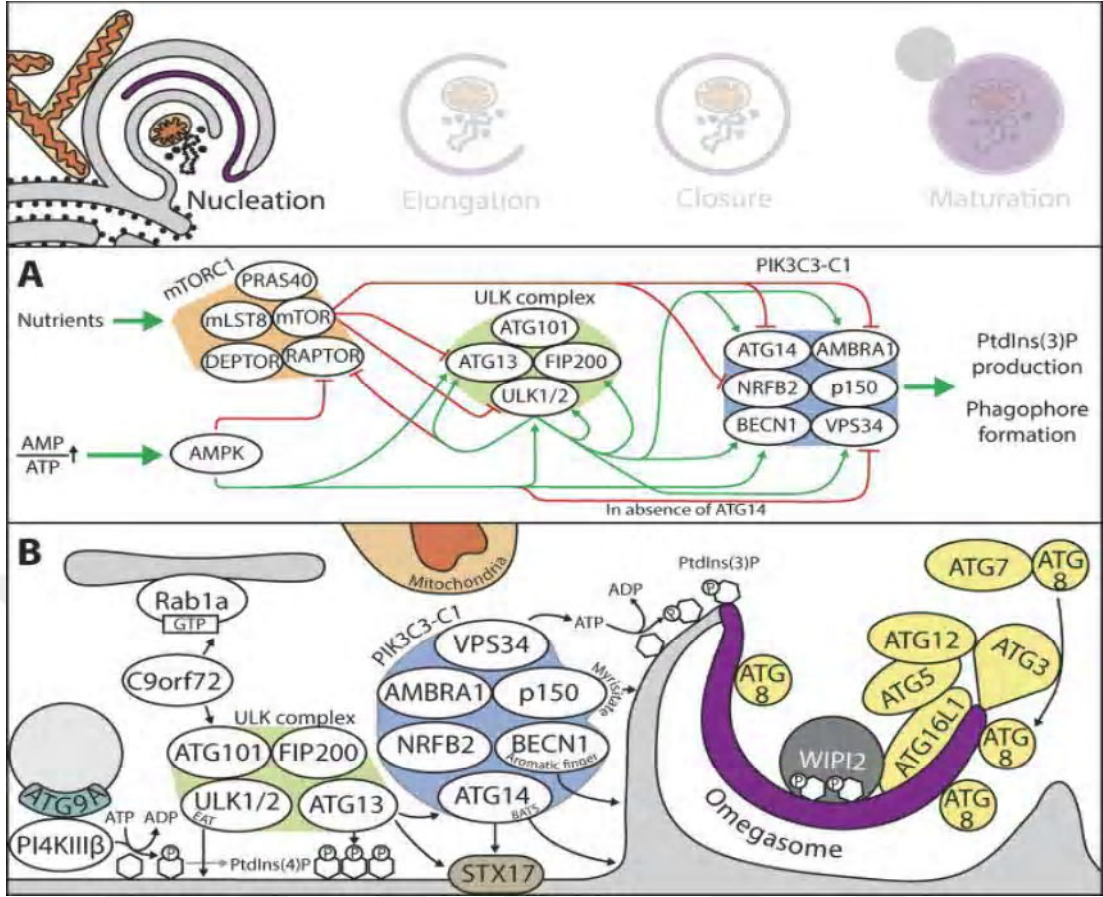
Şekil 2.52. ATG proteinlerinin koordineli eylemleri ile otofagozom biyogenezinin altında yatan moleküler mekanizma. Çeşitli stresler üzerine, katalitik alt birim ULK1 protein kinaz ve ATG13, FIP200 ve ATG101 gibi düzenleyici alt birimlerinden oluşan ULK1 kompleksi, ATG14L (PI3KC3-C1) veya UVRAG (UV ışınlama direnci ile ilişkili gen) (PI3KC3-C2) içeren otofaji yanlısı PI3KC3/VPS34 lipid kinaz kompleksini fosforlayarak ve aktive ederek fagoforun çekirdeklenmesini tetikler, bu da omegazom oluşturmak için fosfolipid ürünü PI(3)P ile farklı bir ER membranını işaretler. Omegazomlar üzerindeki PI(3)P daha sonra PI(3)P efektör proteinleri olan WIPI2 (WD tekrar alanı fosfoinozidit etkileşimli protein 2) ve DFCP1'i (çinko parmak FYVE alanı içeren protein 1) işe alır. WIPI2 ve DFCP1, fagofor membranının uzaması ve kapanması için iki ubiquitin benzeri konjugat kompleksi olan ATG12-ATG5-ATG16L1 ve fosfatidiletanolamin (PE)-konjuge LC3'ü (LC3-II) bir araya getirme işlevi görür. Plazma membranı, mitokondri, geri dönüşüm endozomları veya Golgi kompleksi, ATG9 aracılığıyla membran katmanlarının bir kısmını sağlayarak otofagozomal membranın uzamasına katkıda bulunabilir. Fagofor membranının kapanması, otofagozom adı verilen çift membranlı bir vezikülün ortaya çıkmasına neden olur; bu vezikül olgunlaşır ve sonunda lizozom ile birleşerek otolizozomu oluşturur. Lizozomdaki asidik hidrolazlar otofajik kargoyu bozar ve bozucu ürünler hücrelerin karşılaştığı streslerle başa çıkmak için geri dönüştürülür (Chun ve Kim, 2018).

Beclin 1'in bir başka ortağı da Beclin 1'in sarmal-bobin bölgesi aracılığıyla etkileşime giren UVRAG'dir (UV ışınlama direnci ile ilişkili gen). UV ışınlama direnci ile ilişkili geninin sınıf III PI3-kinaz kompleksinin bir üyesi ve otofajinin pozitif bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (Liang ve ark., 2006). Beclin1 tarafından düzenlenen otofajiyi aktive edici molekül 1 adlı WD-40 alanı içeren bir proteinin Beclin 1 ile etkileşen bir protein olduğu ve Beclin 1'e bağlı otofajiyi pozitif olarak düzenlediği gösterilmiştir. Beclin1 tarafından düzenlenen otofajiyi aktive edici molekül 1 öncelikle nöral dokularda ifade edilir ve normal nöral tüp gelişimi için vazgeçilmezdir (Fimia ve ark., 2007).

Aktifleşen ULK1'in ayrıca VPS34'ü Ser249'da fosforile ettiği gösterilmiştir, ancak bu olayın kesin işlevi açık değildir (Egan ve ark., 2015). Unc-51 benzeri kinaz 1 ve VPS34 arasındaki bağlantı burada sona ermez, çünkü ULK1 ayrıca AMBRA1 aracılığıyla VPS34 kompleksini düzenler. Beclin1 tarafından düzenlenen otofajiyi aktive edici molekül 1, Beclin 1'i bağlar ve VPS34 kompleksinin hücre iskeletine bağlanmasına aracılık eder (Nazio ve ark., 2013). Beclin1 tarafından düzenlenen otofajiyi aktive edici molekül 1'in ULK1 aracılı fosforilasyonunun hücre iskeletinden ayrılmasıyla sonuçlandığı ve bunun VPS34 kompleksinin otofaji başlatma bölgelerine translokasyonunu düzenlediği ileri sürülmektedir (Di Bartolomeo ve ark., 2010).

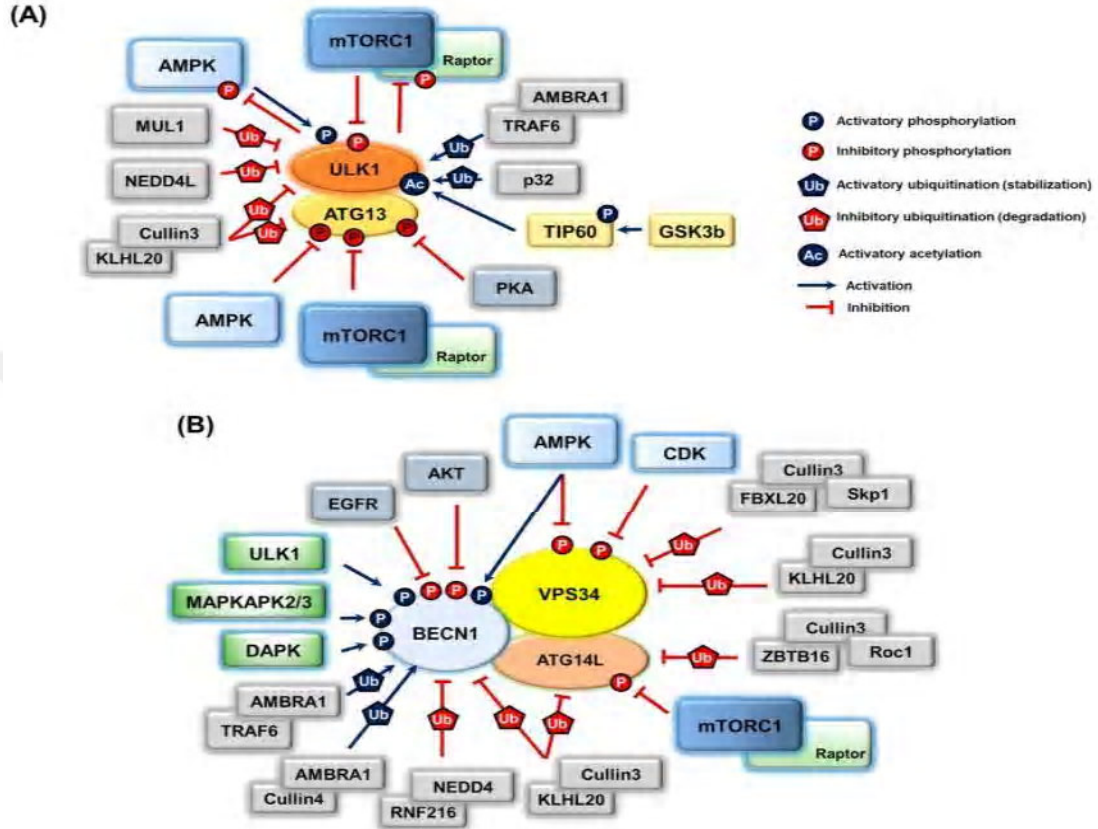


Şekil 2.53. Otofaji, mTOR ve AMPK sinyal yolları aracılığıyla besin ve beslenme stresleri tarafından indüklenir. Besin eksikliği veya stres koşullarına yanıt olarak, otofaji yolunun baskılanmasını takiben mTOR aktive olurken, enerji çekilmesi AMPK aktivasyonunu uyarır. Bu daha sonra fosforilasyon yoluyla mTOR aktivitesini inhibe eder ve bu da otofajinin indüksiyonunu teşvik eder. ER stresleri, hipoksi ve ROS, otofaji gen transkripsiyonunu artırarak veya AMPK yolunu uyararak otofajiyi indükleyebilir. (a) Yüksek oranda korunmuş Ser/Thr protein kinaz TOR, amino asit havuzu sinyalizasyonunun anahtar sensörü ve entegratörüdür. mTORC1; mTOR, RAPTOR, mLST8, PRAS40 ve DEPTOR'den oluşur. (b) Büyüme faktörleri mTORC1'i AKT-TSC1/TSC2 yolu üzerinden düzenler. Büyüme faktörleri mevcut olduğunda, AKT, TSC1/TSC2'yi inhibe ederek otofaji yolunu inhibe eden mTORC1'i aktive etmek üzere aktifleşir. (c) Rag GTPazlar, mTORC1'i doğrudan bağlayarak ve aktive ederek amino asit sinyaline yanıt olarak mTORC1'i aktive edebilir. (d) FIP200 ile kompleks oluşturan ATG13 ve ULK1, ULK1 kompleks aktivitesini inhibe etmek için mTOR tarafından doğrudan fosforile edilebilir. (e) AMBRA1, ULK1'e bağımlı modeliyle, VPS34 ile Beclin 1 etkileşimini teşvik ederek otofagozom çekirdeklenmesini indükler. (f) L-glutamin akışının 2 taşıyıcı tarafından kontrol edildiği bulunmuştur. Bunlar nötral aminoasit taşıyıcıları olan SLC1A5 ve SLC7A5/SLC3A2. (g) Çevresel AMP, ADP veya ATP, γ alt biriminin adenin nükleotid bağlama bölgeleri aracılığıyla AMPK'yı doğrudan bağlayabilir. (h) Glikoz eksikliği altında, AMPK aktivasyonu ULK1 otofosforilasyonunu artırarak otofaji indüksiyonunu teşvik eder. (i) Glikoz eksikliği üzerine, VPS34, p150, ATG14 ve Beclin 1 veya UVRAG içeren farklı VPS34 komplekslerinin aktivitesi düzenlenir. (j) ER, hücresel Ca²⁺ depolama bölgesidir ve Ca²⁺'un ER lümeninden sitozole sürekli olarak uzaklaştırılması ER stresini tetikleyebilir. Sitosolik Ca²⁺'daki bir artışın otofajinin başlamasına yol açtığı gösterilmiştir. ROS aracılı otofaji indüksiyonu P53 ve P38 bağımlıdır. ROS biriktiğinde, P53 ve P38 yolları otofajik gen ekspresyonunu düzenlemek için aktive olur ve bu da otofajiyi başlatır. AMBRA1: otofaji ve beclin düzenleyici 1, AMPK: AMP ile aktive olan kinaz, ATG: otofaji ile ilişkili gen, CaMKK β : kalsiyum/ kalmodulin bağımlı protein kinaz kinaz beta, DEPTOR: DEP-alanı içeren mTOR ile etkileşen protein, FIP200: 200 kDa'lık FAK ailesi etkileşimli protein, ER: endoplazmik retikulum, LKB1: karaciğer kinaz B-1, mLST8: mammalian lethal with sec13 protein 8 veya TORC alt birimi LST8, mTOR: rapamisin'in memeli hedefi, PRAS40: 40 kDa'lık prolin bakımından zengin AKT substratı, TAK1: dönüştürücü büyüme faktörü beta aktiveli kinaz 1, RAPTOR: mTOR'un düzenleyici ilişkili proteini, Rheb: beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu, ROS: reaktif oksijen türleri, SLC1A5: çözünen taşıyıcı aile 1 üyesi 5, TSC: tüberez skleroz kompleksi, UVRAG: UV radyasyon direnci ile ilişkili gen, VPS34: Vakuolar protein ayırma proteini 34, ULK1: Unc-51 benzeri kinaz 1 (He ve ark., 2018).



Şekil 2.54. Fagofor çekirdeklenmesinde rol oynayan sinyal olaylarına ve protein-protein ve protein-membran etkileşimlerine genel bakış. **(A)** Besin açısından zengin koşullar, ULK kompleksinin (ULK1/2 ve ATG13) ve PIK3C3-CI'nın (NRFB2, ATG14 ve AMBRA1) mTOR aracılı fosforilasyonları ile otofajiyi inhibe eden mTORC1'in aktivitesini teşvik eder. Buna karşılık, düşük enerji durumu (yüksek AMP-ATP oranı), mTORC1 kompleksinin (Raptor), ULK kompleksinin (ULK1 ve ATG13) ve PIK3C3-CI'nın (ATG14 varlığında BECN1 ve ATG14 yokluğunda VPS34) fosforilasyonu yoluyla otofajiyi olumlu yönde düzenleyen AMPK'nın aktivasyonuna neden olur. ULK kompleksinin aktivasyonu otofosforilasyon (ULK1, FIP200 ve ATG13), mTORC1 üzerinde inhibitör fosforilasyon (RAPTOR) ve PIK3C3-CI'nın aktive edici fosforilasyonları (BECN1, VPS34, ATG14 ve AMBRA1) yoluyla otofajiyi kolaylaştırır. **(B)** A'da açıklanan otofajiyi indükleyen sinyal olayları ULK kompleksinin membrana alınmasına yol açar. Bu, C9orf72 (Rab1 efektörü) ile etkileşimi tarafından desteklenir ve ULK1'in EAT (ULK1 proteini üzerinde bir bölge) alanına ve ATG13'ün N-terminaline bağlıdır. İkincisi, fagofor uzaması için önemli bir transmembran proteini olan ATG9 ile etkileşime giren PI4KIIIβ tarafından üretilen PtdIns(4)P dahil olmak üzere asidik fosfolipidlerle etkileşime girer. ULK kompleksi, ATG14 ve ATG13 arasındaki doğrudan etkileşimler yoluyla PIK3C3-CI'yı stabilize eder. ATG14 ayrıca ER-mitokondri temas bölgelerinde ER'de yerleşik protein STX17 ile etkileşime girer. PIK3C3-CI membran bağlanmasına ayrıca ATG14 (N-terminal sistein bakımından zengin alan ve PtdIns (3)P bağlayıcı BATS alanı), BECN1 (beclin 1) ve p150 (N-terminal miristat) aracılık eder. PIK3C3-CI tarafından PtdIns (3)P üretimi, ATG8 konjugasyon mekanizmasının bir E3'ü olan ATG12-ATG5-ATG16L1 kompleksinin katılmasıyla ATG8'in PE'ye konjugasyonunu teşvik eden PtdIns(3)P efektör proteinini WIP12'nin dahil olmasını kolaylaştırır. Lipidlenmiş ATG8 proteinleri, çekirdek otofaji makinesi bileşenleri için bir iskele ve otofajik kargo reseptörleri için membran bağlanma bölgeleri olarak işlev görebilir. Fagofor membranı mor renkle gösterilmiştir (Melia ve ark., 2020).

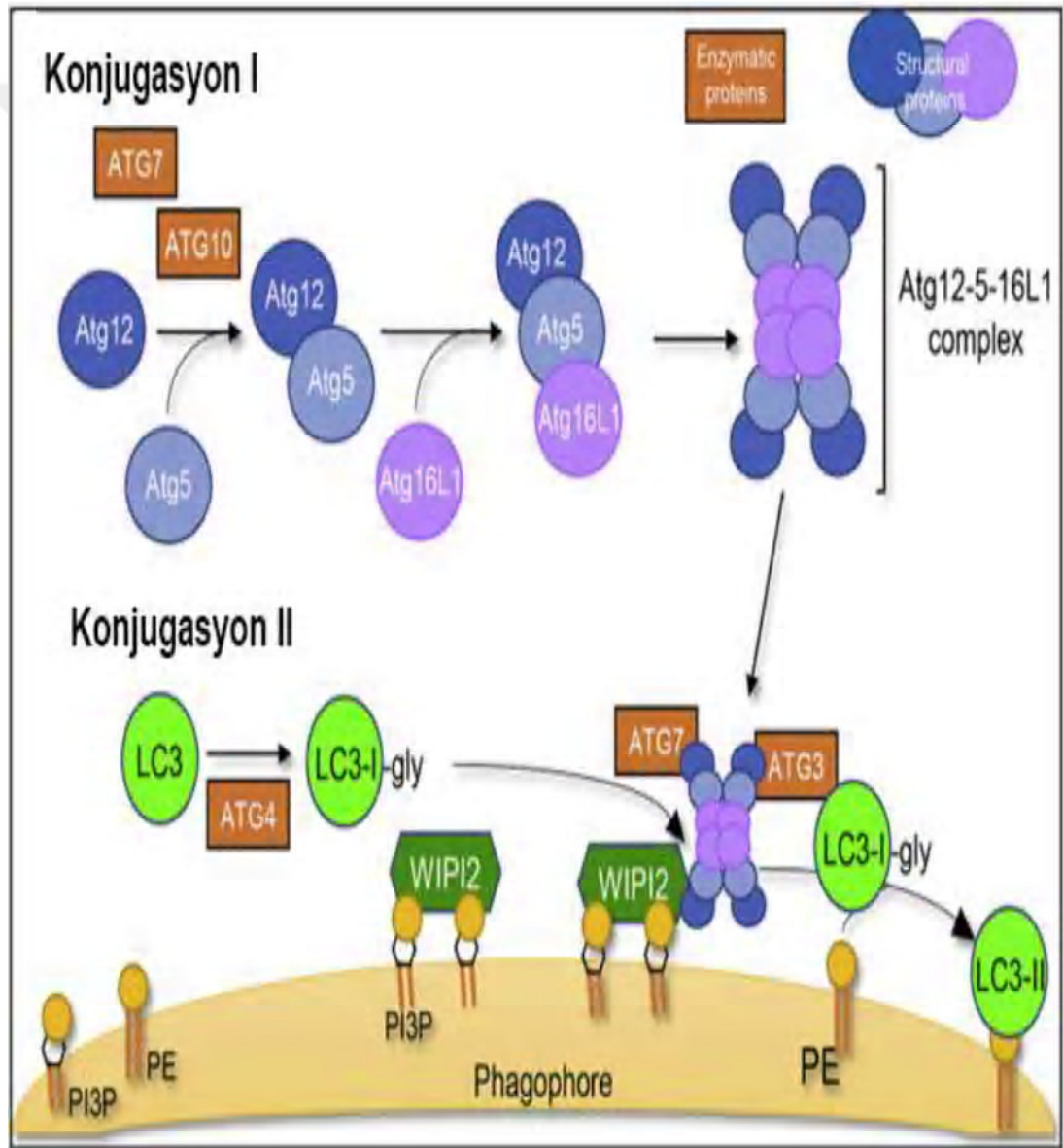
Otofagozomun başlatılması ve çekirdeklenmesinde otofajinin en üst düzey düzenleyicileri olarak hem ULK1 kompleksi hem de otofaji yanlısı PIK3C3/VPS34 kompleksi, düzenlemeleri için çeşitli post-translasyonel modifikasyonlara uğrar (Şekil 2.54.; Şekil 2.55).



Şekil 2.55. İki önemli otofaji başlatıcı kinaz kompleksi olan ULK1 ve PIK3C3/VPS34 kompleksinin post-translasyonel modifikasyonları ve düzenlemeleri. (A) ULK1 kompleksi fosforilasyon ile düzenlenir ve AMPK tarafından katalitik alt birim ULK1 üzerinde çoklu fosforilasyon ile aktive edilir ve ULK1 (mTORC) ve ATG13 (mTORC1, PKA ve AMPK) üzerinde fosforilasyon ile inhibe edilir. Ayrıca, ULK1 kompleksi ULK1 (AMBRA1-TRAF6 ve p32) üzerinde ubiquitinasyon ile aktive edilirken, ubiquitinasyona bağlı degradasyon ile negatif olarak düzenlenir. Büyüme faktörü tükenmesine yanıt olarak, ULK1'in asetilasyonu aktive GSK3 (Glikojen sentez kinaz) -TIP60 asetiltransferaz eksenini artırır ve otofaji indüksiyonu ile sonuçlanır. ULK1, mTORC1 alt birimi RAPTOR proteinini ve tüm AMPK kompleksi alt birimlerini fosforile ederek yukarı akış düzenleyicileri AMPK ve mTORC1 için negatif bir geri besleme döngüsü oluşturabilir. (B) PIK3C3/VPS34 kompleksinin fosforegülasyonu katalitik alt birim VPS34 lipid kinaz (inhibisyon için AMPK ve CDK (Siklin bağımlı kinaz)), BECN1 (aktivasyon için AMPK, ULK1, MAPKAPK2/3 ve DAPK (Ölümlle ilişkili protein kinaz); inhibisyon için AKT/PKB ve EGFR (Epidermal büyüme faktörü)), ATG14L/Barkor (inhibisyon için mTORC1) ve UVRAG'de (inhibisyon için mTORC1) gözlenir. VPS34 (degradasyon için FBXL20-Skp1-Cullin1 ve Cullin3-KLHL20 (Kelch benzeri protein üyesi 20)), BECN1 (degradasyon için NEDD4 (Beclinle ilişkili ile dolaylı otofajik proteini)-RNF216 ve Cullin3-KLHL20, stabilizasyon için AMBRA1-TRAF6 veya Cullin4) ve ATG14L/Barkor (degradasyon için ZBTB16-Cullin3-Roc1 ve Cullin3-KLHL20) üzerindeki ubiquitinasyonlar da otofaji düzenlemesi için önemlidir (Chun ve Kim, 2018)

c) **Fagoforun uzaması**

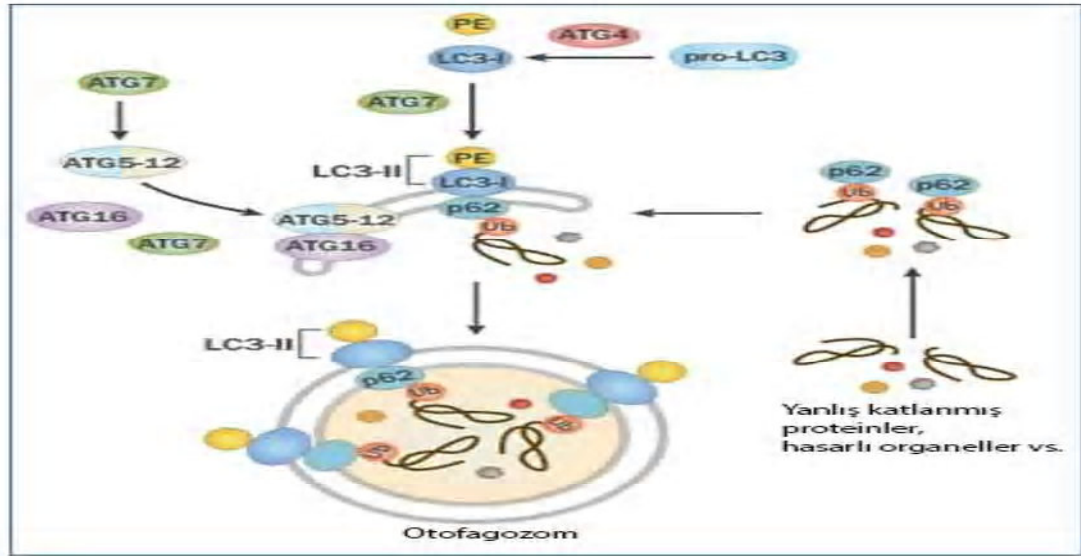
Fagofor veya izolasyon membranı, elektron mikroskopta genellikle berrak bir lümene sahip ince bir sisterna olarak görülür ve otofajinin indüksiyonu için gerekli tüm ATG proteinlerini toplayan ve barındıran yapıdır. Fagofor membranının genişlemesinde görevli araçlar arasında ayrıca iki ubikuitin benzeri konjugasyon sistemi rol oynar: ATG12-ATG5-ATG16L sistemi ve ATG8/MAP1LC3 (mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3, bundan sonra LC3 olarak anılacaktır) konjugasyon sistemi (Ravikumar ve ark., 2010).



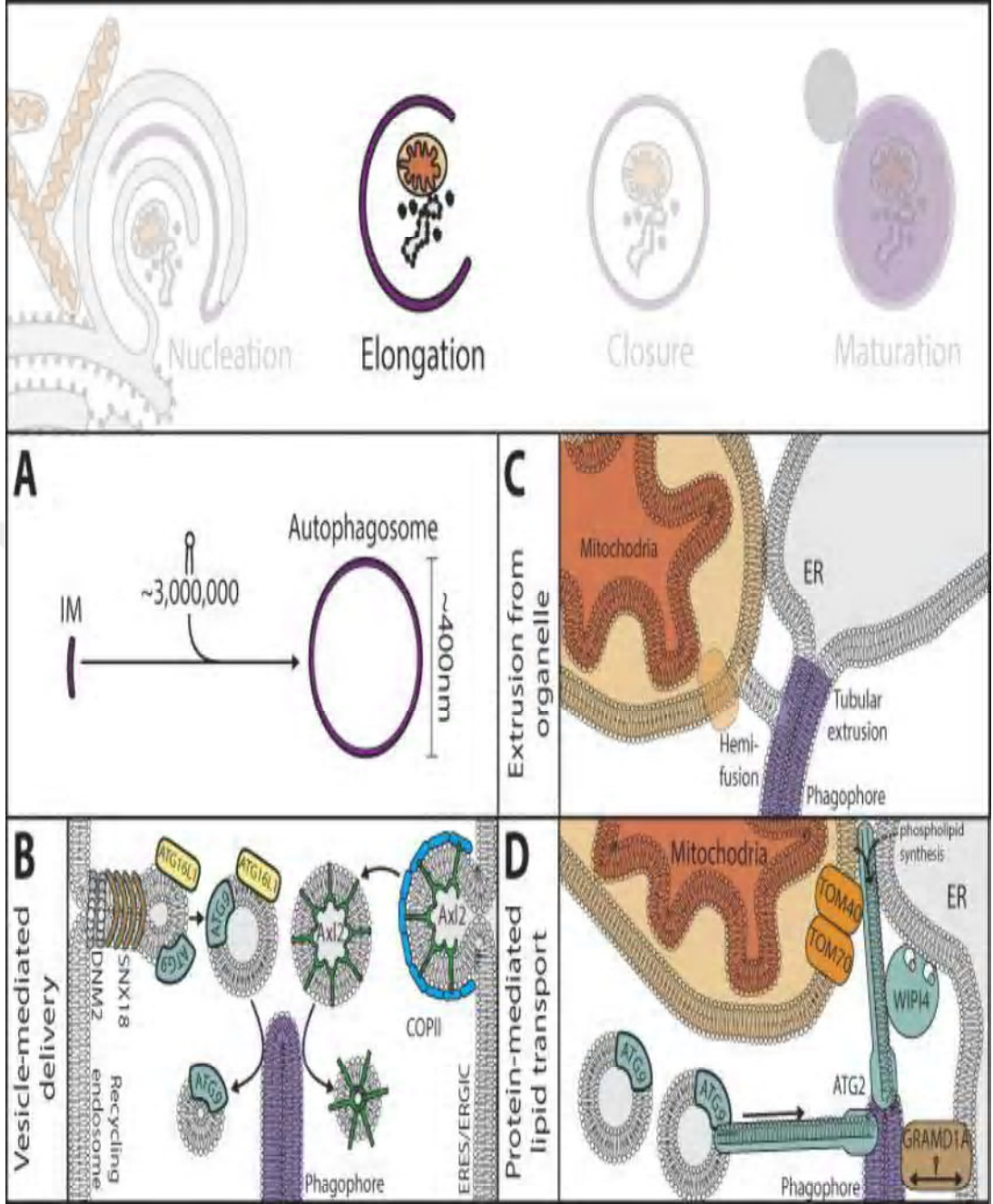
Şekil 2.56. Fagofor membranının genişlemesinde görevli araçlar arasında ayrıca iki ubikuitin benzeri konjugasyon sistemi rol oynar: ATG12-ATG5-ATG16L sistemi ve fosfatidiletanolamin (PE)-hafif zincir 3 (LC3) sistemi (Fleming ve ark., 2022).

İlk konjugasyon reaksiyonunda ATG12, ATG7 (E1 benzeri enzim, ubikuitin-aktive edici enzim) ve ATG10 (E2 benzeri enzim) yoluyla ATG5'e konjüge edilir ve sonra konjüge ATG12-ATG5 kompleksi ATG16L13 ile bir kompleks oluşturur. Otofaji ilişkili gen 12-ATG5-ATG16L13 kompleksi, uzayan otofagozomların dış zarına lokalize olur, ama otofagozom oluşumu bitmeden önce membrandan ayrılır.

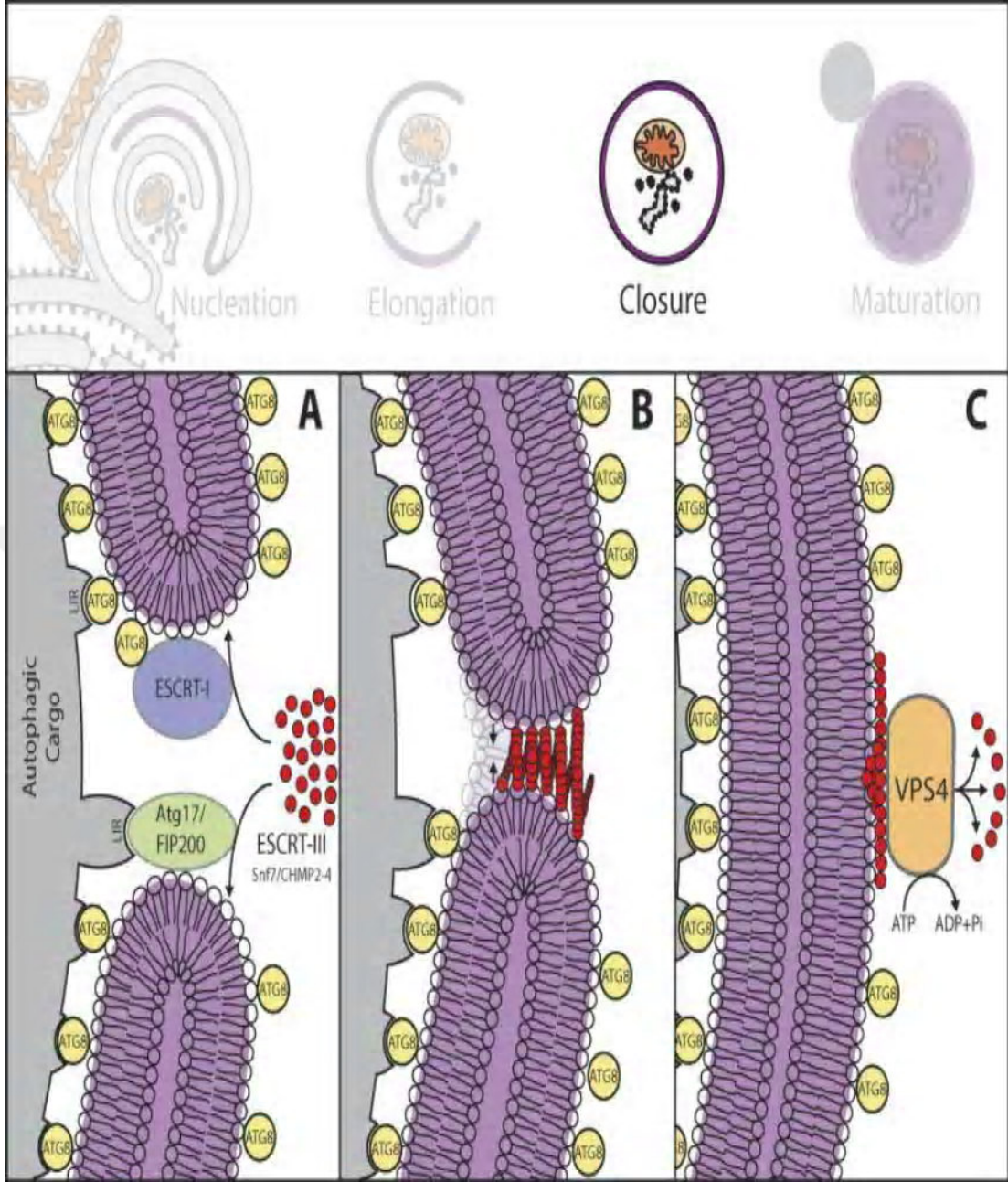
İkinci reaksiyonda, pro-LC3'ün ATG4 (B) proteaz tarafından proteolitik olarak parçalanmasıyla LC3-I üretilir ve bu da konjugasyona uygun bir C-terminal glisin kalıntısını ortaya çıkarır. Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3'ün sitosolik formu olan LC3-I E1 benzeri enzim olan ATG7, E2 benzeri enzim olan ATG3 (ubikuitin konjüge edici enzim) ve E3 benzeri enzim olan ATG12-ATG5-ATG16L13 kompleksinin sıralı aktivasyonu ile yeni oluşan otofagozomların yüzeyindeki PE konjüge edilir ve LC3'ün membrana bağlı bir formu olan LC3-PE konjugatı (LC3-II) oluşturulur ve bu da otofagozomal membranlara alınır (Şekil 2.56.- Şekil 2.58.). Otofagozomlar lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturur ve otofagozom içinde bulunan bileşenler lizozom içi hidrolazlar vasıtasıyla parçalara ayrılır. Bu aşamada, otolizozomun lümenindeki LC3-II de parçalanır (Tanida ve ark., 2008).



Şekil 2.57. ATG4 pro-LC3'ü parçalayarak LC3-I'i oluşturur ve daha sonra LC3-II'nin oluşumu için ATG7 tarafından PE'ye konjüge edilir. LC3-II, membran uzamasına yardımcı olmak için otofagozomal membrana alınır. ATG7 ayrıca ATG5-ATG12-ATG16 kompleks oluşumuna aracılık eder ve LC3-II ile ATG5-ATG12-ATG16 kompleksi otofagozom oluşumu için oldukça kritiktir. Adaptör protein SQSTM1/p62, otofajik bölmelere lokalize olarak otofajiye aracılık etmek için ubikuitine proteinlere ve LC3-II'ye bağlanarak ubikuitine proteinleri ve organelleri degradasyon için otofagozoma taşır (<https://www.novusbio.com/support/faqs-autophagy-and-lc3>, Erişim tarihi: 30 Haziran 2023).



Şekil 2.58. Fagofor uzamasında yer alan mekanizmalar modeli. (A) 400 nm'lik bir otofagozom üretmek için yaklaşık 3 milyon lipidin gerekli olabileceği varsayılmaktadır. Fagofor uzamasına katılan lipidlerin iletimi için üç farklı mekanizma önerilmiştir: vezikül aracılı iletim, önceden var olan organellerden membran ekstrüzyonu ve protein aracılı lipid taşınımı. (B) Vezikül aracılı iletim için, geri dönüşüm endozomlarından oluşan ATG9- ve ATG16L1-pozitif veziküller (SNX18, DNM2 (Otofaji ile dolaylı ilişkili protein) ve adaptör proteinlere bağlı) ve ER çıkış bölgelerinden (ERES) ve ERGIC'den COPII (Kaplama proteini kompleksi II) vezikülleri fagofor uzamasına dahil edilmiştir. (C) Önceden var olan organellerden membran ekstrüzyonu için, genişleyen fagoforu oluşturmak üzere ER ve mitokondriden tübüler ekstrüzyonlar önerilmiştir. (D) ATG2A ve GRAMD1A (Kolesterol transfer proteini) için gösterilen protein aracılı lipid taşınması için ATG2A, lipid spesifikliği çok az olan veya hiç olmayan bir lipid tüneli olarak işlev görürken, GRAMD1A bir kolesterol transfer proteini olarak işlev görür (Melia ve ark., 2020).



Şekil 2.59. Otofagozom kapanması taşıma makineleri için gerekli endozomal ayırma kompleksleri (ESCRT) tarafından kolaylaştırılır. ESCRT, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III olarak bilinen sitozolik protein komplekslerinden oluşur. Bir dizi aksesuar proteinle birlikte bu ESCRT kompleksleri, membranların sitoplazmadan bükülmesine/uzaklaşmasına neden olan benzersiz bir membran yeniden şekillendirme modunu mümkün kılar. (A) ESCRT-I bileşenleri bilinmeyen bir mekanizma ile fagofora alınır, bunu filament oluşturan ESCRT-III bileşenleri CHMP2A ve CHMP4B'nin alınması izler. Mayada Atg17 (FIP200), ESCRT-III alt birimi Snf7 (CHMP4) ile etkileşime girerek fagofor kapanması için ESCRT-III'ün katılmasında ULK kompleksinin bir rolü olduğunu gösterir. (B) ESCRT-III polimerizasyonu filament oluşumuna yol açarak fagoforun ön kenarını membran füzyonuna izin verecek şekilde yakın bir konuma getirir. (C) AAA-ATPaz VPS4'ün olaya katılması füzyon sürecini çözer ve ESCRT-III filament yapısının depolimerizasyonunu kolaylaştırır. ATG8 proteinleri de fagofor uzaması ve kapanmasında rol oynar, ancak ilgili mekanizmalar net değildir (Melia ve ark., 2020).

LC3 nedir, ATG8 ile ilişkisi nasıldır ve ATG8 ile farklılıkları nelerdir?

LC3 başlangıçta mikrotübülle ilişkili proteinler 1A ve 1B'nin (MAP1LC3) bir alt birimi olarak tanımlanmış ve daha sonra maya proteini ATG8 (APG8, AUT7 veya CVT5 olarak da adlandırılır) ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Mayada sadece bir ATG8 proteini olmasına rağmen memeli homologları iki ana alt aileye ayrılmıştır: MAP1LC3/LC3 [LC3A, LC3B ve LC3C (mikrotübül ilişkili protein 1A, 1B ve 1C'nin hafif zinciri)] ve γ -aminobütirik asit reseptörü ile ilişkili protein (GABARAP) [GABARAP, GABARAPL1 ve GABARAPL2/GATE-16 (16 kDa'lık Golgi ile ilişkili ATPase arttırıcı)] (Slobodkin ve Elazar, 2013). Hem LC3 hem de GABARAP, sırasıyla LC3-II ve GABARAP-PE oluşturmak için lipidasyon/PE-konjugasyonunu takiben bölünmeye uğrayan öncü proteinler olarak ifade edilir. GABA tip aminobütirik asit reseptörü ilişkili proteini 2'nin yanı sıra, tüm memeli ATG8 homologlarının otofagozom biyogeneğinde rol oynadığı belgelenmiştir (Şekil 2.59.). Ayrıca, moleküler yüzey yüklerinin dağılımındaki benzersiz özellikler nedeniyle, LC3 ve GABARAP'nin seçici otofaji için farklı kargo setlerini tanıdığı öne sürülmüştür. Memeli ATG8/LC3 ailesi bir amino-terminal sarmalına ve hidrofobik cepli β -şeritlerinden oluşan bir C-terminal ubiquitin çekirdeğine sahiptir (Lee ve Lee, 2016).

LC3A, LC3B ve LC3C veya LC3-I ve LC3-II arasındaki fark nedir?

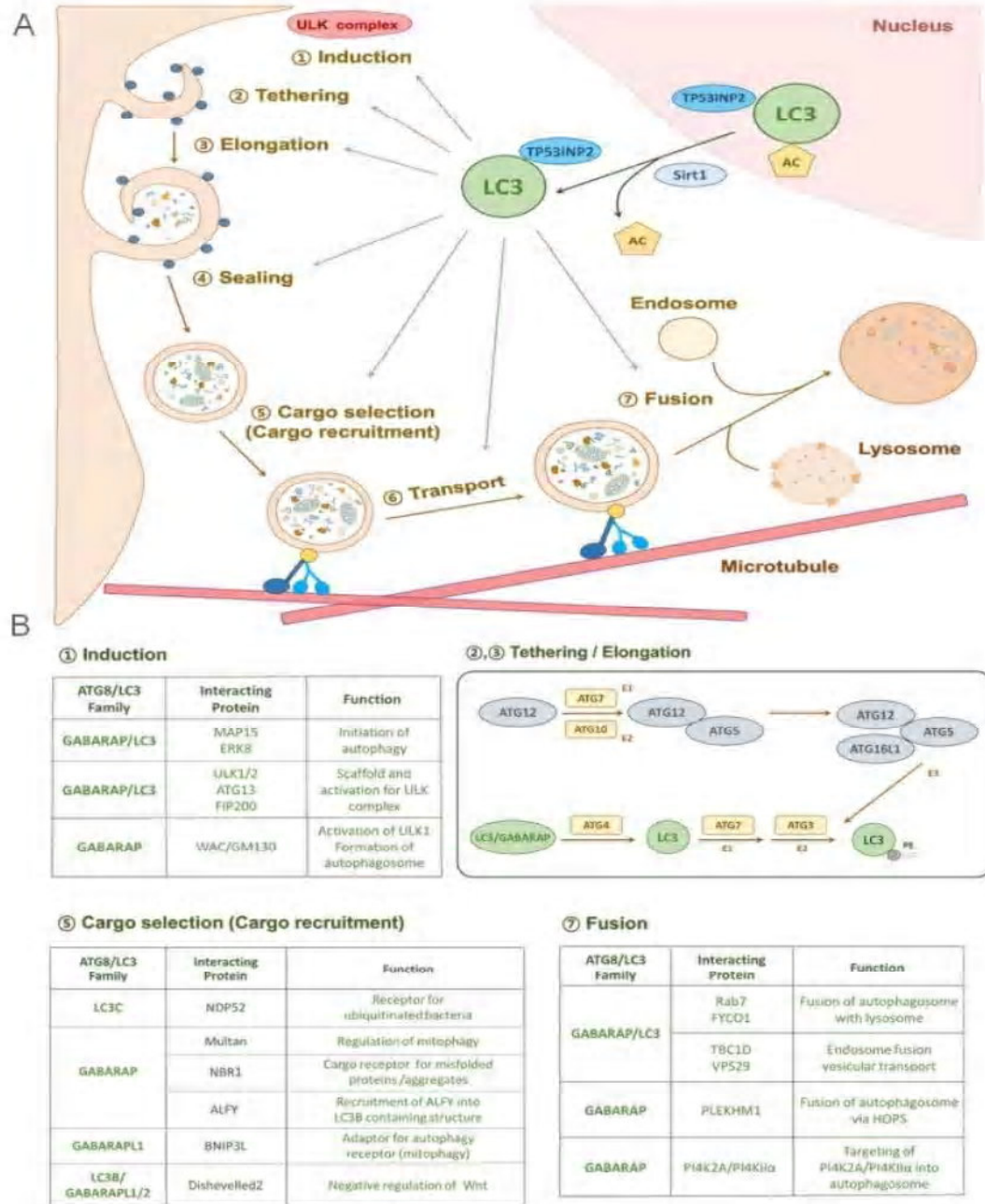
Mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3) memeli dokularında ve kültürlenmiş hücrelerde her yerde bulunan ve yaklaşık 17 kDa moleküler ağırlığa sahip çözünebilir bir proteindir. Benzersiz doku dağılımı gösteren LC3A, LC3B ve LC3C ek varyantlar olarak ifade edilir. Tüm LC3 izoformları, otofaji sırasında özellikle PE konjugasyonu (lipidasyon) olmak üzere post-translasyonel modifikasyonlara uğrar. Otofajik sinyal üzerine, LC3'ün sitozolik formu (LC3-I), otofagozomal membranlara alınan LC3-II oluşturmak için PE'ye konjuge edilir.

LC3-I ve LC3-II'nin önemi nedir ve bunları birbirinden ayırt etmek için kullanılan en iyi immünoassay metodu hangisidir?

LC3'ün işlenmemiş formu (pro-LC3), translasyonundan sonra ATG4 proteaz tarafından proteolitik olarak parçalanarak karboksi terminali açıkta kalan bir glisin ile LC3-I formunun oluşmasına neden olur. Otofajik sinyal üzerine LC3-I, ATG7 (E1

benzeri bir aktivite), ATG3 (E2 benzeri bir konjugasyon aktivitesi) ve ATG12-ATG5-ATG16L multimerleri (E3 benzeri ligaz aktivitesi) tarafından LC3-II formunun oluşumu için bir PE parçasına konjuge edilir. Fosfatidiletanolamin grubunun lipofilik karakteri LC3-II'nin otofagozomların membranlarına yerleşmesini kolaylaştırır ve daha sonra otofagozomlar lizozomlarla kaynaştığında LC3-II proteini parçalanır. LC3-PE konjugatı, özellikle LC3B-II, fagofordan lizozomal bozunmaya kadar olan süreç boyunca otofajik yapılara spesifik olarak lokalize olan iyi karakterize edilmiş tek proteindir. Otofaji ilişkili gen 8'in memeli homologu olan LC3-II, otofagozomların içinde ve dışında bulunan, bilinen en iyi otofagozoma özgü protein işaretleyicisidir (Mizushima, 2007). LC3-PE konjugatı miktarının otofagozom oluşumunun derecesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Kabeya ve ark., 2000). Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3'ün kendisi de otofaji tarafından parçalanabilir ve bu da onun otofajik bir substrat olduğunu gösterir. Bu nedenle LC3, otofajik aktivitenin yanı sıra otofagozom sayısını izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Dahası, ortaya çıkan kanıtlar seçici otofaji sırasında LC3'ün kargo reseptörleri ile etkileşim yoluyla seçici kargoyu otofagozoma almak için bir adaptör protein olarak işlev gördüğünü göstermiştir (Rogov ve ark., 2014). Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 ayrıca LAP (LC3-ilişkili fagositoz) olarak adlandırılan ve klasik çift membranlı otofagozoma sahip olmayan bir süreci de düzenler. Bunun yerine, ölü hücrelerin etkili bir şekilde temizlenmesinde rol oynayan tek membranlı bir yapı oluşturulur (Martinez ve ark., 2011). Moleküler kütle olarak daha büyük olmasına rağmen, potansiyel olarak artan hidrofobiklik nedeniyle LC3-II SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) jellerinde daha hızlı elektroforetik hareketlilik gösterir. LC3-PE konjugatı, LC3-I için 16-18 kDa'ya kıyasla 14-16 kDa'da görünür. LC3'ün sitozolik formu ve LC3-II'nin farklı hareketliliği, Western blot (WB) testinde tespit edilmelerine ve karakterize edilmelerine yardımcı olur ve LC3-I'nin daha düşük göç eden LC3-II formuna dönüşümü sayısız çalışmada otofajinin bir göstergesi olarak kullanılmıştır. İmmünohistokimya/immünofloresan (ICC/IF) ve immünohistokimya (IHC), LC3-I sitosolde dağınık bir sinyal oluştururken, LC3-II otofagozomları temsil eden noktasal boyanma olarak gözlenir. Otofaji deneylerinde en iyi yaklaşım LC3'ü Western blotta tespit etmek ve LC3-I/LC3-II oranlarını otofagozom sayısı veya

otofagozom punktalari için pozitif olan hücrelerle ilişkilendirmektir (Klionsky ve ark., 2016).



Şekil 2.60. Otofaji sırasında LC3 ve GABARAP alt ailelerinin diferansiyel/telafi edici rolleri. (A) Otofaji çeşitli hücresel streslere yanıt olarak indüklenebilir. Otofaji aktive edildikten sonra, indüksiyon, izolasyon membranının oluşumu/uzaması/sızdırmazlığı, kargo seçimi/yeniden olaya katılımı, otofagozomun taşınması/füzyonu ve otolizozomda kargo degradasyonu dahil olmak üzere çok adımlı bir süreçte gerçekleştirilir. (B) LC3, GABARAP veya GABARAPL1, otofaji çekirdek makine proteinleri veya spesifik proteinlerle birlikte, otofagozom biyogenezini, kargo tanıma / geri çağırma, taşıma ve füzyonu düzenler. Membranın uzaması veya kargo alımı gibi bazı işlevler bu proteinler arasında gereksizdir; ancak, füzyon veya belirli kargonun alımı gibi diğer işlevler, etkileşime giren ortaklarıyla birlikte her ATG8/LC3 proteini tarafından farklı şekilde düzenlenir (Lee ve Lee, 2016).

Maya atg8, LC3 (LC3A, B, C), GABARAP, GABARAPL1 [GEC1 (GABA tip A reseptör ilişkili protein B benzeri 1), GABARAPL2 [GATE-16 olarak da bilinir] ve GABARAPL3 ile amino asit dizisi benzerliği gösteren ubiquitin benzeri (Ubl) bir proteindir (Xin ve ark., 2001). Otofaji ilişkili gen 8'in memeli homologları arasında LC3 ilk olarak sıçan beyinde mikrotübül ilişkili protein 1A ve 1B'nin hafif zinciri olarak tanımlanmıştır (LC3A ve LC3B). Buna ek olarak, LC3C'nin yakın zamanda otofagozom oluşumunda ve TECPR2'ye (tektonin β -propeller içeren protein 2) bağlanarak COPII (kaplama proteini kompleksi II)-bağımlı ER ihracında bir rolü olduğu bildirilmiştir (Stadel ve ark., 2015).

Otofaji ile ilişkili gen 8 (ATG8)/LC3 ailesi üyeleri her yerde eksprese edilmelerine rağmen, ifadelerinde bazı doku özgüllükleri vardır. GABA tip aminobütirik asit reseptörü ilişkili proteini L1 veya GABARAPL2 mRNA'ları ağırlıklı olarak merkezi sinir sisteminde, özellikle de beyinde ifade edilir. İlginç bir şekilde, GABARAPL1 özellikle pons veya diensefalon gibi somatomotor veya endokrin fonksiyonu düzenlemek için önemli bölgelerde ifade edilir (Tolle ve ark., 2008). Buna karşılık, GABARAP ekspresyonunun endokrin bezlerde çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. İlginç bir şekilde, ATG8/LC3 ailesi üyeleri arasında LC3C ekspresyonu, yüksek oranda eksprese edildiği akciğer haricinde incelenen neredeyse tüm dokularda nispeten düşük bulunmuştur (Sagiv ve ark., 2000). Bireysel ATG8/LC3 proteininin ifadesinin transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası veya post-translasyonel düzeyde düzenlendiği öne sürülmüştür (Feng ve ark., 2015).

LC3'ün sitozolik formu (LC3-I) ve LC3-II'de olduğu gibi, tüm ATG8/LC3 proteinleri sitozolik veya membrana bağlı olmak üzere iki şekilde bulunur, bu da ATG8/LC3 ailesi üyelerinin işlenmesinin korunduğunu göstermektedir (Şekil 2.60.). Otofaji ilişkili gen 8/LC3 proteinleri ATG4 proteinleri tarafından işlenir ve memeli ATG8/LC3 paraloglarının varlığıyla tutarlı olarak, ATG4'ün birden fazla homologu vardır. Otofaji ilişkili gen 4A, GABARAP ve GABARAPL2 için spesifikken, ATG4B'nin farklı yakınlıklara rağmen tüm ATG8/LC3 ailesi üyelerinin işlenmesinde rol oynadığı görülmektedir (Lee ve Lee, 2016).

ATG8/LC3 ailesinin otofajideki fizyolojik işlevleri: LC3 hem çekirdeğe hem de sitozole lokalizedir, bu da proteinin iki hücrel kompartman arasında geçiş

yapabildiğini gösterir. Son çalışmalar, açlık sırasında LC3'ün Sirt1 (Sirtuin 1) tarafından deasetilasyonunun ve LC3'ün nüklear tümör proteini TP53INP2 (p53 indüklenebilir nüklear protein 2) ile birleşmesinin, LC3'ün çekirdekten sitosole yeniden dağılımını teşvik ettiğini ve burada otofagozomları oluşturmak için ATG7 ve otofaji çekirdeklenme mekanizması ile birleştiğini göstermiştir (Huang ve ark., 2015).

Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3) ve GABARAP proteinleri, serin-treonin kinazlar ULK1/2, ATG13 ve FIP200 ile ilişkili oldukları ve ULK kompleksinin montajı için iskele görevi gördükleri düşünülmektedir (Alemu ve ark., 2012). İlginç bir şekilde, GABARAP, LC3 alt ailesine kıyasla ULK kompleksi için bir bağlanma tercihi sergilemektedir (Alemu ve ark., 2012). Daha yakın zamanda, açlıkla indüklenen otofaji sırasında, GABARAP'nin sentrozomdan (ancak LC3, GABARAPL1 veya GABARAP2 değil) özellikle ULK aktivasyonunu teşvik ettiği ve bunun ardından WAC (sarmal bobinli WW etki alanı içeren adaptör) ve GM130 (130 kDa'lık Golgi matriks proteini) proteinlerinin düzenlenmesi yoluyla otofagozom oluşumunda hiyerarşik olmayan işleve aracılık ettiği bildirilmiştir (Joachim ve ark., 2015). Dahası, MAPK15/ERK8, LC3 ve GABARAP proteinleriyle etkileşime girerek otofajiyi uyarır, bu da MAPK15/ERK8'in LC3 ve GABARAP'yi otofagozom oluşum bölgesine toplayarak işlev gören otofagozom oluşumunun yukarı yönlü bir düzenleyicisi olduğunu gösterir (Colecchia ve ark., 2012). Maya Atg8'in kullanıldığı çalışmalara dayanarak, ATG8/LC3'ün otofagozom biyogenezi sırasında otofagozomun membran füzyonunu, uzamasını ve kapanmasını teşvik edebileceği açıktır (Feng ve ark., 2014). Memeli hücrelerinde ATG4B'nin kinaz-ölü mutantının ekspresyonu, kapanmamış otofagozomal öncesi membran yapılarının birikmesine yol açarak memeli homologlarının izolasyon membranının kapanmasına ve otofagozom oluşumuna katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Fujita ve ark., 2008). Bununla birlikte, her ATG8/LC3 ailesi üyesinin spesifik siRNA'lar kullanılarak devre dışı bırakıldığı deneyler, her ATG8/LC3 proteininin otofagozom oluşumunun farklı bir adımını düzenlediğini göstermiştir. Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3, izolasyon membranının uzama adımı aracılık ederken, GABARAP ve GABARAPL2, sızdırmazlık veya füzyon gibi otofagozom oluşumunun sonraki adımlarında yer almaktadır (Weidberg ve ark., 2010). Daha yakın zamanda, PI4K2A'nın (fosfatidilinositol 4-kinaz tip 2 alfa, PI4KII α olarak da kısaltılır)

otofagozomlara GABARAP aracılı hedeflenmesinin PtdIns4P'ye bağılı otofagozom-lizozom füzyonunu düzenlediğı ve böylece GABARAP'nin otofagozomların olgunlaşmasındaki rolünü desteklediğı bildirilmiştir (Albanesi ve ark., 2015). Ayrıca, LC3/GABARAP proteinlerinin PLEKHM1 (Pleckstrin homoloji alanı içeren protein ailesi üyesi 1) ile ilişkili olduğı ve HOPS (homotipik füzyon ve vakuol protein sıralaması) kompleksi aracılığıyla otofagozom-lizozom füzyonunu düzenlediğı bildirilmiştir (McEwan ve ark., 2015). İlginç bir şekilde, GABARAPL2 ve GABARAP proteinlerinin hem enzimatik hem de kimyasal olarak lipidlenmiş formlarının, kapsamlı membran bağlama ve füzyonu teşvik ettiğı gösterilirken, LC3'ün lipidlenmiş formları benzer işlevi çok daha az ölçüde gerçekleştirmiştir. Bu bulgu, LC3 alt ailesine kıyasla membran füzyonunda GABARAP alt ailesi için tercihli bir rol olduğunu göstermektedir (Engedal ve Seglen, 2016). Dahası, LC3 dolaylı olarak otofagozomun lizozom ile füzyonu için hücre içi trafiğini düzenler. Rab7 (Geç endositik membranın küçük GTPaz düzenleyicisi) ve etkileşimli proteini FYCO1'in (FYVE ve sarmal bobin alanı içeren protein 1) LC3 ve kinesin motor proteinleri ile etkileşime girerek otofagozomların lizozomlara taşınmasını düzenlediğı bilinmektedir (Pankiv ve ark., 2010).

Otofaji ilişkili gen 8 (ATG8)/LC3, diğer Atg çekirdek proteinleri gibi transkripsiyonel, post-transkripsiyonel veya post-translasyonel düzeyde sıkı bir şekilde düzenlenebilir. Son zamanlarda, ATF4 (aktive edici transkripsiyon faktörü 4), CEBP β (CCAAT-geliştirici-bağlayıcı protein β), CHOP (C/EBP homolog protein), E2F1 (E2F Transkripsiyon Faktörü 1), FOXO 1/3, GATA1 (GATA Bağlayıcı Protein 1 veya Globin Transkripsiyon Faktörü 1) gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri, Jun, TFEB (transkripsiyon faktörü EB), SREBF2/SREBP2 (sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2) ve ZKSCAN3 (KRAB ve SCAN alanlarına sahip çinko finger proteini 3) ATG8/LC3 ailesinin yanı sıra diğer Atg genlerinin transkripsiyonel düzenleyicileri olarak bildirilmiştir (Feng ve ark., 2015). İlginç bir şekilde, bu transkripsiyon faktörleri arasında sadece GATA1'in (lizozom biyogenezi ve işlevinde yer alan genleri aktive eder) hematopoez sırasında ATG8/LC3 ailesini düzenlediğı rapor edilmiştir (Kang ve ark., 2012).

Post-translasyonel modifikasyonlar arasında ATG8/LC3 ailesi üyelerinin fosforilasyonu ve asetilasyonunun varlığı bildirilmiştir. Mikrotübülle ilişkili protein

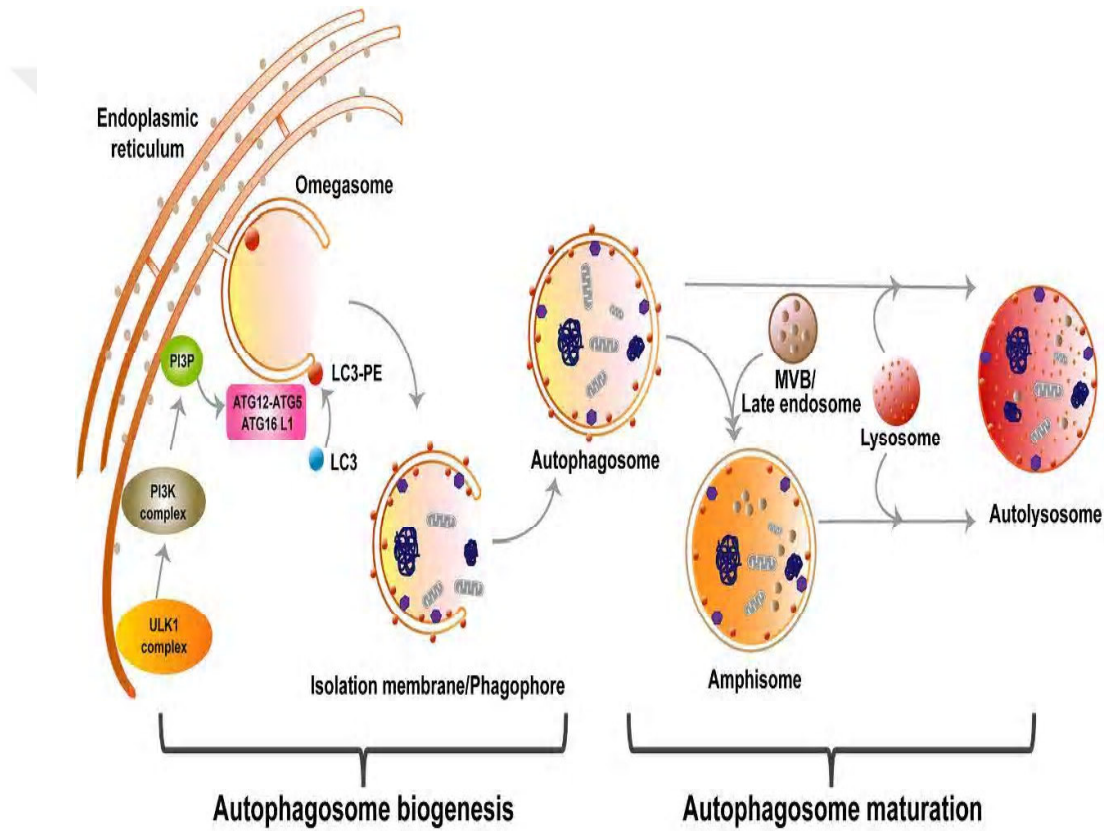
1A/1B-hafif zincir 3 ek varyantının N-terminusunun protein kinaz A (PKA) tarafından fosforilasyonunun otofaji indüksiyonu üzerine negatif olarak düzenlendiği bilinmektedir (Cherra ve ark., 2010). Daha yakın zamanda, hippo kinaz STK3'ün (Serin/treonin kinaz 3) LC3'ü fosforile ettiği ve lizozom ile otofagozom füzyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Wilkinson ve ark., 2015). Mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3'ün EP300 (E1A bağlayıcı protein 300/p300) tarafından asetilasyonu ve deasetilasyonun da otofajik aktiviteyi modüle edebileceği ileri sürülmüştür. Buna göre LC3'ün deasetilasyonu otofajiyi teşvik ederken, asetilasyon otofajik süreci inhibe eder (Lee ve Finkel, 2009). Diğer temel otofaji proteinlerinin ubiquitinasyonu ve SUMOilasyonu (Küçük Ubiquitin benzeri düzenleyici) gibi diğer post-translasyonel modifikasyonlar da kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Memeli otofajisinin rolü hakkında derinlemesine bir anlayış kazanmak için her ATG8/LC3'ün transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası ve post-translasyonel düzeyde spasyotemporal düzenlemesi üzerine daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

d) Rastgele veya seçici hedeflerin yakalanması, otofagozomun lizozomla kaynaşması, ardından yutulan moleküllerin lizozomal proteazlar tarafından proteolitik bozunması

Fagofor genişler ve sitozolik bileşenleri tutar, sonunda kapanarak çift membranlı bir vezikül olan otofagozom haline gelir. Otofagozom daha sonra endozomlarla birleşerek bir "amfizom" haline gelir, bu da geç endozomlar (LE) ve lizozomlarla birleşerek bir "otolizozom" veya "otofagolizozom" 'a dönüşür (Wirth ve ark., 2013). Membran füzyonu, SNARE (çözünür NSF bağlanma protein reseptörü) proteinlerinin (örn. STX17 (sintaksin 17), VAMP8 (Vezikülle ilişkili membran proteini 8)), HOPS kompleksinin, lizozomal membran proteinlerinin (örn. LAMP2) ve RAB GTPazlarının (örn. RAB5, RAB7) kontrolü altındadır (Lorincz ve Juhasz, 2020). Dyneinler gibi taşıma proteinleri, otofagozomların mikrotübüller boyunca lizozomlara veya LE'lere doğru hareketinde rol oynar (Kast ve Dominguez, 2017).

Otofagozomlar, amfizomlar ve otolizozomların tanımı morfolojilerine değil işlevlerine dayanmaktadır. Bu nedenle, bu yapıları elektron mikroskopu ile ayırt etmek her zaman kolay değildir. Bu gibi durumlarda, tüm otofajik yapıları kapsadığı için "otofajik vakuoller" terimi kullanılabilir. Alternatif olarak, başlangıç otofajik

vakuoller (AVi), ara otofajik vakuoller (AVi/d) ve bozunan otofajik vakuoller (AVd) gibi morfolojik tanımlar kullanılabilir ve bunlar kabaca otofagozomları, amfizomları ve otolizozomları temsil eder. Otofajik vakuollerin ortalama yarı ömrü yaklaşık 10 dakika olarak görünmektedir (Mizushima,2007). Füzyonun ardından, hapsedilen substratlar, çok çeşitli biyolojik polimerleri (proteinler, lipitler, polisakkaritler ve nükleik asitler) parçalayabilen lizozomal asit hidrolazlar tarafından tutulur. Metabolik ürünler (yani amino asitler, yağ asitleri, basit karbonhidratlar ve nükleositler), hücre metabolizması için gerekli olan metabolit havuzunu korumak için sitozole geri dönüştürülür (Yim ve Mizushima, 2020) (Şekil 2.61.).



Şekil 2.61. Otofagozom biyogenezi ve olgunlaşması. Otofagozom biyogenezi, ER membranının yüzeyinde omegazom oluşumundan başlayarak çok sayıda moleküler makinenin dahil olduğu aşamalı bir süreçtir. Bu çift membranlı omegazom daha sonra hasarlı hücresel bileşenler, protein agregatları ve kusurlu mitokondri gibi kargoları içine alan bir izolasyon membranı/fagofor oluşturmak üzere büyür ve nihayetinde bir otofagozom haline gelmek üzere içine alınır. Otofagozomlar oluşturulduktan sonra, lizozomlarla kaynaşarak olgunlaşır ve lizozomal hidrolazların aktivitesi yoluyla tutulan kargoların parçalandığı otolizozomlara dönüşür. Lizozomlarla füzyondan önce, otofagozomlar genellikle ara/melez bölmeler-amfizomlar oluşturmak için çoklu veziküler cisimler (MVB'ler)/geç endozomlar (LE'ler) ile etkileşime girerek aşamalı bir olgunlaşma sürecinden geçer (Cai ve Ganesan, 2022).

Genel olarak, otofaji sitosolü ayırım gözetmeksizin yutuyor gibi görüldüğünden rastgele bir süreç olarak tanımlanmıştır. Nitekim elektron mikrograflarda sıklıkla mitokondri, ER ve Golgi membranları da dahil olmak üzere çeşitli içeriklere sahip otofagozomlar görülmektedir (Eskelinen, 2008). Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar büyüyen fagofor membranının protein agregatları ve organellerle seçici olarak etkileşime girebileceğine dair kanıtlar ortaya koymaktadır. Fagoforda bir 'reseptör' olarak hareket eden LC3-II'nin, hedef üzerindeki 'adaptör' moleküllerle (örneğin protein agregatları, mitokondri) etkileşime girerek bunların seçici olarak alınmasını ve parçalanmasını teşvik ettiği öne sürülmektedir (Noda ve ark., 2010; Weidberg ve ark., 2011).

Otofaji ile ilişkili gen 8 (ATG8)/LC3 ailesi seçici otofaji sırasında otofaji reseptörleri ile spesifik etkileşimler yoluyla otofagozomlara kargo tanıma ve seçici hedeflemede kapsamlı bir role sahiptir (Birgisdottir ve ark., 2013; Wild ve ark., 2014). Otofaji reseptörleri, ATG8/LC3 proteinlerinin ubikuitin-1 (Ub1) alanı ile ilişkiye aracılık eden bir LIR (LC3 ile etkileşen bölge) motifine sahiptir. Bu motif genellikle protein agregatları, hasarlı mitokondriler veya peroksizomlar gibi ubikuitine kargoları tanıır ve bunları otofagozomlara hedefler. Seçici otofaji reseptörleri arasında şunlar bulunur:

- i) protein agregatları için NBR1 [BRCA1 (Meme kanseri geni 1) gen 1 proteininin komşusu]] ve SQSTM1/p62,
- ii) hücre içi patojenler için NDP52 (52 kDa'lık nükleer nokta protein) ve optinöyirin,
- iii) hasarlı mitokondriye otofajik makinenin yerleştirilmesi için dış mitokondriyal membran proteinlerini tanımak üzere Nix, BNIP3 (BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa proteinle etkileşen protein 3), BNIP3L (BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa proteinle etkileşen protein 3-benzeri) ve FUNDC1 (Fun14 etki alanı içeren 1) (Slobodkin ve Elazar, 2013; Kalvari ve ark., 2014).

Otofaji ile ilişkili gen 8 (ATG8)/LC3 proteinleri ile seçici otofaji reseptörleri arasındaki ilişkide belirli ölçüde özgüllük mevcuttur, ancak özgüllüğün altında yatan mekanizma henüz anlaşılamamıştır. Örneğin, NDP52, GABARAP veya GABARAPL yerine LC3C'ye tercihli bağlanma gösterir; oysa BNIP3L, LC3 yerine tercihli olarak

GABARAPL1 ile ilişkilidir. GABA tip aminobütirik asit reseptörü ilişkili proteininin ALFY'ye (otofaji bağlantılı FYVE proteini) bağlanması, seçici bağlanma ve ALFY'nin LC3B-pozitif yapılara alınması için gereklidir (Lystad ve ark., 2014). GABA tip aminobütirik asit reseptörü ilişkili proteini, birden fazla E2-konjugasyon enzimi ile etkileşime girebilen E3 ubikitin ligaz Mulan ile ilişkisi yoluyla mitofajiyi düzenler (Ambivero ve ark., 2014). GABA tip aminobütirik asit reseptörü ilişkili proteini (GABARAP)/LC3B /GABARAPL1, Wnt yolunu negatif olarak düzenleyen Dvl2 (Dishevelled2) ile ilişkilidir (Gao ve ark., 2010).

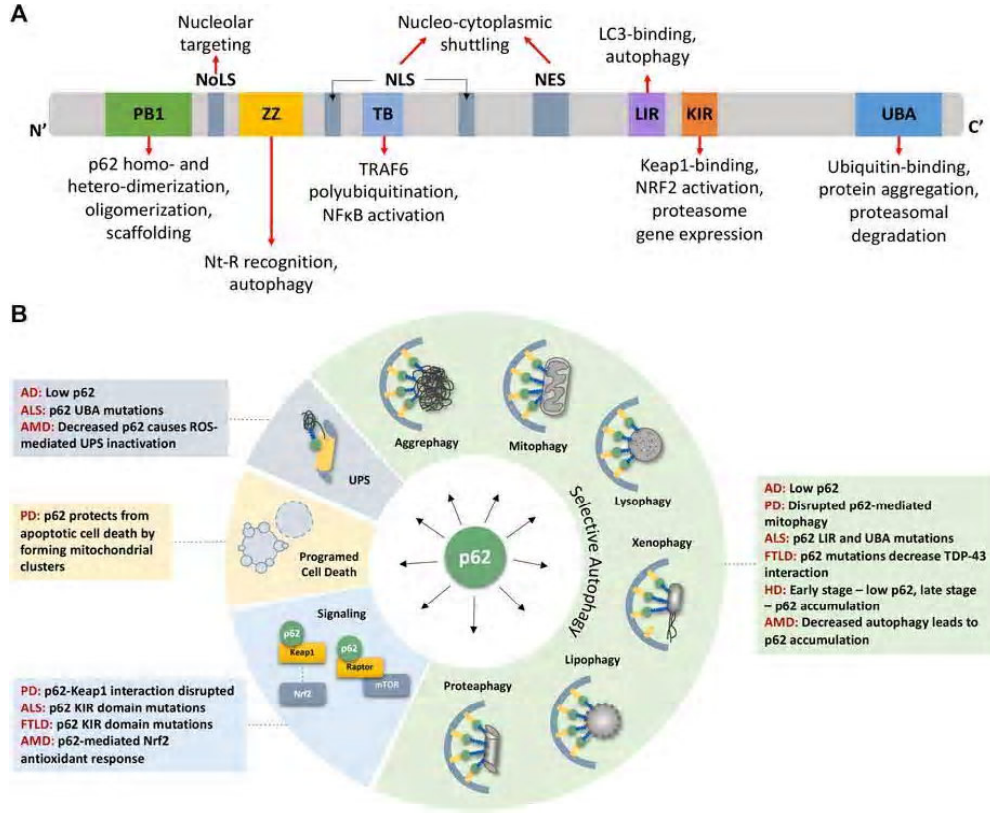
Sekestozom 1 (SQSTM1/p62) metazoa'da korunan ancak bitki ve mantarlarda korunmayan, her yerde ifade (eksprese) edilen bir hücresel protein olup en iyi bilinen seçici otofaji reseptörlerinden biridir (Björkøy ve ark., 2005; Pankiv ve ark., 2007), ancak aynı zamanda ubikitin-proteazom sistemi, hücresel metabolizma, sinyalizasyon ve apoptozda da rolleri vardır. Sekestozom 1 proteini (p62), en çok agregafaji yoluyla protein agregatlarının temizlenmesindeki rolüyle bilinir, ancak son zamanlarda mitofaji ve lipofaji gibi diğer seçici otofaji formları için bir reseptör olarak ortaya çıkmıştır (Kumar ve ark., 2022).

Sekestozom 1 proteini (SQSTM1/p62), otofagozomun oluşumu, ubikuitinlenmiş proteinlerin proteazoma iletilmesi ve otofajik temizleme için agregat oluşumu dahil olmak üzere birçok işlev için bir entegrasyon merkezi olarak hizmet eder (Liu ve ark., 2016). Ayrıca çeşitli sinyal yollarında da yer alır. Sekestozom 1 proteini, NFKB/NFκB (B-hücrelerinde kappa hafif polipeptit gen arttırıcı nükleer faktör) aktivasyonu, sinir büyüme faktörü sinyali ve kaspaz aktivasyonu gibi çeşitli hücresel sinyal yollarında bir iskele merkezi olarak görev yapar (Komatsu ve ark., 2012; Wooten ve ark., 2006).

Sekestozom 1 proteini (p62/SQSTM1), farklı işlevlere sahip çeşitli proteinlerle etkileşime giren çok sayıda korunmuş etki alanına sahiptir (Şekil 2.62.). N-terminalinden C-terminaline kadar bu alanlar arasında p62 homo- ve heterodimerizasyon ve oligomerizasyon için Phox ve Bem1 (PB1) alanı (Christian ve ark., 2014; Ciuffa ve ark., 2015; Moscat ve ark., 2006; Nakamura ve ark., 2010; Turco ve ark., 2021), otofajik substratlarda N'-uç degronları tanıyan ZZ alanı (Cha-Molstad ve ark., 2017; Kwon ve ark., 2018), TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) bağlayıcı

alan (TB) (Wooten ve ark., 2005), LC3 ve KEAP1 (Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1) etkileşimli bölgeler (sırasıyla LIR (LC3 ile etkileşime giren bölge) ve KIR) (Ichimura ve ark., 2013; Pankiv ve ark., 2007) ve ubiquitin bağlayıcı alan (UBA) (Isogai ve ark., 2011) yer alır. Evrimsel olarak korunmuş PB1 protein alanı, yaklaşık 80 amino asitten oluşan bir protein-protein etkileşim alanıdır ve bir dizi sitoplazmik sinyal proteininde bulunur (Terasawa ve ark., 2001). Sekestozom 1 proteini, kendi kendine etkileşim ve ubiquitin bağlama alanları aracılığıyla ubiquitinlenmiş agregatların oluşumunu ve parçalanmasını kolaylaştıran bir iskele proteini olarak görev yapar (Lee ve ark., 2017). Ubikuitinlenmiş proteinlerin otofajik yıkımı, p62'nin bunları inklüzyon cisimciklerine ayırmasını gerektirir. Bu özelliğe p62'nin UBA alanının yanı sıra homo-oligomerizasyonu kolaylaştıran bir PB1 alanı da aracılık eder (Bjorkoy ve ark., 2005; Itakura ve Mizushima, 2011).

Sekestozom 1 (SQSTM1/p62), LC3 ile etkileşime giren bölgesi (LIR) aracılığıyla MAP1LC3/LC3 ile de etkileşime girer (Noda ve ark., 2010; Weidberg ve ark., 2011). Ayrıca, SQSTM1/p62'nin kendisi sadece fagofor membranına değil, LC3 bağlanmasından bağımsız olarak bile otofagozom oluşum bölgesine yer değiştirebilir (Itakura ve Mizushima, 2011). Bu nedenle, SQSTM1/p62 seçici olarak otofagozoma dahil edilir ve ardından bozunur (Björkøy ve ark., 2005; Pankiv ve ark., 2007). Buna göre, SQSTM1/p62 otofajik akışın bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Klionsky ve ark., 2012; Mizushima ve ark., 2010).



Şekil 2.62. SQSTM1/p62 alanları, çok yönlü doğası ve yaşa bağlı dejeneratif hastalıklarla ilişkili zararlar üzerindeki etkisi. (A) SQSTM1/p62 proteini çeşitli proteinlerle etkileşime giren iyi karakterize edilmiş birkaç alandan oluşur. (B) SQSTM1/p62 çeşitli seçici otofaji biçimlerinde, Ubikuitin-Proteazom Sistemi'nde (UPS), programlanmış hücre ölümünde ve sinyal yollarında rol oynar. Bu işlevler, yaşa bağlı çeşitli dejeneratif hastalıklarda mutasyonlar veya SQSTM1/p62'nin anormal ekspresyonu/birikimi nedeniyle bozulur. AD: Alzheimer Hastalığı, ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz, AMD: Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu, FTL: Frontotemporal Lobar Dejenerasyon, HD: Huntington Hastalığı, NES: Nükleer Dış Aktarım Dizisi, NLS: Nükleer Lokalizasyon Dizisi, NoLS: Nükleolar Lokalizasyon Dizisi, PD: Parkinson Hastalığı (Kumar ve ark., 2022).

Ubikuitin-Proteazom Sistemi (UPS) ve otofaji, iki ana hücre içi bozunma yoludur ve SQSTM1/p62, bu yollar arasındaki karşılıklı etkileşimin önemli bir aracıdır (Liu ve ark., 2016). Proteozom inhibisyonu, insanlarda S403'te p62 fosforilasyonunu teşvik eden proteotoksik strese yol açar. Bu, p62 kümelerindeki ubikuitinlenmiş proteinleri stabilize eder ve bunların otofaji ile temizlenmesini destekler (Lim ve ark., 2015; Matsumoto ve ark., 2011). Uzun süreli proteazomal inhibisyon ve ubikitin aşırı ekspresyonu, otofajiyi aktive eden ubikitinlenmiş p62 birikimine neden olur (Peng ve ark., 2015). Ubikuitin-Proteazom sistemi (UPS) gibi, otofajinin inhibe edilmesi de p62 birikimine neden olur, ancak bu birikim ubikitine proteinlerin proteazoma iletilmesini geciktirir ve böylece UPS yoluyla akışı azaltır (Korolchuk ve ark., 2009).

Otofaji inhibisyonu, p62'nin özellikle açlık sırasında yaygın olan ubiquitinlenmiş proteazomları tanıdığı ve bunları otofajik bozunma için hedeflediği proteafajiyi etkileyerek proteazomal işlevi de bozabilir (Cohen-Kaplan ve ark., 2017; Marshall ve ark., 2016). Her ne kadar p62 öncelikle hasarlı materyalin agregasyona bağlı olarak temizlenmesini gerçekleştirse de otofaji inhibisyonu sırasında veya proteostaz baskılandığında patolojik agregasyonu ve proteotoksisiteyi şiddetlendirerek zararlı hale gelebilir. Sekestozom hem proteazomal yıkım hem de otofaji için substrat sağlayan önemli bir reseptör olduğundan, p62 seviyelerindeki ve işlevindeki değişiklikler UPS ve otofaji aktivitesini etkileyebilir (Kumar ve ark., 2022). Sekestozomun ekspresyon düzeyi, bazal otofaji tarafından sürekli olarak parçalanarak sıkı bir şekilde düzenlenir. Otofajinin bozulması, SQSTM1/p62'nin büyük miktarda birikmesine ve ardından SQSTM1/p62 ve ubiquitinlenmiş proteinler içeren agregatların oluşmasına neden olur (Komatsu ve ark., 2007a). Sekestozomun birikmesi, en azından karaciğerde toksiktir, çünkü fazla SQSTM1/p62, NFE2L2/Nrf2 (nükleer faktör, eritroid 2 benzeri 2) için ubiquitin ligaz kompleksinin bir bileşeni olan KEAP1'i tutarak NFE2L2 hedef genlerinin transkripsiyonunun uygunsuz aktivasyonuna neden olur (Komatsu ve ark., 2010; Lau ve ark., 2010). Tersine, otofaji açlık tarafından yukarı doğru düzenlendiğinde, SQSTM1/p62 hızla bozulur ve toplam ekspresyon seviyesi azalır (Björkøy ve ark., 2005; Ichimura ve ark., 2008; Mizushima ve Yoshimori, 2007). Sahani ve ark. (2014), SQSTM1/p62 seviyelerinin uzun süreli açlık sırasında (yani, sürekli otofaji durumunda) nasıl düzenlendiği araştırmışlardır. Bu araştırmacılar SQSTM1/p62 seviyelerinin ilk birkaç saat içinde azaldığını, ancak uzun süreli açlık sırasında bazal seviyelere geri döndüğünü göstermişlerdir. Bu restorasyonun mTORC1 reaktivasyonundan bağımsız olduğunu, ancak SQSTM1/p62'nin transkripsiyonel yukarı regülasyonunu ve de novo protein sentezini gerektirdiğini, ayrıca, otofaji-lizozom yolundan türetilen amino asitlerin uzun süreli açlık sırasında SQSTM1/p62 sentezi için kullanıldığını tespit etmişlerdir (Sahanive ark., 2014).

p62 ayrıca en çok stres ve yaşlanma ile ilgili olan mTORC1 yolağı tarafından amino asit algılamasına katılır. Sekestozom, amino asit seviyelerini algılayan ve mTORC1'i aktive eden mTORC1 kompleksinin bileşenleri, RAPTOR ve Rag GTPazları ile ilişkilidir (Duran ve ark., 2011). Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1

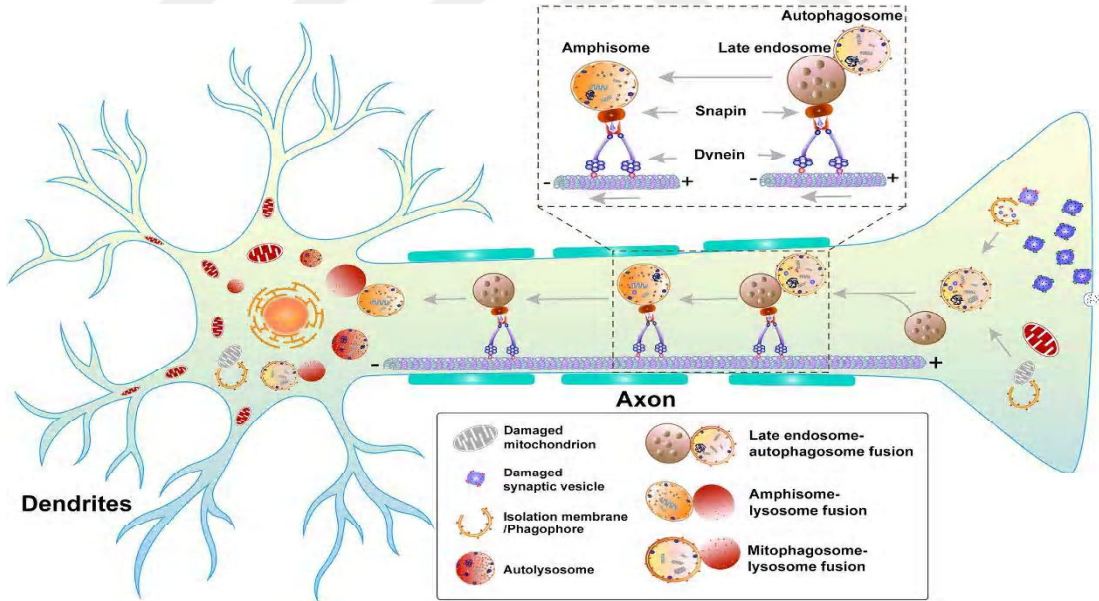
sinyali otofajiyi düzenlediğinden, p62 mTORC1 sinyalinin ince ayarını yaparak otofaji ve hücre büyümesi arasındaki dengeyi etkileyebilir (Komatsu ve ark., 2012; Moscat ve Diaz-Meco, 2011). Hücre büyümesi ve otofajiyi yöneten sinyal yollarına katılımı sayesinde p62, tümör başlangıcı ve ilerlemesinde önemli bir oyuncudur (Hennig ve ark., 2021; Moscat ve ark., 2016). Genel olarak, çok yönlü doğası ve büyüme ve hayatta kalma mekanizmalarını modüle etme yeteneği sayesinde p62, hücrel stres, yaşlanma ve metabolik ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli patolojilerde önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2.62.).

Nöronlar, duyuşsal algı, düşünce ve davranıştan sorumlu özel işlevleri yerine getirmekle görevli hücrelerdir. Saniyede 50 darbeye varan hızlarda elektriksel impulslar üreterek haberleşirler (Harris ve Attwell, 2012) ve bu aktiviteyi 80-90 yıllık bir ömür boyunca sürdürmek zorundadırlar. Sonuç olarak, nöronal proteinler ve organeller aşırı kullanıma ve hasara karşı savunmasıdır (Cajigas ve ark., 2010; Wang ve ark., 2017). Bu nedenle protein kalite kontrolü, özellikle de anormal yapıdaki proteinlerin ortadan kaldırılması, bölünmeyen sinir hücrelerinin homeostazının korunmasında önemli bir role sahiptir. Otofajinin birçok organizmada birincil rolü açlığa adaptasyon olsa da otofajinin özellikle nöronlarda sitoplazmik içeriklerin normal dönüşümü için önemli olduğu ve bir dizi nörodejeneratif hastalığın gelişimine karşı koruyucu bir role sahip olduğu bilinmektedir (Ariosa ve Klionsky, 2016; Hu ve ark., 2015; Kulkarni ve Maday, 2018; Yamamoto ve Yue, 2014). Beyinde, otofajinin gelişim ile yaşam süresi boyunca fizyolojik ve patolojik işlevleri bugüne değin yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Örneğin farelerde ve insanlarda nörodejenerasyonun nedenleri arasında otofajideki kusurların bulunduğu (Kulkarni ve ark., 2018), otofajinin nöronların hayatta kalması için gerekli olduğu ve bazal otofaji eksikliği olan nöronlarda ubikuitinlenmiş proteinlerin inklüzyon cisimcikleri olarak biriktiği ve bazal otofaji eksikliğinin nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir (Komatsu ve ark., 2006; Hara ve ark., 2006). Otofajinin ayrıca akson terminallerinde uygun membran dönüşümü (Komatsu ve ark., 2007b) ve NSC'ler yeni nöronların üretimi olan nörogenez için de gerekli olduğu ve otofagazom oluşum aşamalarının her biri sırasında gerekli olan otofaji ile ilişkili anahtar proteinlerin yetişkin nörogenezinin düzenlenmesinde rol oynadığı (Dhaliwal ve ark., 2017; Ha ve ark., 2015; Hara ve ark., 2006; Komatsu ve ark., 2006; Menzies ve ark., 2017; Nixon,

2013; Wang ve ark., 2013; Wang ve ark., 2017; Wu ve ark., 2015; Xi ve ark., 2016; Yamamoto ve Yue, 2014; Yazdankhah ve ark., 2014; Yu ve ark., 2008) ortaya konmuştur. Nöronlarda otofajik yolağın herhangi bir aşamasındaki bozulmanın genellikle, aksonal bozukluklarla kendini gösteren ve nöronal dejenerasyonda doruğa çıkan anormal nöronal homeostaz ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (Nixon ve Yang, 2012). Örneğin; otofaji için gerekli olan nöron spesifik genlerin tükenmesi, farelerde akson dejenerasyonuna ve nöron ölümüne neden olmaktadır (Komatsu ve ark., 2007b; Nishiyama ve ark., 2007). Bununla birlikte, beyindeki nöronların farklı alt türlerinin otofajik yola bağlılık dereceleri farklıdır ve otofajik sürecin bozulmalarına farklı şekilde savunmasızdırlar (Nikoletopoulou ve ark., 2015). Otofajinin presinaptik ve postsinaptik terminallerde sinaptik fonksiyonu düzenleyebildiği, anormal otofajik vezikül şekillenmesinin, presinaptik terminalleri bozduğu ve aksonal distrofiye neden olduğu (Sanchez-Varo ve ark., 2012; Shen ve ark., 2015), ayrıca sinaptik plastisitede yer aldığı (Shehata ve ark., 2012) bilinmektedir. Bunların yanı sıra beyinde otofajinin aşırı aktivasyonunun nöronal ölüme sıradışı bir ölüm yolu olduğu, ancak otofajinin yetersizliğinin, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda nöronların kaybına neden olan lizozoma bağlı hücre ölümü formuyla bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Nixon ve Yang, 2012).

Otofagozom biyogenezinin belirgin zamansal ve mekânsal özgüllüğe sahip bir süreç olduğu öne sürülmüştür. Nöronların soması, lizozomlar dahil olmak üzere degradatif organellerin esas olarak bulunduğu degradatif yolun birincil bölgesidir. Bununla birlikte, güçlü otofagozom biyogenezi ağırlıklı olarak distal aksonlarda tespit edilebilir (Maday ve ark., 2012; Maday ve ark., 2014; Stavoe ve ark., 2016). Bu nedenle, nöronlar, somadaki lizozomlar içinde temizlenmeleri için distal aksonlardan sekestre edilmiş kargolar içeren bu otofagozomları verimli bir şekilde çıkarmak için benzersiz zorluklarla karşılaşır. Bu uzamsal özgüllüğü belirleyen faktörler henüz belirlenmemiş olsa da akson terminallerindeki her biyogenez olayının dakikalar içinde gerçekleştiği ve bileşenlerin öngörülebilir kinetiklerle işe alındığı görülmekte ve bu da yüksek zamansal özgüllüğe işaret etmektedir (Maday ve ark., 2012; Maday ve ark., 2014; Stavoe ve ark., 2016) (Şekil 2.63.). Daha önceki çalışmalar, kültürlenmiş embriyonik periferik nöronların aksonlarında membranöz organellerin retrograd hareketini ortaya çıkarmış ve bu organeller EM analizi ile ultrastrüktürel düzeyde

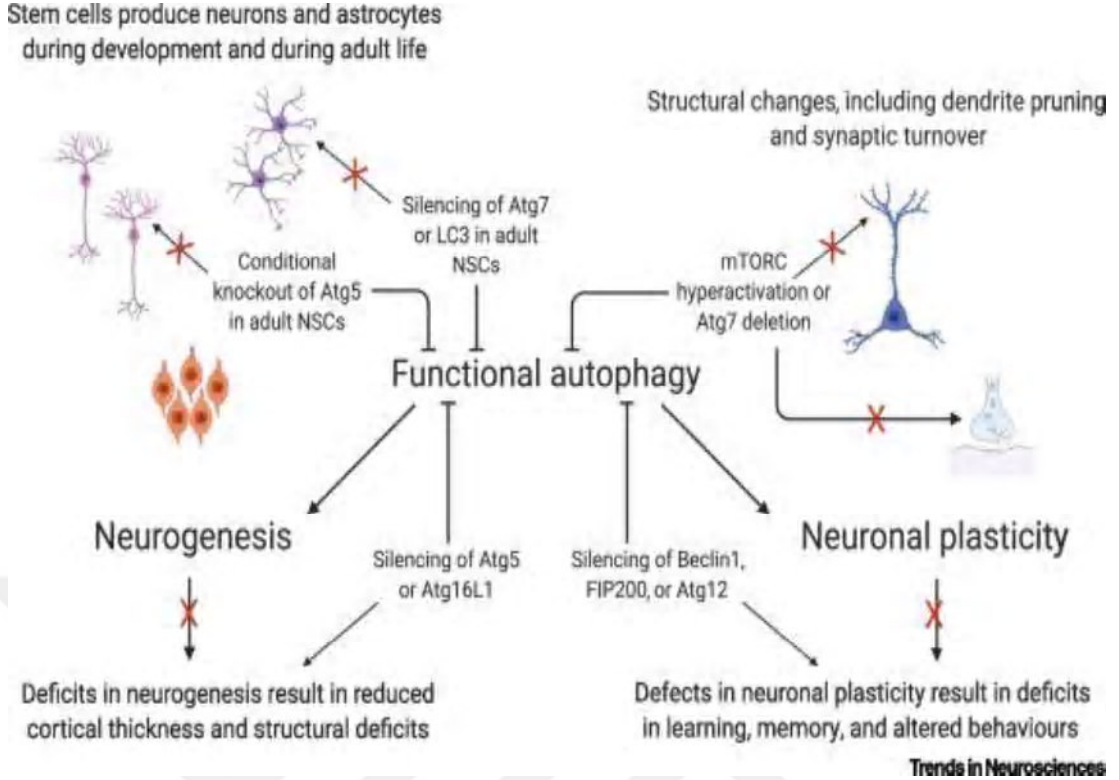
multilamellar yapı olarak ortaya çıkmış ve büyük olasılıkla AV'leri temsil ettiklerini düşündürmüştür (Hollenbeck, 1993). Ayrıca, otofagozomların dinamik retrograd taşınımını gösteren doğrudan kanıtlar, son zamanlarda sıçanlardan alınan dorsal kök ganglion (DRG) nöronları (Cheng ve ark., 2015) (Şekil 2.63.), birincil fare embriyonik kortikal nöronları (Lee ve ark., 2011) ve GFP'ye kaynaşmış otofagozomal işaretleyici LC3'ü ifade eden transgenik bir fareden kültürlenmiş DRG nöronları (Maday ve ark., 2012) kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalarla sağlanmıştır. Otofagozom biyogenez olayları distal aksonlarda tutarlı bir şekilde tespit edilebilir ve ilk fagofor membranının sürekli büyümesini ve LC3 lipidasyonunu koordine eden çok alt birimli komplekslerin katılımını içerir (Cheng ve ark., 2015; Maday ve ark., 2014; Wallot-Hieke ve ark., 2018). Nöronlarda tespit edilen otofagozom montajı, nöronal olmayan hücrelerdekine çok benzese de otofagozom oluşumu nöronlarda yapısal olarak aktiftir ve bazal ve büyümeyi teşvik eden koşullar altında sabit kalır (Cheng ve ark., 2015; Lee ve ark., 2011; Maday ve ark., 2012; Maday ve ark., 2016), bu da otofajinin nöronlarda temel bir homeostatik mekanizma olarak hareket ettiği fikrini desteklemektedir.



Şekil 2.63. Nöronlarda otofaji mekanizması. Nöronlardaki otofaji yolu, belirgin zamansal ve mekansal özgüllük sergiler. Olgun lizozomlar ağırlıklı olarak nöronların somasında bulunurken, hasarlı sinaptik bileşenlerin ve işlevsiz mitokondrilerin tutulduğu otofagozomlar sinaptik bütünlüğü ve işlevi korumak için gerekli olan korunmuş bir yol aracılığıyla sinaptik terminallerde yapısal olarak üretilir. Yeni oluşan otofagozomlar geç endozomlar (LE) ile birleşir ve daha sonra mikrotübül bazlı sitoplazmik dinein-Snapin motor-adaptor kompleksi tarafından lizozomal temizleme için akson boyunca somaya doğru hızlı ve verimli bir şekilde taşınır (retrograd taşıma) (Cai ve Ganesan, 2022).

Artan kanıtlar, otofajinin hem gelişimsel hem de yetişkin nöral kök hücre bakımı, çoğalması ve farklılaşması için gerekli olduğunu göstermektedir (Şekil 2.64.). İlk kanıtlar, fetal Nöral kök/projenitör hücrelerin (NSPC) nöronal farklılaşması sırasında otofajik proteinlerin arttığını gösteren çalışmalardan gelmiştir. Örneğin, ön beyinden türetilen NSPC'lerde Atg9a seviyelerinin ve otofajinin bir göstergesi olan LC3-II/LC3-I oranının nörogenez sırasında yükseldiği tespit edilmiştir (Morgado ve ark., 2015). Nöronal farklılaşmanın ilk dönemi olan embriyonik gelişimin E15.5'gününde fare embriyonik OB'de otofaji genleri Atg7, Beclin 1, Ambra1 ve LC3'ün ekspresyonunda in vivo bir artış ve nöronal belirteçlerde de paralel bir artış olduğu, ayrıca kültürlenmiş OB kaynaklı kök/progenitör hücrelerde nöronal farklılaşma sırasında LC3 lipidasyonunda ve otofajik akışda bir artış olduğu bildirilmiştir (Vázquez ve ark., 2012). Benzer şekilde, nörojenik dönemde fare serebral korteksinde Atg5 ve LC3-II protein seviyelerinin yükseldiği gösterilmiştir (Lv ve ark., 2014). Otofaji ilişkili gen 5 ekspresyonunun Atg5'in susturulmasının kortikal nöronal farklılaşmayı bozarken subventriküler bölge (SVZ) ve ventriküler bölgede (VZ) NSPC'lerin çoğalmasını (proliferasyonun) artırdığı, kortikal nöronal hücre morfolojisini bozduğu, bu bağlamda Atg5'in erken embriyonik beyin gelişimi sırasında kortikal nörogenezde önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (Lv ve ark., 2014). Kortikogenez sırasında Sınıf III PI3K'nın (Vps34) in utero elektroporasyonla akut olarak susturulmasının da nörogenezi etkilediği, VZ/SVZ'deki NSPC'lerin hücre döngüsünü etkilemeden uyarıcı nöron göçünü ve aksonal büyümeyi azalttığı tespit edilmiştir (Inaguma ve ark., 2016). Otofajinin Wortmaninn veya 3-MA gibi PI3K inhibitörleri ile farmakolojik olarak bozulmasının, yeni doğan nöron sayılarını ve olgunlaşmalarını azaltarak OB-NSPC'lerin nöronal farklılaşmasını bozduğu, dahası, Ambra1+/gt haploinsufficient (bir genin bir kopyası inaktive edildiğinde veya silindiğinde ve genin kalan işlevsel kopyası normal işlevi korumak için gerekli gen ürününü üretmeye yeterli olmadığında ortaya çıkan durum) farelerden ve Atg5-/- farelerden alınan OB-NSPC'lerde nörogenezin azaldığı, OB-NSPC'lerin nöronlara farklılaşmak için bir enerji kaynağı olarak otofajiye ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir (Vázquez ve ark., 2012). Yetişkin farelerde kök veya progenitör hücrelerdeki otofaji genlerini devre dışı bırakan çalışmalar azdır. İlk olarak insülin yoksunluğunda yetişkin hipokampal NSPC'lerin kaspazdan bağımsız, otofajik bir hücre ölümüne uğradığı, ölmekte olan hücreler,

Beclin 1 ve LC3 II formunun artan ekspresyonu da dahil olmak üzere otofaji özellikleri gösterdiği ve bu hücrelerin elektron mikyograflarında, sitoplazmik içerikli otofajik vakuol oluşunun önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Yu ve ark., 2008). Ha ve ark. (2017), insülin yoksunluğunun hipokampal NSPC'lerde AMPK'yı aktive ettiği, aktifleşen AMPK'nın p62'yi yeni bir bölgede, Ser-293/Ser-294'te (sırasıyla sıçan ve insan p62'sinde) fosforile ettiği, fosforile p62'nin de mitokondriye transloke olarak mitofaji ve otofajiyi indüklediğini göstermişlerdir (Ha ve ark., 2017). Daha sonra, hücresel iskemi modelinde oksijen-glikoz yoksunluğunun yetişkin hipokampal NSPC'lerde Beclin-1 ve LC3-II ekspresyon seviyelerini artırarak, p-62 ekspresyon seviyesini ise azaltarak otofajik hücre ölümünü de indüklediği bildirilmiştir (Chung ve ark., 2018). 2013 yılında yapılan bir in vivo çalışmada (Wang ve ark., 2013), memeli hücrelerinde otofaji indüksiyonu için gerekli bir gen olan FIP200'ün (Rb1cc1 olarak da bilinir) ablasyonunun, farelerde NSC kaybına ve özellikle doğum sonrası beyinde nöronal farklılaşmada bozulmaya neden olduğu, ancak embriyonik beyinde olmadığı, FIP200 aracılı otofajinin, oksidatif durumlarının düzenlenmesi yoluyla doğum sonrası ve yetişkin NSC'lerin bakımı ve işlevi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Gelişim sırasında FIP200'ün koşullu olarak silinmesinin, doğum sonrası SEZ ve subgranüler (SGZ) bölgelerdeki progenitörleri tükettiği ve nörogenezi olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2013). Beclin1-Atg14L1-Vps34 kompleksinin yetişkin SEZ'deki rolü de analiz edilmiş (Yazdankhah ve ark., 2014) ve otofagozom oluşunun ilk adımlarında yer alan prootofajik proteinler Ambra1 ve Beclin 1'in yetişkin subventriküler bölgede (SVZ) yüksek oranda ifade edildiği, in vitro ortamda yetişkin nöral kök hücrelerde aşağı regölasyonlarının hücre proliferasyonunda azalmaya, bazal apoptozda artışa ve DNA hasarı kaynaklı ölüme karşı artan bir duyarlılığa yol açtığı ve Ambra1- ile Beclin 1- aracılı otofajinin, nöral öncü hücrelerin hayatta kalmasını kontrol ederek yetişkin nörogenezinde çok önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Yazdankhah ve ark., 2014).



Şekil 2.64. Nörogenez ve nöronal plastisitede otofajinin rolüne ilişkin deneysel kanıtlara genel bakış (Fleming ve Rubinshtein, 2020).

Çeşitli çalışmalar mTOR'nin nörogenezin birçok yönüyle ilgili olduğunu göstermiştir. Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefinin aktivasyonu NSC farklılaşmasını, nöral progenitor hücre göçünü, dendrit gelişimini ve nöron olgunlaşmasını değiştirir. Doğum sonrası yaşamın ilk haftasında, embriyonik VZ, kendini yenileme veya farklılaşmayı yönlendiren mTOR aktivitesi ile yetişkin SVZ'ye geçiş yapar. Nöral kök hücreler SVZ'deki lateral ventriküller ve kan damarlarıyla temas ederek onları protein kinaz B (Akt) ve mTOR gibi aşağı yönlü sinyal kaskadlarını etkileyebilen insülin büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi önemli kılavuz moleküllere maruz bırakır (Kokovay ve ark., 2010). Subventriküler alandaki mTORC1 aktivitesi, nöral soy genişlemesiyle bağlantılıdır ve proliferatif hücreler ve yeni doğan nöroblastlarla sonuçlanır. Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1'in hiperaktivasyonunun NSC'lerin proliferatif yavru hücrelere simetrik farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir (Mahoney ve ark., 2016). Tuberoz skleroz kompleks 1 delesyonu ile mTORC1'in sürekli aktivasyonu sonunda SVZ'de proliferatif kök hücrelerin azaldığı tespit edilmiştir (Magri ve ark., 2011).

Fosfatidilinositid 3-kinaz (PI3K)-Akt-mTOR sinyal yolağının, kortikal katmanların düzgün gelişimi ve farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı, mTOR mutasyonlarının kortikal delaminasyona ve dismorfik nöronlara neden olduğu ortaya konmuştur (Mirzaa ve ark., 2016). mTOR yolağı aktivitesindeki bozulma, konjenital multisistem bozukluğu tüberoskleroz (TS) dahil olmak üzere bir dizi nörogelişimsel bozukluğa yol açar (Crino ve ark., 2006; Tee ve ark., 2016). Tüberosklerozda artmış mTOR aktivitesi genellikle gelişim sırasında kortikal malformasyonlara, yavaş büyüyen astrositomlara ve bilişsel eksikliklere neden olur (Ehninger ve ark., 2009; Tee ve ark., 2016). Gangliyonik eminenslerin progenitörlerinde mTOR'nin koşullu olarak silinmesi kortekste genel internöronlarda azalmaya yol açar (Ka ve ark., 2017).

Postnatal SVZ'de, NSC'ler OB'ye ulaşmak için uzun mesafeler kat eden göç eden nöroblastlara dönüşürler. Olfaktör bulbusa ulaştıktan sonra, bu yeni doğan nöronlar granül ve glomerüler katmanlardaki nihai hedeflerine ulaşmak için RMS'den teğetsel olarak göç ederler (Alvarez-Buylla ve ark., 2008). Tüberoskleroz kompleksi 1 heterozigot farelerin perinatal nöral progenitör hücrelerinde (NPC) mTOR hiperaktivitesi, tüberosklerozlu hastalarda görüldüğü gibi heterotopiye ve anormal nöronal morfogenezde neden olur. Beyinde zenginleştirilmiş Ras homologunun (Rheb) yapısal aktivasyonu nörogenezini artırarak OB'de daha fazla sayıda nöron üretirken, aynı zamanda RMS ve koku mikronodüllerinde ektopik nöronal farklılaşma oluşturur (Lafourcade ve ark., 2013). Postnatal NSC'lerde Tsc1 geninin silinmesi, embriyonik mutasyonlarda gözlenen sonuçları yansıtarak anormal göç ve heterotopilere yol açar (Feliciano ve ark., 2012). Birlikte ele alındığında hem embriyonik hem de postnatal nörogenez çalışmaları, yeni doğan nöronların uygun hedeflerine göçünü düzenlemede mTOR'nin kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Nöron olgunlaşmasının önemli bir adımı dendritogenezdir. Dendritik arborun (dallanmanın) şekli, belirli bir nöronal devre içindeki bir nöronun işlevini yansıtır. Bu nedenle, uygun gelişimi, herhangi bir nöronal topluluk içinde doğru bağlantı ve sinaptik organizasyon için anahtardır (McAllister, 2000; Urbanska ve ark., 2008; Wong ve Ghosh, 2002). İn vitro kültür nöronları üzerinde yapılan çalışmalar, mTOR'nin dendritogenezde dahil olmak üzere nöronal gelişimde önemli roller oynadığını göstermiştir (Jaworski ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2005; Swiechve ark., 2008; Urbanska ve ark., 2008). İn vivo çalışmalar daha az sayıdadır (Thomanetz ve

ark., 2013). Bununla birlikte, Feliciano ve ark. (2012), SVZ'de doğum sonrası nöral kök hücrelerde mTORC1 inhibitörü olan TSC1'in koşullu nakavtını kullanarak yaptıkları çalışma, mTOR hiperaktivitesinin dendritik arbor hipertrofisi ile sonuçlandığını göstermektedir. Benzer şekilde, embriyonik ve yetişkin nörogenezinin birçok yönünü düzenleyen ve akıl hastalıkları için bir duyarlılık geni olan DISC1 (şizofrenide bozulma 1) kaybına bağlı olarak dentat girustaki yetişkin doğan nöronlarda mTOR'nin hiperaktivasyonun aşırı dendritik dallanmaya neden olduğu gösterilmiştir (Kim ve ark., 2009).

Olfaktör bulbusdaki granül nöronlar en büyük internöron popülasyonunu oluşturur. Somaları granül hücre katmanında bulunur ve hem bazal dendritleri hem de dış pleksiform katmanda yaygın olarak dallanan tek bir apikal dendriti uzatırlar. Granül nöronları anaksonik olmaları ve dikenli süreçler yoluyla dendrodentritik sinapslar oluşturmaları bakımından benzersizdir (Whitman ve Greer, 2009). Çeşitli çalışmalar mTORC1 aktivasyonunun olfaktör granül nöronlarında dendritik karmaşıklığı artırdığını göstermiştir. Hamartinin postnatal silinmesi granül nöronlarında dendritik hipertrofiye neden olur (Feliciano ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2016). Ayrıca, Rheb aktivasyonu granül nöronlarının, özellikle de bazal dendritlerin dendritik dallanmasını artırır (Lafourcade ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016). Subventriküler alan kaynaklı nöronların dendritogenezi için hem mTORC1 hem de mTORC2'nin gerekli olduğu ayrıca, SVZ'deki nöral kök hücrelerin in vivo elektroporasyonu ve mTOR'nin genetik ve farmakolojik inhibisyonunun bir kombinasyonu kullanılarak, mTOR'nin fizyolojik koşullar altında postnatal olarak doğan OB nöronlarında bazal ve apikal dendritlerin büyümesi için çok önemli olduğu ve bazal dendritlerinin stabilizasyonuna katkıda bulunduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, global mTOR'nin devreden çıkarılmasının apikal dendrit dallanmasını engellediği, ancak mTORC1'e özgü inhibisyonun dendrit karmaşıklığını azaltmadığı gösterilmiştir (Skalecka ve ark., 2016). Bu sonuçlar, farklı mTOR komplekslerinin apikal ve bazal dendritik ağaçları ayrı ayrı düzenleyebileceğini göstermektedir.

Özetle, son yıllarda yapılan araştırma sonuçları i) otofajinin nöronlarda da normal koşullar altında yapısal olarak meydana geldiğini, ii) bazal otofajinin nöronal sağkalımdan sorumlu olduğunu (Poels ve ark., 2012), iii) bazal otofajinin bozulmasının nörodejenerasyona yol açtığını, iv) otofaji eksikliğinin merkezi sinir

sisteminde hücresel enerji homeostazını bozduğunu ve v) depresyon ve nörodejeneratif bozukluklarla yakından ilişkili olduğunu (Hara ve ark., 2006; Jia ve Le, 2015; Komatsu ve ark., 2006; Kulkarni ve ark., 2018; Lee ve ark., 2010; Nixon ve Yang, 2012; Shehata ve ark., 2012; Takacs-Vellai ve ark., 2006; Vijayan ve Verstreken, 2017), vi) otofaji genlerinin gelişmekte olan merkezi sinir sistemi organlarında eksprese edildiğini ve ayrıca bazal otofajinin nöronal kök hücrelerin korunmasında ve nöral progenitörlerin çoğalmasında rol oynadığını (Dhaliwal ve ark., 2017; Ha ve ark., 2015; Hara ve ark., 2006; Komatsu ve ark., 2006; Menzies ve ark., 2017; Nixon, 2013; Wang ve ark., 2013; Wang ve ark., 2016; Wu ve ark., 2015; Xi ve ark., 2016; Yamamoto ve Yue 2014; Yazdankhah ve ark., 2014; Yu ve ark., 2008) ortaya koymuştur.

Tüberoskleroz, TSC1 veya TSC2'yi inaktive eden mutasyonların neden olduğu nörogelişimsel bir bozukluktur. Tübero skleroz kompleks 1 ve TSC2 genleri sırasıyla hamartin ve tuberin proteinlerini kodlar. Hamartin ve Tuberin, mTOR'nin Rheb aktivasyonunu önleyen bir GTPaz aktive edici protein heteromeri oluşturur. Böylece, TSC1 veya TSC2'deki inaktive edici mutasyonlar mTOR aktivitesini artırır. Tüberosklerozda ventriküler-subventriküler bölge, korteks, olfaktör kanal ve OB'de büyüme ve lezyonlar meydana gelir. Önde gelen bir hipotez, inhibitör nöral progenitör hücrelerdeki mutasyonların TS'de beyin büyümelerine neden olduğudur (Riley ve ark., 2022). Nitekim çeşitli çalışmalar, yenidoğan SVZ NSC'lerinde TSC1'in silinmesi yoluyla TSC genlerinin OB gelişimindeki rolünü incelemiştir (Feliciano ve ark., 2012; Feliciano ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2011;). Bu çalışmalarda SVZ NSC'lerinde TSC1/TSC2 mutasyonlarının anormal OB gelişimiyle sonuçlandığı (Feliciano ve ark., 2013), koşullu TSC1 geninin silinmesinin nöroblast göç kusurlarına ve daha az olfaktör granül hücrenin şekillenmesine neden olduğu (Zhou ve ark., 2011), TSC1'den yoksun nöroblastların daha yavaş göç ettikleri, granül nöronların düzensiz oldukları ve hiperaktif mTORC1'e sahip oldukları (Feliciano ve ark., 2012) gösterilmiştir. Tuberin geninin koşullu kaybının da granül hücre gelişimini değiştirdiği bildirilmiştir. Doğum sonrası 30. günde oluşan Tsc2 mutant granül hücrelerde hipertrofik dendritik dallanmanın olduğu, buna karşılık, olgun granül hücrelerden Tsc2 kaybının, soma boyutu ve dendrit arborizasyonu üzerinde ihmal edilebilir etkilerinin bulunduğu saptanmıştır. Olfaktör bulbus granül hücrelerinde Tsc2 kaybının mTOR yolunu aktive

ettiği ve Tsc2mut/mut granül hücrelerin kontrol granül hücrelerden daha büyük olduğu (sitomegali) gösterilmiştir (Riley ve ark., 2022).

Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın enerji metabolizmasının düzenlenmesinde kilit oyuncu olduğu gösterilmiş ve bu nedenle AMPK obezite, diyabet ve diğer metabolik bozukluklarla ilgili araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Beyin toplam vücut ağırlığının %2'sini oluşturmalarına rağmen, tüm glikoz kaynağının %50'sini kullanır. Beyin hücrelerinin enerji tüketimi çok yüksektir ve diğer periferik hücrelerin aksine nöronlar enerji kaynağı olarak yalnızca glikoz kullanır. Nöronlar yeterli miktarda glikojen sentezleyip depolayamadıklarından, kendilerine sabit ve sürekli bir glikoz kaynağı sağlamak zorundadır (Vilchez ve ark., 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar nöronlarda enerji üretimi ve tüketiminin düzenlenmesinde AMPK'nın önemli bir rolü olduğunu vurgulamıştır. Beyinde yaygın olarak ifade edilen AMPK aktivitesi hem nöronal hem de tüm vücut seviyelerindeki enerji durumuna sıkı sıkıya bağlıdır. Sinaptik aktivasyonu, sodyum pompası aktivitesi, nörotransmitter reseptör translokasyonu/geri dönüşümü, sinaptik taşıma, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ve metabolik süreçler gibi yüksek enerji tüketimi ile karakterize edilen bir dizi moleküler ve hücresel olay takip eder. Bu olaylar sırasında, glutamat uyarımını takiben ATP seviyelerindeki düşüşün AMPK'yı güçlü bir şekilde fosforile edebildiği ve glutamat aktivasyonunun hücre yüzeyindeki glikoz taşıyıcı protein 3'ün (GLUT3) translokasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Özellikle, GLUT3'ün hücre zarındaki artışına AMPK aracılık etmektedir, çünkü bu kinazın farmakolojik olarak inhibe edilmesi veya devreden çıkarılması glutamat ile indüklenen GLUT3 translokasyonunu tamamen önleyebilmektedir (Weisova ve ark., 2009). Glikoz metabolizmasına ek olarak, AMPK'nın nöronlarda mitokondriyal fonksiyon ve biyogenezin kilit bir düzenleyicisi olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Neuro2a hücre hattında, resveratrol ile AMPK aktivasyonu mitokondriyal protein markeri Mitofusin 2 transkriptlerinde ve mitokondriyal biyogenezin ana düzenleyicileri olan PGC-1 α (Peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör gama koaktivatör 1 alfa) ve mtTFA'da (mitokondriyal transkripsiyon faktörü A) bir artış oluşturmaktadır. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz inhibisyonu bu mitokondriyal ilişkili proteinlerin transkripsiyonunu baskılayarak AMPK'nın nöronlarda mitokondriyal

metabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını desteklemektedir (Dasgupta ve Milbrandt, 2007; Onyango ve ark., 2009).

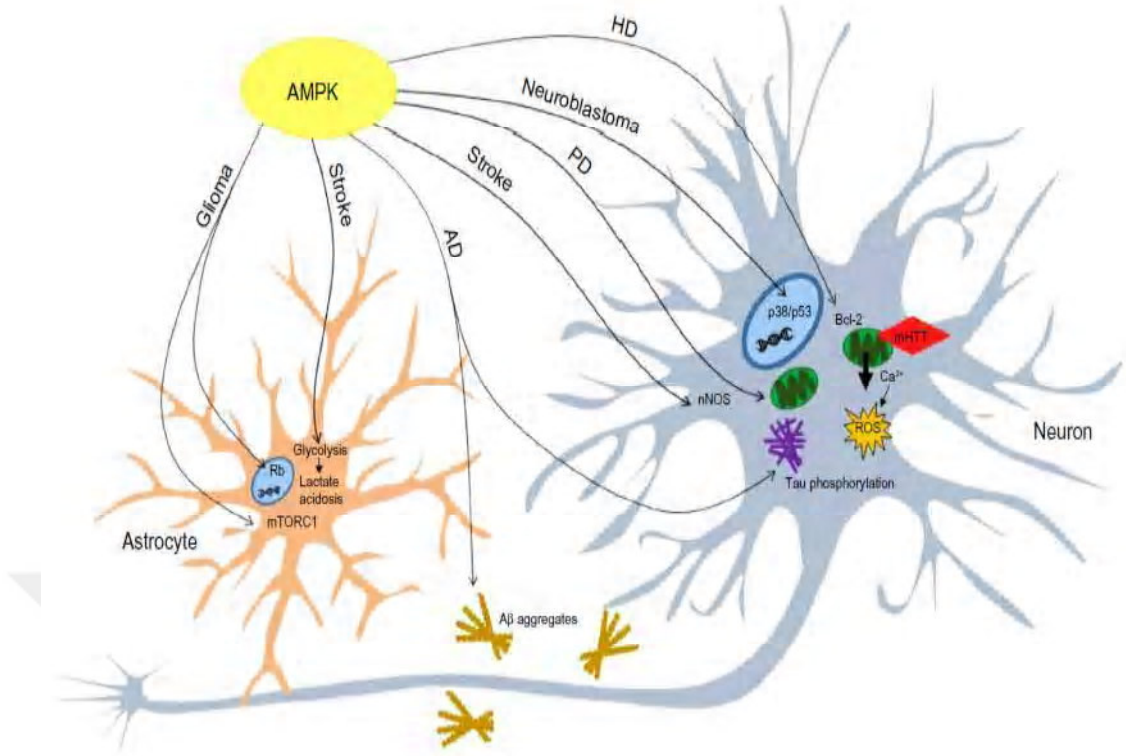
Nöronlarda metabolizmanın doğrudan düzenlenmesinin yanı sıra, AMPK'nın nörogelişimsel süreçlere de dahil olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2007). Nöronal büyüme ve sinaptik işlev, sinaptaki hassas protein üretimine ve cirosuna bağlıdır. AMPK'nın nöronal çoğalma, göç, morfogenez ve sinaptik iletişim dahil olmak üzere beyin gelişimi ve işlevinin birçok yönünün yanı sıra nöronal hücre ölümü, enerji tükenmesi ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rolü olduğu ortaya konmuştur (Amato ve Man, 2011). Protein sentezi ve hücresel büyümede metabolik homeostazın önemi göz önüne alındığında, AMPK-mTORC1 sinyal yolağı özellikle Alzheimer hastalığı (AD) araştırmalarının temelini oluşturmuştur (Amato ve Man, 2011; Mattson ve ark., 2018; Salminen ve ark., 2011). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın mTORC1 aracılığıyla sinaps gelişimi ve işlevinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Amato ve ark., 2011; Li ve ark., 2010). Beyinde, mTORC1'in aktivasyonu, Homer-1 ve BDNF (beyin kaynaklı nörotrofik faktör) salgılanması dahil olmak üzere büyüme belirteçlerinin ve nörotrofik faktörlerin üretimini indükler, bunların hepsi uygun sinaps işlevi için önemlidir ve hepsi Alzheimer hastalığında aşağı regüle edilir (Beckley ve ark., 2016; Berchtold ve ark., 2012; Dasgupta ve Milbrandt, 2009; Varela-Nallar ve ark., 2012). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın aktivasyonunun mTORC1'i inhibe etmesi ve sinaptik belirteçleri aşağı doğru düzenlemesi beklenmektedir, bu da metabolizmanın rolünün ve kronik AMPK aktivasyonunun kapsamının sağlıklı hücresel süreçlerin sürdürülmesinde tam olarak ne olduğuna yönelik önemli bir soruyu gündeme getirmektedir. Örneğin, akut AMPK fosforilasyonu/aktivasyonu beyindeki metabolik homeostazın yeniden sağlanmasında faydalı olabilir (Didier ve ark., 2018). Ancak aktivasyonu aynı zamanda hücre boyutunun, nörit uzunluğunun ve nöronal polarizasyonun azalmasıyla da ilişkilendirilmiştir (Amato ve ark., 2011). Farelerde AMPK β 1 (AMPK β -/-) alt biriminin ablasyonunun (nakavt edilmesinin) nöron ve oligodendrosit sayısında ciddi bir azalmanın yanı sıra anormal astrosit proliferasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Dasgupta ve Milbrandt, 2009). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz işlevselliğinin kaybı ayrıca nöral kök hücre progenitör hücrelerinde (NPC) proliferatif kusurlar ve artmış apoptoz üretmiş ve vahşi tip yavrulara göre %50 daha küçük bir

beyinle sonuçlanmıştır (McLear ve ark., 2006). Nöronal gelişimin başlangıcında enerji eksikliği koşullarını taklit etmek için AMPK aktivitesi farmakolojik olarak artırıldığında hem kültürlenmiş embriyonik hipokampal nöronlarda hem de embriyonik kortikal beyinde akson başlangıcı ve nöronal polarizasyonun baskılandığı ve morfolojik polarizasyondan yoksun nöronların şekillendiği saptanmıştır (Amato ve ark., 2011). Bunun, daha önce akson başlatma ve polarizasyonda kritik bir faktör olduğu gösterilen nörit ucundaki PI3K zenginleşmesinin AMPK'ya bağlı olarak bozulmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (Shi ve ark., 2003).

Artan kanıtlar AMPK'nın enerji eksikliği koşullarında hücre polarizasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynadığını da göstermektedir. Örnek olarak, AMPK aksojenezin kökenindeki süreçleri etkileyerek ilk nöronal polaritenin kurulmasını modüle etmektedir (Amato ve ark., 2011). Buna ek olarak AMPK'nın dendrit büyümesi ve dallanma sırasında nöronal gelişimi düzenlediği, nöronal mimari üzerindeki bu etkilerin moleküler düzeyde, hem mTOR hem de Akt sinyal yollarının AMPK'ya bağlı olarak baskılanmasıyla tetiklendiği ortaya konmuştur (Ramamurthy ve ark., 2014). Başka bir çalışmada, farelerde her iki AMPK α 1/ α 2 alt biriminin de nakavt edilmesinin, AMPK aktivitesinin normal koşullar altında kortikal nörogenez, nöronal göç veya polarizasyon için gerekli olmadığı gösterilmiştir (Williams ve ark., 2011). Bu bulgular, normal polarizasyon sırasında bazal AMPK aktivitesi için ihmal edilebilir bir role işaret etmekte ve AMPK'nın patolojik enerji eksikliği koşulları altında nöronal polarizasyonu düzenlemek için çalışabileceğini ima etmektedir. Uzun süreli (>24 saat) AMPK fosforilasyonu/aktivasyonunun sinaptik protein içeriğini etkilediği ve nörit protein bolluğu ile dağılımını azalttığı böylece sinaptik büyümede azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Yang ve ark., 2022).

Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın nöronal hücre ölümündeki rolüne ilişkin çelişkili bulgular bildirilmiştir. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz aktivitesinin hem nöroprotektif hem de pro-apoptotik olduğu görülmektedir, bunun nedeni muhtemelen sinir hücresi tiplerindeki farklılıklar, nöral hasarların yapısı ve AMPK aktivasyonunun yoğunluğu ve uzunluğudur. Örneğin, AMPK'nın bir adenozin monofosfat (AMP) analogu olan 5-aminoimidazol-4-karboksamid-1- β -D-ribofuranosid (AICAR) tedavisi yoluyla farmakolojik aktivasyonu, glikoz yoksunluğu, kimyasal iskemi ve glutamat maruziyetine yanıt olarak hipokampal nöron

sağkalımını etkili bir şekilde artırmıştır. Daha da önemlisi, $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ alt birimlerinin devre dışı bırakılması AICAR'ın faydalı etkilerini ortadan kaldırarak AMPK aktivitesinin doğrudan dahil olduğunu göstermiştir (Culmsee ve ark., 2001). İskemiye yanıt olarak, AMPK'nın post-sinaptik hiperpolarizasyonda rol oynayan G proteinine bağlı bir reseptör olan GABAB (γ -aminobütirik asit (GABA) tip B) reseptörünün R2 alt birimini fosforile ettiği ve bunun sonucunda reseptör aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Gama amino bütirik asit tip B (GABAB) reseptör aktivitesinde AMPK aracılı yukarı regülasyonun sinaps sonrası hiperpolarizasyona, eksitotoksitenin azalmasına ve kimyasal anoksiden sonra nöronal sağkalımın iyileşmesine yol açtığı gösterilmiştir (Kuramoto ve ark., 2007). Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın diğer nörodejeneratif bozukluklara katılımına ilişkin çalışmalar sınırlı olsa da rolü AD ile sınırlı görünmemektedir. Örneğin, Huntington hastalığı (HD) olan insan ve farelerde AMPK $\alpha 1$ alt biriminin aktifleştiği ve sitriata nöronlarının çekirdeklerine transloke olduğu, AMPK'nın aşırı aktivasyonunun nöronal ölümü artırdığı ve Huntington agregatlarının oluşumunu kolaylaştırdığı, daha da önemlisi, AMPK aktivitesinin bastırılması veya nükleer lokalizasyonunun engellenmesinin nöroprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Ju ve ark., 2011). MPTP (1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) uygulamasıyla indüklenen bir Parkinson hastalığında (PD) AMPK'nın aktive olduğu ve AMPK aktivasyonunun nöronal hücre ölümünü önleyebileceği ve PD'de bir sağkalım faktörü olarak rol oynayabileceği bildirilmiştir (Choi ve ark., 2010). Ayrıca, AMPK genel hücresel mekanizmalar yoluyla nörodejeneratif bozukluklara dahil olabilir. Örneğin, protein yıkımındaki işlev bozukluğu çoğu nörodejeneratif hastalık tarafından paylaşılan ortak bir özelliktir ve bu da hücre içi agregatların ve nöronal toksitenin oluşmasına yol açar. Bu düşüncelyi destekleyecek şekilde AMPK'nın, mTOR yolunun inhibisyonu veya ATG1 enziminin aktivasyonu yoluyla nöronlarda otofajik sürecin düzenlenmesinde önemli bir oyuncu olduğu gösterilmiştir (Egan ve ark., 2011; Kim ve ark., 2011) (Şekil 2.65.).



Şekil 2.65. Beyinde AMPK aktivitesi. a) β -amiloid üretimini ve AD'de nörofibriler yumakların oluşumunu modüle eder; b) Bcl-2'nin ekspresyonunu düzenler, böylece HD'de nörotoksisiteyi önler; c) PD'de mitokondrinin kalite kontrolünü düzenler; d) nöronlarda ve astrositlerde nNOS ve laktat üretimini düzenleyerek iskemik inmede önemli roller oynar; e) onkosupresör proteinler Rb ve p53'ü modüle ederek beyin tümörü başlangıcı ve ilerlemesinde rol oynar. AD, Alzheimer hastalığı; HD, Huntington hastalığı; PD, Parkinson hastalığı; nNOS, nöralnitrik oksit sentaz. (Rosso ve ark., 2016).

Nöronlar genel olarak çok yüksek bir metabolik hıza ve yüksek glikoz kullanımına sahip olmakla birlikte yerel glikoz kullanımı beynin farklı bölgelerinde değişiklik gösterdiği, buna bağlı olarak yetişkin beyninde eksprese edildiren çeşitli AMPK izoformlarının ekspresyonları ve lokalizasyonlarının merkezi sinir sistemi bölümlerinde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın sinir sisteminde varlığına ilişkin ilk çalışmalarda AMPK aktivitesi kültürlenmiş oligodendrositlerde ve astrositlerde gösterilmiştir (Cox ve ark., 1997; Moore ve Brophy, 1994). Farelerde embriyonik gelişimin 10. ve 14. günler arasında beyinde AMPK'nın $\alpha 2$ ve $\beta 2$ alt birimleri için mRNA seviyelerinin arttığı, $\alpha 1$, $\beta 1$ ve $\gamma 1$ alt birimlerinin ekspresyonunun ise embriyonal yaşamın 10. gününden postnatal yaşamın 25. gününe kadar olan süreçte değişmediği ancak AMPK $\beta 1$ ekspresyonunun postnatal yaşlarda hafifçe azaldığı tespit edilmiştir. Alfa 2 katalitik alt birimi nöronlarda ve aktive astrositlerde yüksek oranda eksprese edilirken, $\alpha 1$ katalitik alt birimi nöropilde düşük ekspresyon göstermiştir. Katalitik olmayan $\gamma 1$ alt birimi

nöronlar tarafından yüksek oranda ifade edilirken astrositler tarafından ifade edilmemiştir. Beta 1 ve $\beta 2$ katalitik olmayan alt birimlerin ekspresyonu değişkendir, ancak OB granül hücreleri gibi bazı nöronlar β izoformlarından herhangi birinin saptanabilir seviyelerini ifade etmemiştir. Nöronların çoğu katalitik $\alpha 2$ alt birimini ve bununla ilişkili katalitik olmayan $\gamma 1$ ve $\beta 1$ veya $\beta 2$ alt birimlerini yüksek seviyelerde ifade etse de ifade seviyesinin beynin en yüksek glikoz kullanımına sahip olduğu bildirilen bölgelerinde en yüksek olduğu görülmüştür. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz $\alpha 2$ 'nin beyin ve omurilikte baskın katalitik alt birim olduğu, beyinciğin granül hücreleri ile Pürkinje hücreleri, OB periglomerüler, mitral ve granül hücreleri gibi nöronlar tarafından ifade edildiği belirlenmiştir (Turnley ve ark., 1999).

AMPK β alt birimlerinin ağırlıklı olarak nöronlarda ifade edildiği, ancak iki izoformun ekspresyonunun farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Örneğin: Beyin bölgelerinde $\beta 1$ alt birimi kortikal nöronların ve OB granül hücre katmanındaki nöronların bazıları tarafından eksprese edilmezler. Beta 2 alt birimi çoğu nöron tarafından düşük ila orta seviyelerde, beyincikteki Purkinje hücrelerinde ise son derece yüksek düzeyde eksprese edilir. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz $\alpha 2$ 'ye benzer olarak hem $\beta 2$ hem de daha az olarak $\beta 1$, substansiya alba astrositlerinin bir alt popülasyonunda ve omurilik substansiya alba'sındaki astrositlerde yüksek düzeyde ifade edilir. Olfaktör bulbusda AMPK $\beta 1$, sadece mitral hücreler ve bazı periglomerüler hücreler tarafından eksprese edilir, ancak granül hücreleri tarafından eksprese edilmez. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz $\beta 2$ 'nin OB'de hiç ifade edilmezken, AMPK $\gamma 1$ 'in hafif glomerüler boyanma ile $\alpha 2$ ile aynı yaygın nöronal ekspresyon gösterir. Potansiyel olarak işlevsel AMPK aktivitesinin düzenlenmesi nöronlarda ve astrositlerde farklı görünmektedir. Şöyle ki nöronlar her iki α izoformunun yaygın ekspresyonunu gösterir, $\alpha 1$ esas olarak nöropilde, $\alpha 2$ esas olarak çekirdekte lokalizedir. Gama 1 ve β izoformları ise hem sitoplazma hem de çekirdekte bulunur. Astrositlerde ise AMPK $\alpha 2$ katalitik alt birimi ve $\beta 2$ ve daha az oranda $\beta 1$ katalitik olmayan alt birimleri eksprese edilir. Astrositlerin çoğunun normalde AMPK ifade etmediği, ancak reaktif gliyozis sırasında olduğu gibi metabolik aktivitede bir artış olduğunda ekspresyonun artabileceği ve aktive olmuş astrositlerdeki $\alpha 2$ ve $\beta 2$ alt birimlerinin eksprese edildiği gösterilmiştir (Turnley ve ark., 1999).

Otofajinin başlatılması, ULK1 ile Beclin 1'i içeren sınıf III PI3K kompleksi arasındaki etkileşimi gerektirir (Russell ve ark., 2013). Genel olarak, otofajinin nöroprotektif olduğu düşünülmektedir ve inhibisyonu hem nörodejeneratif hastalıklarda hem de nöronal travmada rol oynamaktadır. Bununla birlikte, özellikle akut aksonal dejenerasyonu inceleyen çalışmalar, akson dejenerasyonun önlenmesinde yapısal otofajinin vazgeçilmez rolünü gösterirken, otofajinin dengesiz indüksiyonunun akson dejenerasyonuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Yang ve ark., 2013). Nitekim Wakatsuki ve ark. (2017), otofajinin inhibisyonunun in vitro aksonal dejenerasyonu geciktirebileceğini göstermiş ve otofajinin aktif aksonal dejenerasyon süreci için lokal ATP'nin enerji sağlayabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca, Vahsen ve ark. (2020), ULK1'in mTOR aktivitesi, translasyon ve splicing üzerindeki etkisi yoluyla in vitro ve in vivo aksonal dejenerasyonun önemli bir aracısı olduğunu göstermiştir. Bunun yanısıra fare beyinde ULK1 ve ULK2'nin kortikal nörogenez için gerekli olmadığı bildirilmiştir (Wang, 2016). Unc-51 benzeri kinaz 1'in sıçanın beyin beyincik, medulla oblongata ve OB nöronlarında bulunduğu tespit edilmiştir. Ön beyinde, ULK1 hipokampüste kornu ammonisin CA1-CA3 bölgelerindeki piramidal hücre tabakası ve dentat girustaki granül hücre tabakası yoğun bir şekilde işaretlenirken, stratum radiatum ve stratum lacunosum-molekölare ve dentat girusun hilusundaki polimorfik tabakadaki bazı nöronların da ULK1-immünpozitif olduğu gösterilmiştir. Unc-51 benzeri kinaz 1'in OB mitral hücre tabakasında yoğun, dış pleksiform tabaka ve granüler tabakada ise zayıf immünoreaktivite gösterdiği, ancak iç pleksiform tabakada immünoreaktivite bulunmadığı gözlenmiştir. Beyincikte, ULK1-pozitif immünoreaktivite Pürkinje hücre katmanında yoğun, moleküler katman veya granüler katmanda çok zayıf olarak tespit edilmiştir (Okazaki ve ark., 2000).

Hem Ulk1 hem de homolog Ulk2'nin duyusal nöron akson büyüme konilerine lokalize olduğu, memeli duyusal nöronlarında Ulk1 geninin susturulmasının sahte akson arborizasyonuna neden olduğu ve akson büyümesini engellediği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2007). Unc-51 benzeri kinaz 1'in nöron morfolojisini düzenlediğine dair başka bir kanıt olarak, Ulk1/2 nakavt ön beyinlerde korpus kallozum ve anterior komissür dahil olmak üzere tüm ana kortikal aksonal yollarda kusurlar bulunduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu tez çalışmasında ERÜ (Erciyes Üniversitesi) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınarak (Etik Kurul Tarih-Karar No: 28.08.2019-19/148) etik kurul yönergesine uygun bir şekilde yapılmış olan “Deneysel Hipotiroidizm Oluşturulan Erişkin Sıçanların Hipokampusünde Otofajinin Araştırılması” başlıklı tez çalışmasındaki erkek Wistar albino sıçanların hipokampus doku örnekleri alınırken birçok doku ile birlikte toplanan OB’ler materyal olarak kullanıldı. Sözü edilen çalışmanın hayvan materyali Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ERÜ DEKAM) elde edildi. Çalışmada kontrol grubu (CON), deneysel hipotiroidizm oluşturulmuş grup (PTU), deneysel hipotiroidizm oluşturulduktan sonra levotiroksin (LT4) (PTU+L) ile tedavi edilmiş grup olmak üzere 3 farklı gruba ait sıçanların OB’leri kullanıldı.

CON grubu hayvanlara (n=16) 100 ml solüsyon içerisinde 1 ml 0.1 N NaOH (Sodyum hidroksit) bulunan serum fizyolojik çözeltisi her sıçana 500 µl olmak suretiyle 28 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyon ile verildi.

PTU grubundaki hayvanlara (n=16) ise 28 gün boyunca bir antihipertiroid ilaç olan 6-n-propil tiourasil (PTU, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 0.1 N NaOH’de çözdürülüp hazırlandıktan sonra 10 mg/kg canlı ağırlık/gün hesabıyla intraperitoneal olarak uygulandı (Yang ve ark., 2018).

PTU+L grubundaki hayvanlarda (n=16) önce PTU grubunda olduğu gibi PTU uygulanarak hipotiroidizm oluşturuldu. Uygulamanın bitiminde bu hayvanlara her bir hayvan için 5 µg Levotiroksin 1 ml NaCl (sodyum klorür) içinde sulandırılarak 15 gün süreyle intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı (Tahmez ve ark., 2000).

3.2. Koku Testinin Yapılması

Deney hayvanlarında gruplar arasında koku alma farklılıklarının bulunup bulunmadığını belirlemek için gömülü yiyecek arama testi (koku testi) kullanıldı (Machado ve ark., 2018). Bu test için ERÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (Etik Kurul Tarih-Karar No: 06.12.2023-23/266). Koku testi tüm gruplarda denemenin bitiminde her bir hayvana bir gün aralıklarla iki kez uygulandı. Deneysel tasarım için her grup testinde 16 hayvan kullanıldı. Koku testinin uygulanmasından 12 saat önce yemek kafeslerden çıkarıldı. Koku testi için yıkanmış temiz akrilik kafesler (30.5 cm uzunluk x 16 cm genişlik x 16 cm yükseklik) (Animal Care Systems, katalog numarası: M/P 79010) hazırlandı (Şekil 3.1.). Bu kafesler içine her bir hayvan için hiç kullanılmamış talaş altlıklar kondu. Daha sonra ilk aşama için herhangi bir stres faktörü bulunmayan bir ortamda yem, bu kafesler içindeki talaş altlık içine yaklaşık 2 cm derinlikte olacak şekilde gömülerek saklandı ve takiben deney hayvanı deney ortamına bırakıldı (Şekil 3.1.).



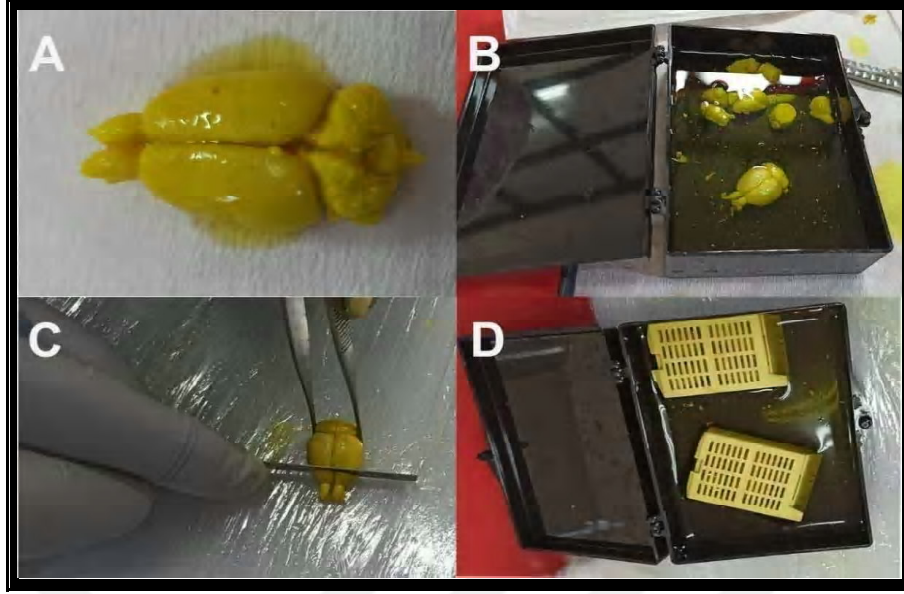
Şekil 3.1. Koku testi yapılan akrilik kafes ve deney aşamasındaki bir sıçan.

Uygulama sırasında kafesler akrilik kapak ile kapatıldı. Deney hayvanları deney ortamına bırakılır bırakılmaz süre başlatıldı ve hayvanlar videoya çekildi. Her bir sıçanın test kafesine girmesinden yiyecek peletini bulmasına kadar geçen süre gecikme süresi olarak kaydedildi. Dijital kronometre, sıçan pelete dokunur dokunmaz durduruldu. Bir hayvan yiyecek peletini 10 dakika içinde bulamazsa test sonlandırıldı ve gecikme süresi 600 saniye olarak kaydedildi. Her denek için temiz bir kafes, temiz talaş altık ve aynı büyüklükte yeni bir pelet yem kullanıldı. Değişkenliği azaltmak için tek bir deneyci deneyi bütünüyle tamamladı. Video analizini yapan deneycinin, önyargıdan kaçınmak için deney gruplarına kör olması sağlandı.

3.3. Doku Örneklerinin Alınması

CON, PTU ve PTU+L grubundaki sıçanlarda koku testlerinin uygulanmasından sonraki gün hayvanlar xylazine/ketamin kombinasyonunun (87 mg/kg-13mg/kg) intraperitoneal uygulanmasıyla anestezi edildi (Van Pelt, 1977). Tüm gruplarda çalışma materyalini oluşturacak olan OB doku örnekleri histoloji ve immunohistokimya teknikleri ve WB analiz tekniği için olmak üzere iki farklı metodla alınıp işlendi:

- a. Histoloji ve immünohistokimya teknikleri için doku örneklerinin işlenmesi: Bu analizler için her bir gruba ait anestezi altındaki 8'er hayvana Bouin tespit solüsyonu kardiyak perfüzyon ile uygulandı. Perfüzyon bitiminde hayvanların OB'leri (Şekil 3.2.; Şekil 3.3.) çıkarılarak Bouin solüsyonunda 6 saat süreyle postfiksasyona maruz bırakıldı (Şekil 3.2.). Tespitten sonra tüm dokular sırasıyla %50'lik alkolde dört saat, 70, 80, 96 ve absol alkollerin üç serisinde birer saat olmak üzere dehidre edildi. Takiben dokular metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı.



Şekil 3.2. Histoloji ve immünohistokimyasal analiz için perfüze edilmiş doku örneklerinin alınması. A: Bouin solüsyonu ile perfüze edilmiş Olfaktör bulbus, beyin hemisferleri ve beyincik, B: Perfüzyon sonrası Bouin solüsyonunda bekletilen doku örnekleri, C: OB'nin beyin hemisferlerinden ayrılması (trimlenmesi), D: Trimleme sonrası doku kasetlerine alınmış doku örnekleri.

b. Western Blot (WB) analizi için doku örneklerinin alınması: Bu analiz için her bir gruptaki diğer 8 hayvanın anesteziyi takiben OB'leri direkt olarak çıkarıldı ve yeterli protein ekstraktı elde edebilmek için her iki OB sıvı azotta (-196°C) donduruldu. Daha sonra bu dokular analizleri yapıncaya kadar -80°C 'de dondurucuda saklandı.



Şekil 3.3. Sığanda perfüze edilmemiş sağ ve sol OB'sinin (oklar) kafatasındaki lokalizasyonu.

3.3.1. Olfaktör Bulbus Doku Örneklerinin Histolojik ve İmmünohistokimyasal Boyama Teknikleri İçin Hazırlanması

Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların OB'sine ait doku bloklarından 4 mikrometre (μm) kalınlığında kesitler alındı ve her bir hayvan için 24 adet ardışık preparat hazırlandı. Genel yapıyı incelemek için preparatların ilk 12 serisi krezil viyole boyası ile boyanırken, diğer 12 serisi otofaji ile ilişkili proteinlerin OB'deki lokalizasyonlarını belirlemek için immünohistokimya boyama tekniği ile boyandı.

3.3.1.1. Krezil Viyole Asetat Boyama Yöntemi

Hazırlanan preparatlar deparafinizasyon [ksilen X2 kez 5'er dakika (dk.)] ve rehidratasyon (%100 alkol X2, %96 alkol X2, %80 alkol X1, %70 alkol X1, 3'er dk.) işlemlerinden sonra 5 dk. %0.1'lik krezil violet asetat içerisinde bekletildi. Daha sonra üç kez distile suda yıkanan kesitler, sırasıyla %96'lık ve %100'lük alkollerde 3'er dk. bekletildi. Takiben ksilende 2 kez 5'er dk. bekletilip entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı (Luna, 1960). Preparatlar Olympus BX51 marka mikroskopta incelenerek Olympus DP72 kamera (Olympus, Deutschland GmbH, Hamburg, Almanya) ile fotoğraflandı.

3.3.1.2. İmmünohistokimyasal Analiz

Otofaji ile ilişkili proteinlerin hücresel lokalizasyonlarını belirlemek amacıyla Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immünoperoksidaz tekniği uygulandı. Bu tekniğin aşamaları aşağıda sunulmuştur:

- a. Hazırlanmış olan preparatlar deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinin ardından distile suda 5 dk. yıkandı.
- b. Takiben preparatlar Bouin solüsyonundaki formaldehitin kapatmış olduğu doku antijeninin yeniden kazanımını sağlamak amacıyla ilk önce oda ısısındaki 10 mM sodyum sitrat bufferda (pH: 6.0) 5 dk. bekletildi. Daha sonra preparatlar mikrodalga fırında ısıtılmış sodyum sitrat buffer içinde 600W'de 4 kez 5'er dk. süreyle kaynatıldı.
- c. Aynı solüsyon içinde 20 dk. soğutulan preparatlar 1X fosfat buffer salin (1X PBS)'de 4 kez 5'er dk. süreyle yıkandı.

- d. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için kesitler metanol içerisinde çözünmüş %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonu içinde 15 dk. bekletildi ve yine PBS yıkama solüsyonuyla 4 defa 5 dk. süreyle yıkandı.
- e. Kesitler spesifik olmayan protein bağlanmaları engellemek amacıyla 5 dk. bloklama çözeltisiyle (Scytek, SuperBlock, AAA125) nem odasında inkübasyona bırakıldı.
- f. Daha sonra kesitler Tablo 3.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan primer antikorların dilüsyonlarında bir gece süresince $4^{\circ}C$ 'de inkübe edildi.
- g. Tüm antikorlar için immün boyamaların özgüllüğünü kontrol etmek için negatif kontrol dokusu olarak alınan bazı OB doku kesitleri primer antikor yerine normal tavşan IgG'si (sc-2027, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Amerika birleşik devletleri (ABD)) veya normal fare IgG'si (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD) inkübe edildi.
- h. Ertesi gün tüm kesitler PBS'de 4 kez 5 dk. süreyle yıkandı ve takiben biyotinlenmiş anti-tavşan antikor (TR-125-BN, Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, ABD, Kullanıma Hazır) veya biyotinlenmiş anti-fare antikoruyla (TM-125-BN, Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation, Fremont, CA, ABD, Kullanıma Hazır) 20 dk. oda ısısında inkübe edilip, tekrar 4 kez 5'er dk. süreyle 1X PBS ile yıkandı.
- i. Sonra kesitler enzim konjugatlı streptavidinde (Thermo, Streptavidin Peroxidase, katalog numarası: TS-125-HR) 15 dk. muamele edildi.
- j. Tekrar PBS ile 4 kez 5'er dk. süreyle yıkanan kesitler 3,3'Diaminobenzidin (ThermoScientific, LabVision DAB Plus Substrate Staining System, TA-125-HDX) kromojen solüsyonunda kahverengi presipitasyon görülünceye kadar 5-10 dk. bekletildi.
- k. Takiben distile su ile 2-3 kez çalkalanan kesitler çekirdek boyası olan Gill'in Hematoksilen boyası ile 5 dk. boyandı ve çeşme suyunda mavileşinceye kadar 10 dk. yıkandı.
- l. Son olarak tüm kesitler dereceli alkollerden ve ksilenlerden geçirilip entellan (Entellan® new, Merck, 1079610500) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Tablo 3.1. İmmünohistokimya (IHC) ve Western blot (WB) analizinde kullanılan antikordlar ve özellikleri

Mouse	İnsan kökenli AMPKα'nın C-terminal bölgesindeki 251-550 aminoasitleri	sc-74461	IHC: 1/100 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan	38/54/63 kDa	
Rabbit	Fare AMPKα'nın Thr172 fosforilasyon alanından üretilen sentetik fosfopeptid	bs-4002R	IHC: 1/200 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan, Koyun	35/38/44/48/50/63 kDa	
Rabbit	İnsan mTOR'un C bölgesi içindeki diziyi kapsayan rekombinant protein	GTX-101557	IHC: 1/100 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan	289 kDa	
Mouse	İnsan kökenli Ser 2448 fosforile mTOR içeren aminoasit dizilimi	sc-293133	IHC: 1/100 WB: 1/250	İnsan, Fare, Sığan	220 kDa	
Rabbit	SVSVLP..GSQE Amino asidine karşı sentezlenmiş peptid	NBP1-82849	IHC: 1/100 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan	Tuberin 200	
Rabbit	Thr1462'in fosforile alanının etrafındaki insan Tuberin/TSC2	bs-3444R	IHC: 1/200 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan	200 kDa	
Rabbit	İnsan ULK1 aa 930-979 / 1050 içindeki sentetik peptit	NBP2-66765	IHC: 1/200 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan	110-120	
Rabbit	Ser467 fosforilasyon bölgesi etrafında insan ULK1'den türetilen sentezlenmiş peptit	PA5-104676	IHC: 1/200 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan Sığan	140-150	
Mouse	İnsan kökenli MAPLC3'nin iç alanında bulunan 33-56 aminoasit arasındaki epitop alanı	sc-398822	IHC: 1/200 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan	15 kDa	
Rabbit	Bu antikoru üretmek için kullanılan kesin immünojenizitesizdir	ab-52768	IHC: 1/200 WB: 1/2000	İnsan, Fare, Sığan	14 kDa	
Mouse	İnsan kökenli Beclin1'in 1-300 Aminoasiti	sc-48341	IHC: 1/100 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan	60	
Mouse	İnsan kaynaklı SQSTM1'in 151-440 amino asitleri	sc-48402	IHC: 1/100 WB: 1/500	İnsan, Fare, Sığan	65	

3.3.2. Western Blot Analizi

CON, PTU ve PTU+L gruplarındaki sıçanların OB'lerinde otofaji sinyal yolağının bazı proteinlerinin relatif miktarlarının değişip değişmediğini belirlemek için WB analizi kullanıldı.

- a. Total protein ekstraksiyonu için, her bir gruptaki 8 sıçandan alınan sağ ve sol OB doku örnekleri, proteaz inhibitör kokteyli, fosfataz inhibitörü, fenilmetilsülfonil florür (PMSF) ve sodyum ortovanadat içeren soğuk bir RIPA (Radyoimmünopresipitasyon deney tampon solüsyonu) lizis tampon solüsyonu (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Santacruz, CA) içinde ultrasonik bir homojenizatör (Bandelin SONOPULS Mini 20 Ultrasonic Homogenizer) ile lize edildi.
- b. Takiben OB doku örnekleri +4°C'de 15.000 Xg'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi.
- c. Elde edilen tüm lizatların protein konsantrasyonları Lowry testi ile belirlendi.
- d. İncelenecek olan proteinin moleküler ağırlığı dikkate alınarak %7, %8, %10 ve %12'lik jeller hazırlandı.
- e. Eşit miktarda protein numunesi (40 µg) SDS-PAGE koşturuldu.
- f. Jellerde elektroforetik olarak ayrıştırılan proteinler, takiben içinde transfer tamponu (48 mMTris, 39 mMglisin, %5 veya %20 (v/v) metanol) bulunan, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad) Aparatı kullanılarak ıslak transfer yöntemiyle polivinilidendiflorid (PVDF) membranlara (Millipore, Bedford, MA, ABD) aktarıldı.
- g. Transferden sonra membranlar bir bloklama solüsyonuyla [içinde %0.1 Tween-20 bulunan tris buffer salin (TBS) solüsyonunda (TBS-T) hazırlanan %5 yağsız süt tozu] oda sıcaklığında bir saat süreyle bloklandı ve hemen sonrasında primer antikorlarla 4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Tablo 3.1).
- h. Ertesi gün TBS-T solüsyonunda üç kez 10'er dk. yıkanan membranlar HRP (Horseradish peroxidase) ile konjuge edilmiş sekonder antikorlarla [anti-tavşan IgG (sc-2357) veya anti-fare IgG (sc-516102), Santa Cruz Biotechnology, CA, ABD] oda sıcaklığında bir saat süreyle inkübe edildi.
- i. Süre bitiminde tekrar TBS-T'de 5'er dk. 4 kez ve TBS'de 5'er dk. iki kez yıkanan membranlar kemilüminesans (ECL) substratında (Kat: 170-5061, Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA) 5 dakika boyunca inkübe edildi ve kemilüminesans sinyali Chemi Doc™ XRS + Sistemi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak görselleştirildi.

j. Jellere örnek proteinlerin eşit yüklenip yüklenmediğini doğrulamak için membranlar strip solüsyonu ile strip edilip ardından beta-aktin antikoru (sc-69879, Santa Cruz Biotechnology, CA) ile yeniden inkübe edildi. Takiben h ve i’de sıralanan işlemler uygulanarak membranlar görüntülendi.

3.4. İmmünohistokimyasal Boyamaların Semikantitatif Değerlendirilmesi

Otofaji ile ilişkili proteinlerin OB içindeki lokalizasyonu ve immünboyanma özellikleri DP72 kamera ataçmanlı Olympus BX51 marka ışık mikroskopunda (Olympus, Deutschland GmbH, Hamburg, Almanya) $\times 10$ ve $\times 40$ objektif büyütmeleri kullanılarak değerlendirildi. Tez çalışmasında varlığı araştırılan tüm proteinlerin immünboyanma yoğunluklarını belirlemek amacıyla dört skor değerinden oluşan bir yoğunluk puanlama sistemi kullanıldı (Detre ve ark., 1995). Buna göre immün boyanma yoğunluğu skoru (IS);

- negatif (-) [yüksek objektif büyütmesinde ($\times 40$) bile boyanma yok],
- zayıf (+) [sadece yüksek büyütmede ($\times 40$) görülebilir],
- orta (++) [düşük objektif büyütmesinde ($\times 10$) kolayca görülebilir] ve
- kuvvetli veya yoğun (+++) [düşük objektif büyütmesinde ($\times 10$) çarpıcı şekilde görülebilir] olarak kaydedildi.

Olfaktör bulbusun ONL, GL, EPL, MCL ve GCL’deki her bir protein için saptanan pozitif boyanmalar ve bunların lokalizasyonları ayrı ayrı skorlandı. Çalışmada kullanılan otofaji sinyal yolağı proteinlerinin varlık ya da yoklukları ile hücrel lokalizasyonları belirlendiğinden herhangi bir istatistiksel değerlendirme yapılmadı.

3.5. Kantitatif Değerlendirmeler ve İstatistiksel Analiz

Çalışmada Western blot analizleri ile elde edilen kantitatif verilerin istatistik analizi SPSS yazılım programı (versiyon 22.0, Armonk, NY, ABD: IBM Corp.) ile yapıldı. Protein bantlarının dansitometrik analiz sonuçları tüm grafiklerde ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak gösterildi. Veri dağılımının normalliğini doğrulamak için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. İncelenen her bir protein için verilerin normal dağılım gösterdiği

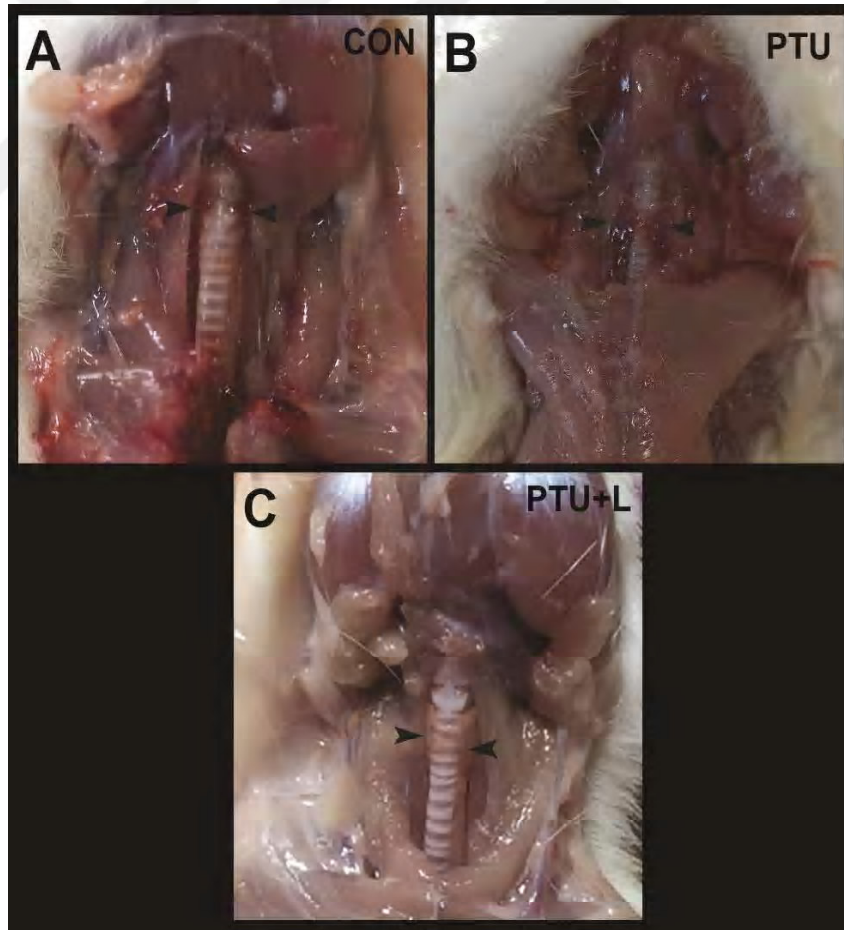
belirlendi. Bu nedenle otofaji sinyal yolağı proteinlerinin göreceli miktarlarındaki farklılıkların önemini belirlemek için tek yönlü varyans analizi (OneWay ANOVA) ve farklılığın hangi deney grubu kaynaklı olduğunu saptamak için ise Post hoc çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi uygulandı. P değeri 0.05'ten küçük olduğunda sonuç istatistiksel önemli olarak yorumlandı.



4. BULGULAR

4.1. Tiroid Bezindeki Morfolojik Değişiklikler

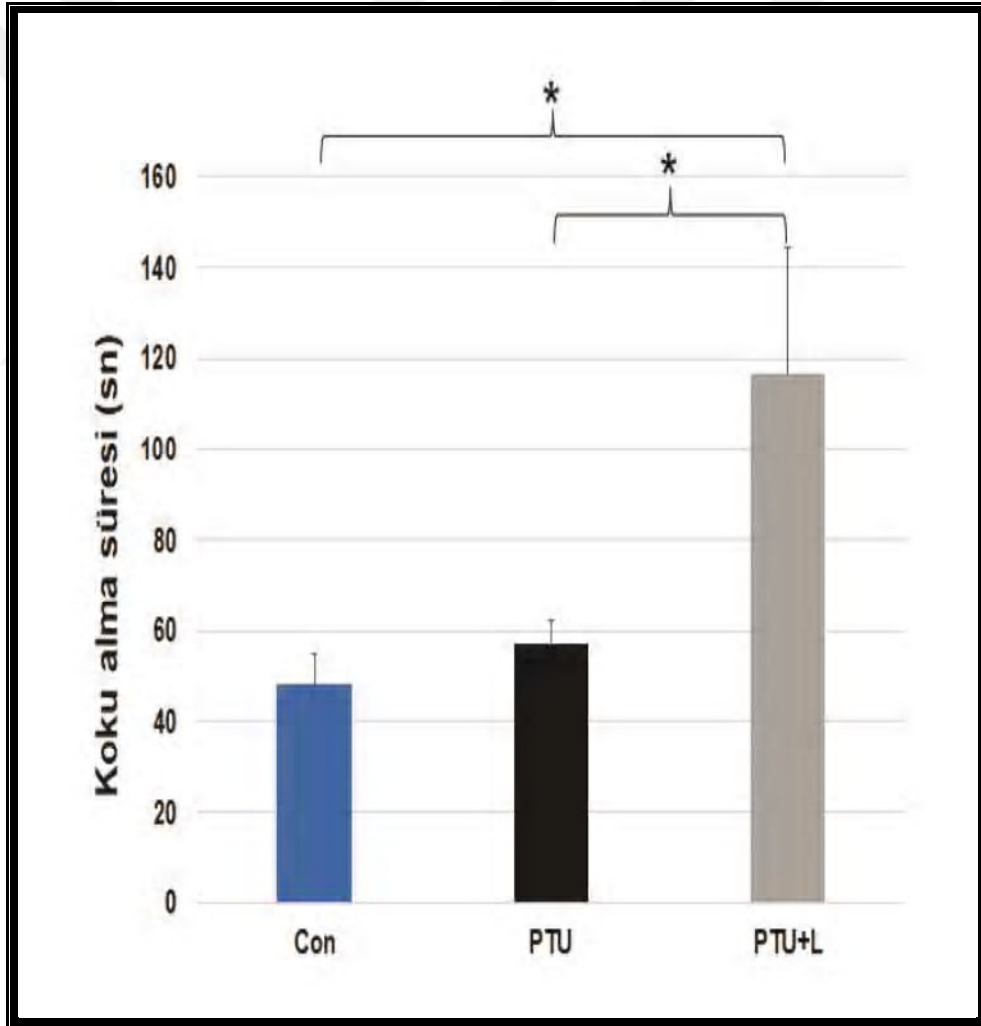
Kontrol (CON), hipotiroidili (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili (PTU+L) sıçanların tiroid bezleri makroskopik olarak görüntülendiğinde hipotiroidili sıçanların tiroid bezlerinin diğer gruplara nazaran oldukça büyük olduğu belirlendi (Şekil 4.1.). Bu veriler deneysel hipotiroidizm modelinin başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1. A: Kontrol (CON), B: Hipotiroidili (PTU) ve C: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili (PTU+L) sıçanların tiroid bezlerinin (ok başları) makroskopik görünümü.

4.2. Koku Deneyi Sonuçları

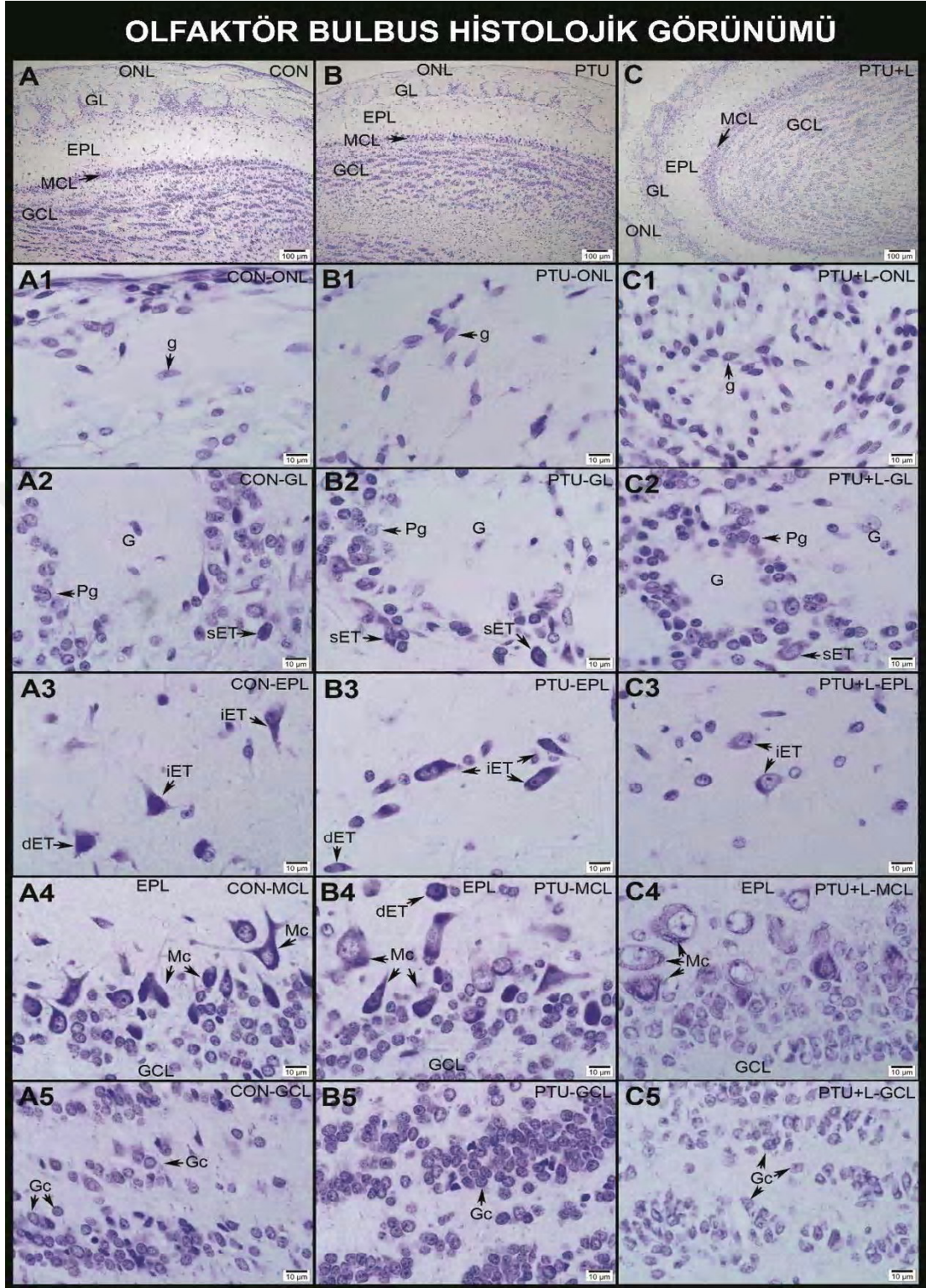
CON, PTU ve PTU+L grubuna ait sıçanların koku alma testi sonuçları Şekil 4.2.'de sunulmaktadır. Her üç gruptaki sıçanlar yemi bulma sürelerine göre düşükten yükseğe doğru sıralandığında sırasıyla en kısa sürenin CON grubunda, en uzun sürenin ise PTU+L grubundaki sıçanlara ait olduğu belirlendi. Deneysel hipotiroidizm oluşturulduktan sonra LT4 ile tedavi edilmiş gruptaki sıçanlara ait ortalama değerin hem CON hem de PTU grubundaki ortalama değerlerden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Deneysel hipotiroidizm oluşturulduktan sonra LT4 ile tedavi edilmiş gruptaki bazı sıçanlardaki değerlerin CON grubundaki sıçanların değerlerine yakın olduğu dikkati çekti.



Şekil 4.2. Kontrol (CON), hipotiroidili (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili (PTU+L) sıçanların koku testi sonuçları. * Gruplar arasındaki farklılığın $P<0.05$ düzeyinde anlamlı olduğunu göstermektedir.

4.3. Olfaktör Bulbus'un Genel Yapısı

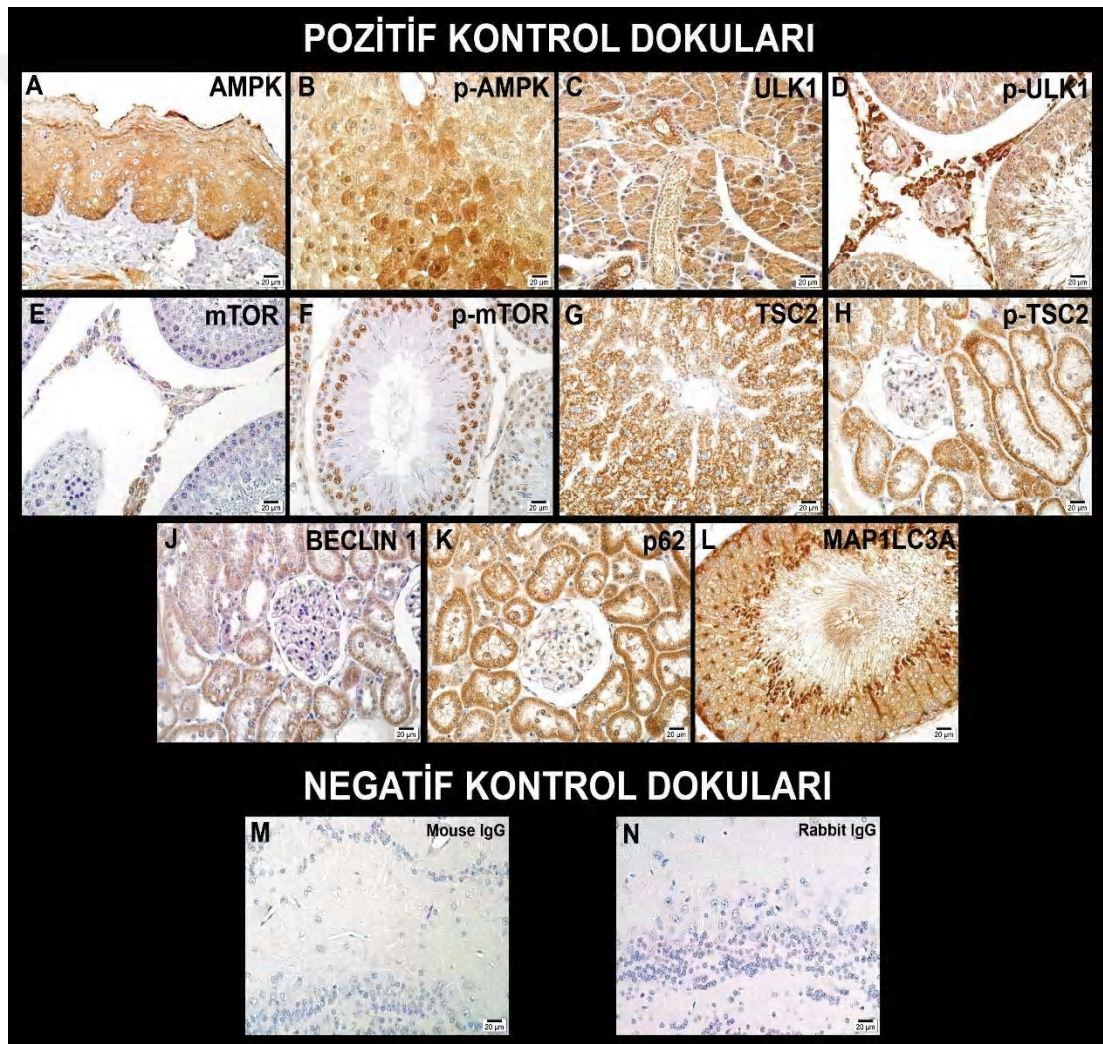
Her gruba ait sıçanlardan alınan OB kesitleri krezil viyole boyaması ile boyanarak incelendiğinde OB'nin dıştan içe doğru ONL, GL, EPL, MCL, IPL ve GCL olmak üzere 6 katmandan oluştuğu görüldü (Şekil 4.3.). Olfaktör mukozadaki olfaktör duyu nöronlarının afferent özellikteki miyelinsiz akson demetleri ile bunlar arasındaki glia hücrelerinin bulunduğu en dış katman olan ONL'nin yapısal olarak gruplar arasında bazı farklılıklar sergilediği tespit edildi. Deneysel hipotiroidizm oluşturulduktan sonra LT4 ile tedavi edilmiş grubu sıçanlarda ONL'nin diğer gruplara göre geniş olduğu ve gliya hücrelerinin miktarının arttığı gözlemlendi (Şekil 4.3. A1, B1, C1). Deney gruplarında kontrol grubuna göre GL'deki glomerüllerin daha küçük olduğu, ancak periglomerüler ve dış püsküllü hücre morfolojilerinin CON grubundakine benzer olduğu görüldü (Şekil 4.3. A2, B2, C2). Dış pleksiform katman, seyrek yerleşimli püsküllü hücre gövdeleriyle karakterize edilen bir katman olmasına karşılık CON grubuna göre PTU+L grubunda daha küçük hücre gövdeleri saptandı (Şekil 4.3. A3 B3, C3). Deneysel hipotiroidizm oluşturulduktan sonra LT4 ile tedavi edilmiş grubun MCL'sinde mitral hücrelerin daha büyük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3. A4, B4, C4). MCL'nin altında yer alan ince bir tabaka olan IPL'nin az miktarda hücre (horizontal hücre) içerdiği ve yapısal olarak tüm gruplarda benzer olduğu tespit edildi (Şekilde gösterilmedi). Granül hücre katmanını oluşturan granül hücrelerin PTU grubunda miktarca arttığı ve büyük kümeler şeklinde dizildiği dikkati çekti (Şekil 4.3. A5, B5, C5).



Şekil 4.3. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus dokularının histolojik görünümü. Krezil viyoleto boyama yöntemi. ONL: Olfaktör Sinir Katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C: 100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10 µm.

4.4. Otofaji ile İlişkili Proteinlerin Ekspresyonları ve İmmünlokalizasyonları

İmmünohistokimya tekniğinde kullanılan AMPK, p-AMPK [fosfo (p)], TSC2, p-TSC2, ULK1, p-ULK1, mTOR, p-mTOR, Beclin 1, SQSTM1/p62, MAPLC3 α/β , MAP1LC3A antikorlarının sıçan dokuları için spesifik olup olmadığını belirlemek için kullanılan pozitif ve negatif kontrol dokularındaki boyanmalar Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. Kontrol ve deney gruplarındaki sıçanların OB'lerinde otofaji ile ilgili proteinlerin immunboyanma yoğunluklarının derecesi incelenen proteine ve OB'nin katmanlarına göre farklılık göstermiş olup, boyanma yoğunlukları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de sunulmuştur.



Şekil 4.4. Sıçan dokularında pozitif (A-L) ve negatif kontrol (M-N) kesitlerinde immün boyanmalar. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. A: AMPK-dil, B: p-AMPK-karaciğer, C: ULK1-pankreas, D: p-ULK1-testis, E: mTOR-testis, F: p-mTOR-testis, G: TSC2-karaciğer, H: p-TSC2-böbrek, J: Beclin 1-böbrek, K: p62-böbrek, L: MAP1LC3A-testis, M: Mouse IgG-olfaktör bulbus, N: Rabbit IgG-olfaktör bulbus. Bar: 20 μ m.

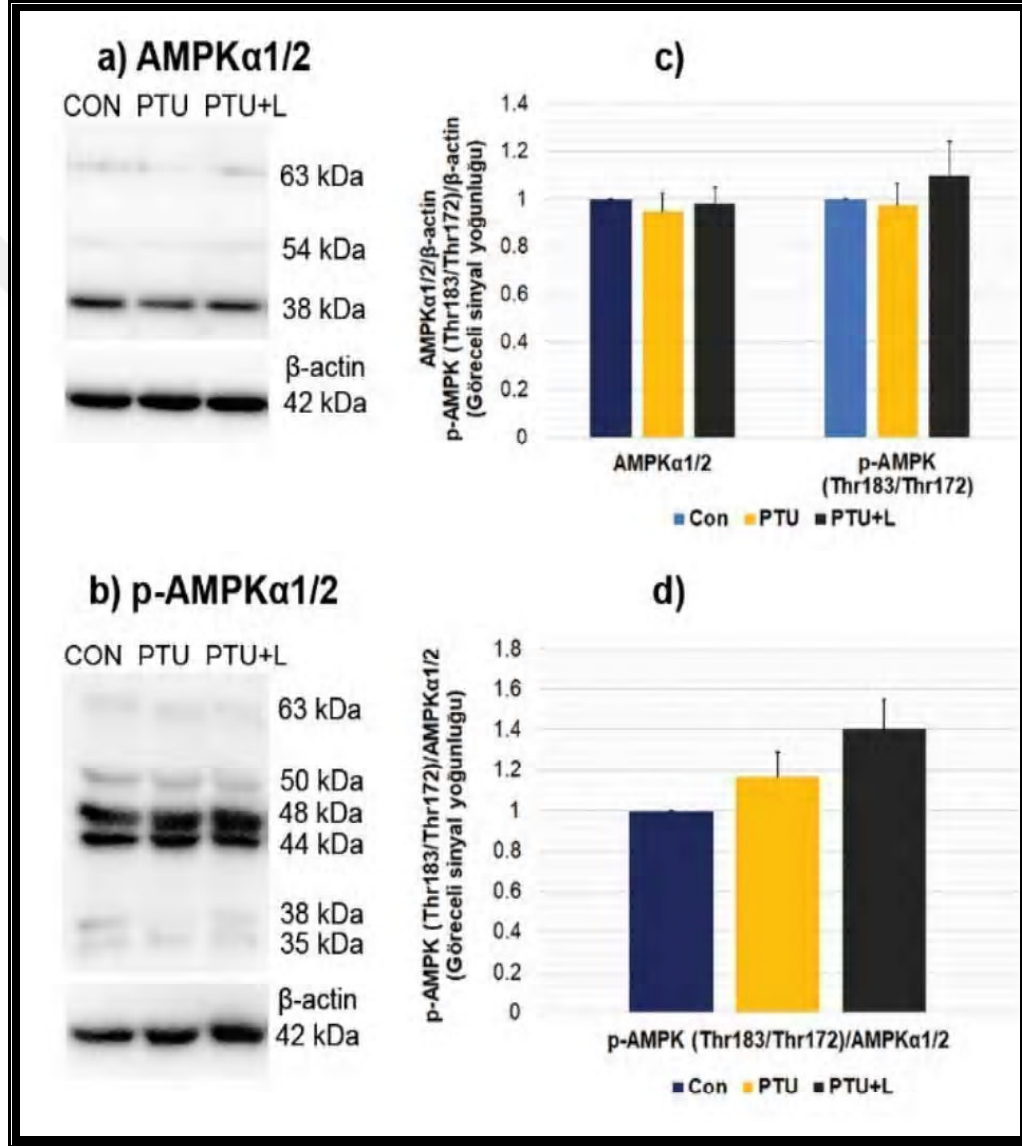
4.4.1. AMPK α 1/2 ve Fosfo-AMPK α 1/2 (Thr183/Thr172) Ekspresyonu ve İmmünlokalizasyonu

Western blot analizleri AMPK α 1/2 ve p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172'nin CON ve deney gruplarındaki sıçanların OB'sinde eksprese edildiğini gösterdi. Şekil 4.5.a ve b'de gösterildiği üzere AMPK α 1/2'nin 38/54/63 kDa ağırlıklarına sahip 3 bant, p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172'nin ise 34/38/44/48/50/63 kDa ağırlıklarına sahip 6 bant sergilediği tespit edildi. Fosfo AMPK'nın 44/48 kDa ağırlıklarına sahip bantlarının diğerlerinden daha yoğun olduğu gözlemlendi. Şekil 4.5.c CON, PTU ve PTU+L gruplarının OB'lerindeki AMPK α 1/2 ve p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172'nin miktarlarını niceliksel olarak karşılaştırmaktadır. Şekil 4.5.d ise p-AMPK'nın AMPK α 1/2'ye oranını (pAMPK α 1/2-Thr183/Thr172/ AMPK α 1/2) göstermektedir. Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz α 1/2'nin göreceli miktarının PTU grubunda diğer gruplara göre düşük olduğu ancak gruplar arası farklılığın istatistiksel açıdan farklı olmadığı belirlendi ($P>0.05$). Fosfo-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172'nin AMPK oranının ise PTU+L grubunda en yüksek olduğu ancak yine gruplar arası farklılıkların önem taşımadığı gözlemlendi ($P>0.05$). Bu sonuçlar PTU+L grubunda AMPK fosforilasyonun daha yüksek olduğunu göstermektedir.

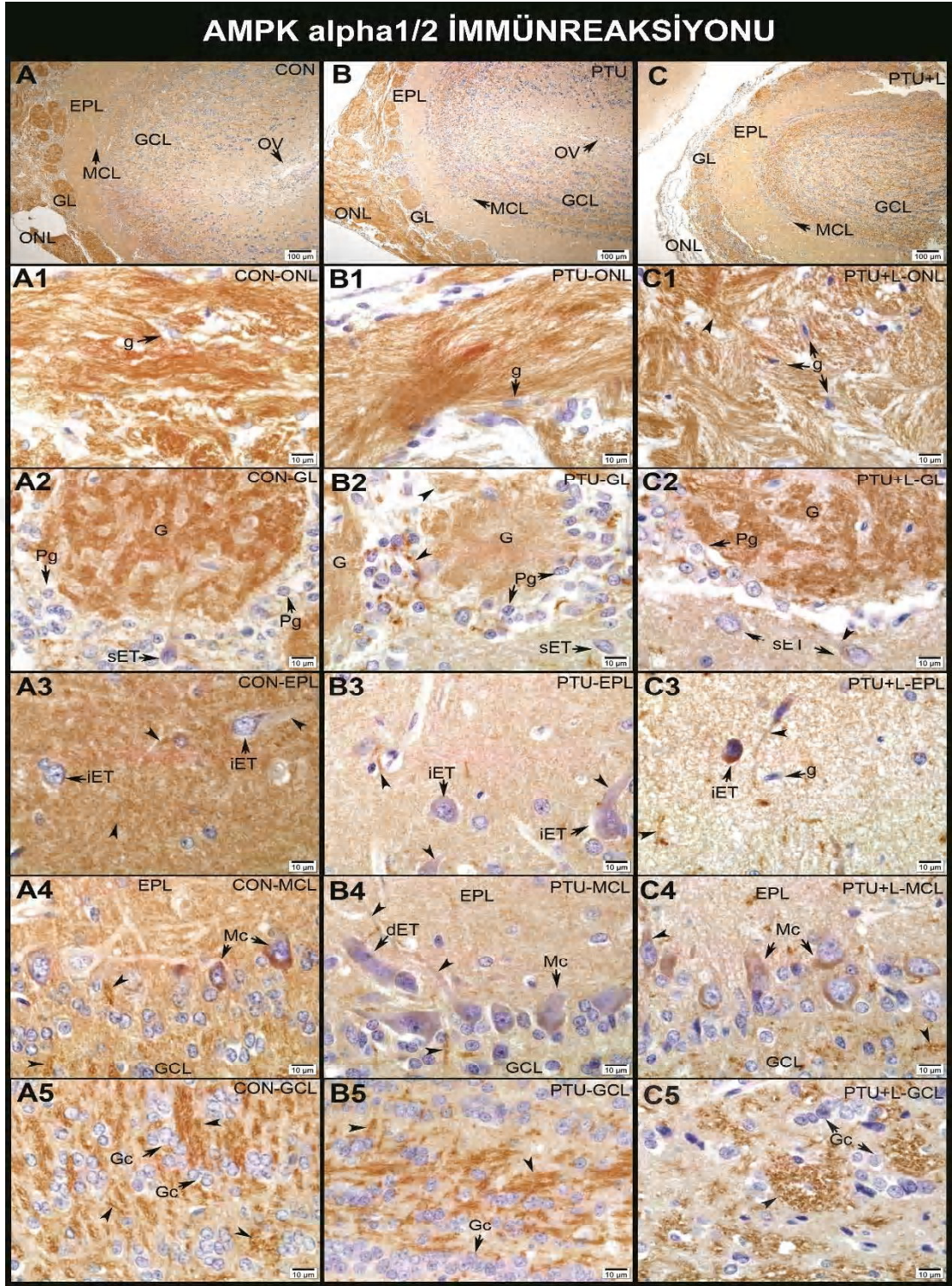
Tüm gruplarda AMPK α 1/2'nin OB'nin her katmanında nöropilde (akson ve dendritlerde) ve püsküllü hücreler ile mitral hücrelerin sitoplazmalarında lokalize olduğu, gliya hücreleri (astrositler) ve granül hücrelerde ise bulunmadığı saptandı. Kontrol ve PTU+L gruplarında ONL ve GL'deki sinir tellerindeki boyanma kuvvetli, PTU+L grubunda da GCL'deki sinir tellerindeki boyanma kuvvetli olarak izlendi. Deneysel hipotiroidizm oluşturulmuş grupta glomerüler nöropildeki boyanma orta dereceli olarak izlendi. PTU+L grubunda ayrıca EPL ve MCL'de bulunan püsküllü hücreler ve MCL'deki mitral hücrelerin sitoplazmalarında kuvvetli, CON grubunda orta derecede, PTU grubunda püsküllü hücrelerde zayıf, mitral hücrelerde orta derece yoğunlukta AMPK immünreaksiyonu gözlemlendi (Şekil 4.6.).

Fosfo-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172'nin OB'de olfaktör sinir telleri katmanındaki sinir telleri, glomerüler nöropil, GCL'deki sinir tellerinde, periglomerüler, püsküllü hücreler ile mitral hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde, bazı granül hücrelerin ise

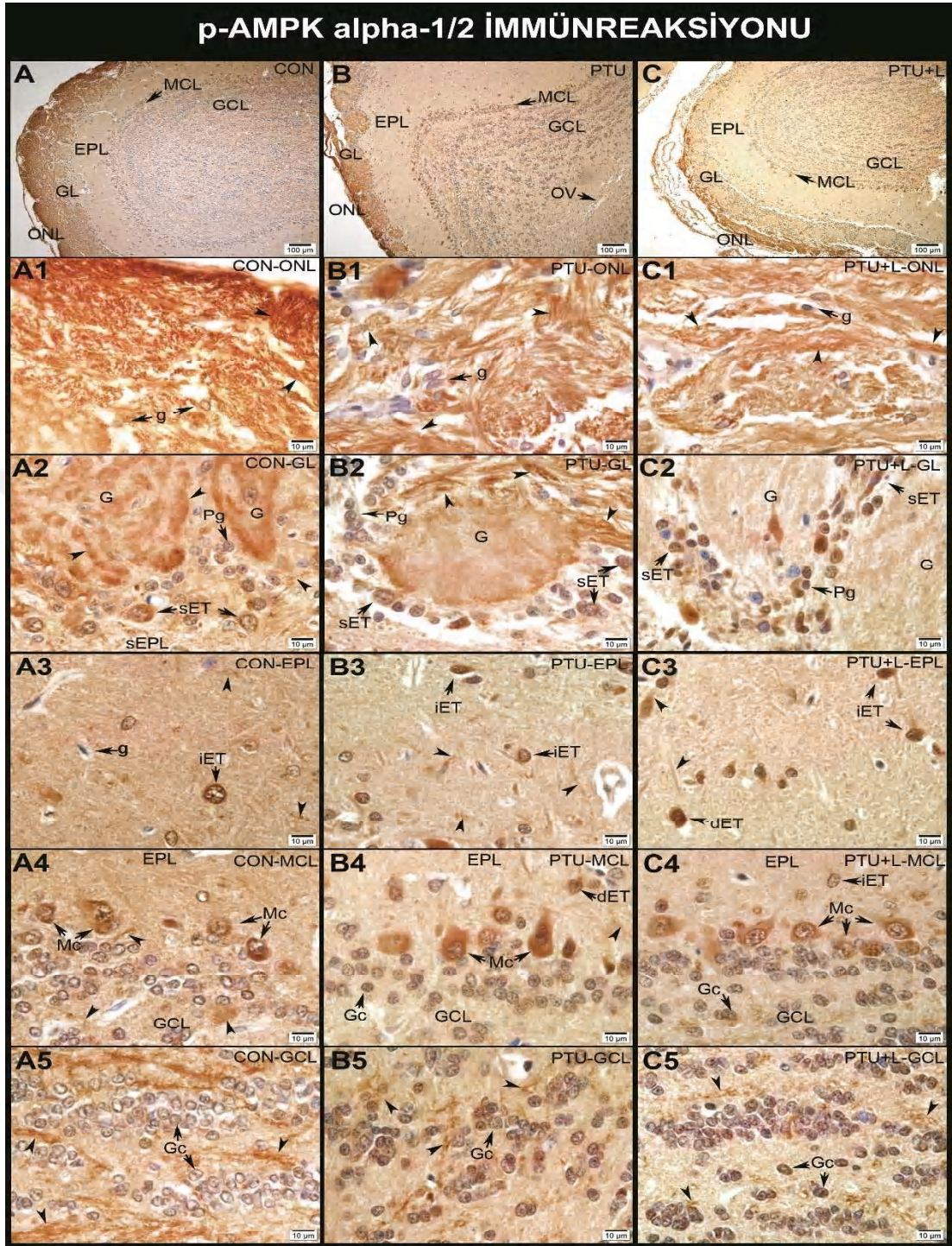
çekirdeklerinde lokalize olduğu belirlendi. Tüm gruplarda mitral hücrelerin somalarının yanı sıra akson ve dentritlerinde p-AMPK immünreaksiyonu oldukça belirgindi. Tüm gruplarda ET hücrelerinin sitoplazmalarında orta şiddette bir boyanmanın baskın olduğu görüldü. Deneysel hipotiroidizm oluşturulmuş grupta mitral hücrelerdeki p-AMPK-pozitif sitoplazma ve çekirdek immünreaksiyonun diğer gruplara göre daha kuvvetli olduğu izlendi (Şekil 4.7.).



Şekil 04.5. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktor bulbusunda AMPK ve p-AMPKα1/2-Thr183/Thr172'nin Western blot analizi. AMPK ve p-AMPKα1/2-Thr183/Thr172'nin göreceli miktarları β-aktin ekspresyonuna normalize edilmiştir. (a ve b) AMPK, p-AMPKα1/2-Thr183/Thr172'nin ve β-aktinin temsili immünoblotu. (c) AMPK ve p-AMPKα1/2-Thr183/Thr172'nin göreceli sinyal yoğunlukları (d) p-AMPK/AMPK oranı. Veriler ortalama ±standart hata (çubuklar, standart hatayı göstermektedir) olarak sunulmuştur. ANOVA ve takiben Tukey'in post hoc testi ile farklılıkların anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde AMPK α 1/2 immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerüler hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; OV: Olfaktör ventrikül; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 μ m, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10 μ m.



Şekil 4.7. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktor bulbus örneklerinde p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172 immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; OV: Olfaktör ventrikül; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 μ m, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10 μ m.

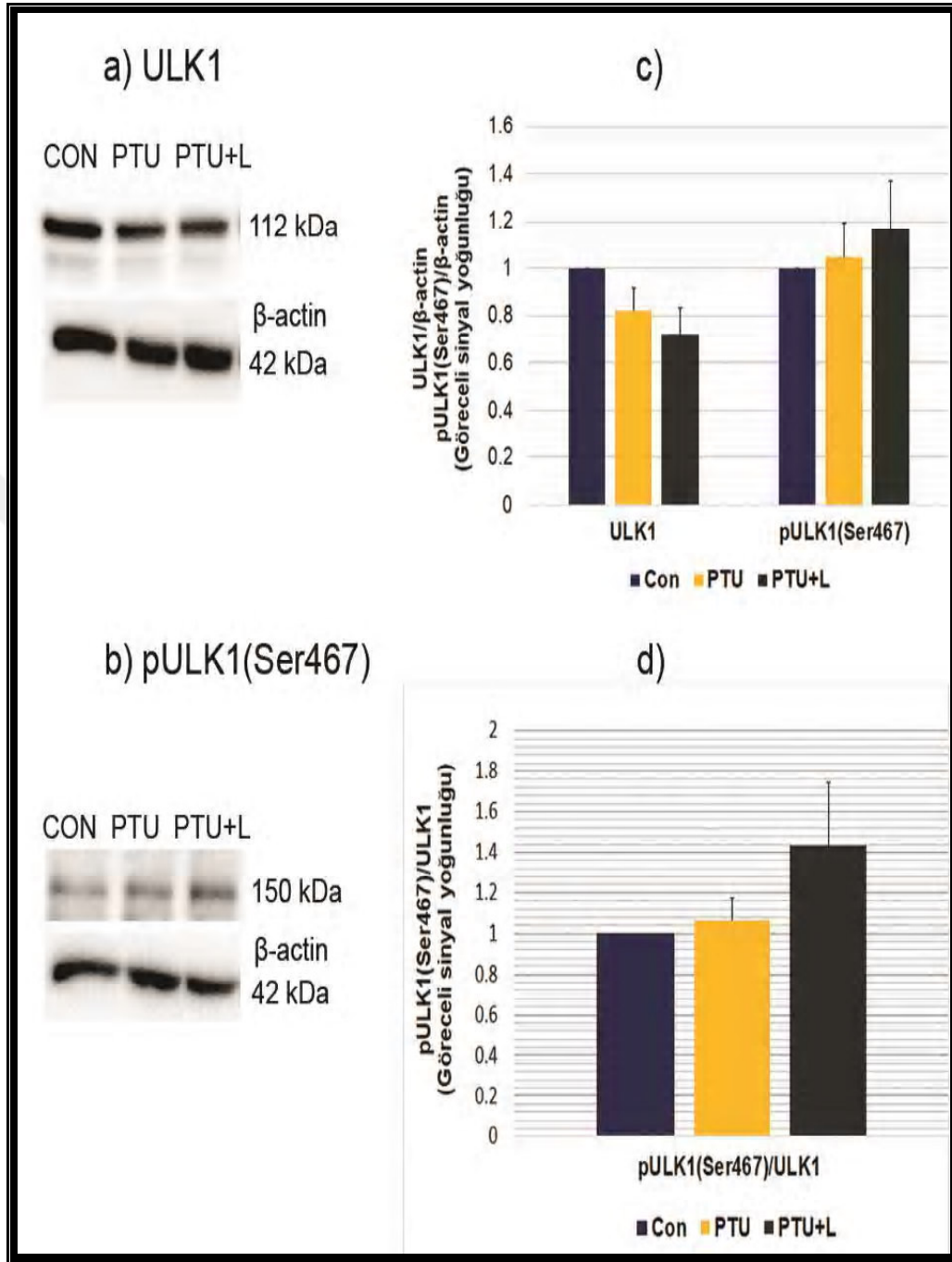
4.4.2.ULK1 ve Fosfo-ULK1 (Ser467) Ekspresyonu ve İmmünlokalizasyonu

Western blot analizleri ULK1 ve p-ULK1 (Ser467)'nin CON ve deney gruplarındaki sıçanların OB'lerinde eksprese edildiğini gösterdi. Şekil 4.8.a ve b'de gösterildiği üzere ULK1'in ~110-120 kDa, p-ULK1 (Ser467)'nin 150 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlendi. Şekil 4.8.c'de CON, PTU ve PTU+L gruplarının OB'lerindeki ULK1 ve p-ULK1 (Ser467)'nin miktarlarını niceliksel olarak karşılaştırmaktadır. Şekil 4.8.d'de ise p-ULK/ULK1'i göstermektedir. ULK1'in göreceli miktarının CON grubunda ise en yüksek, PTU+L grubunda en düşük olduğu, pULK1 (Ser467)'nin ise, CON grubunda en düşük PTU+L grubunda en yüksek olduğu görüldü. Fosfo ULK1/ULK1 oranı ise PTU+L grubunda en yüksek olarak bulundu. Ancak bu farklılıkların istatistiksel önem taşımadığı tespit edildi ($P>0.05$). Bununla birlikte bu sonuçlar özellikle PTU+L grubunda daha belirgin olmak üzere her iki deney grubunda ULK1'in Ser467'de fosforile olarak aktifleştiğini göstermektedir.

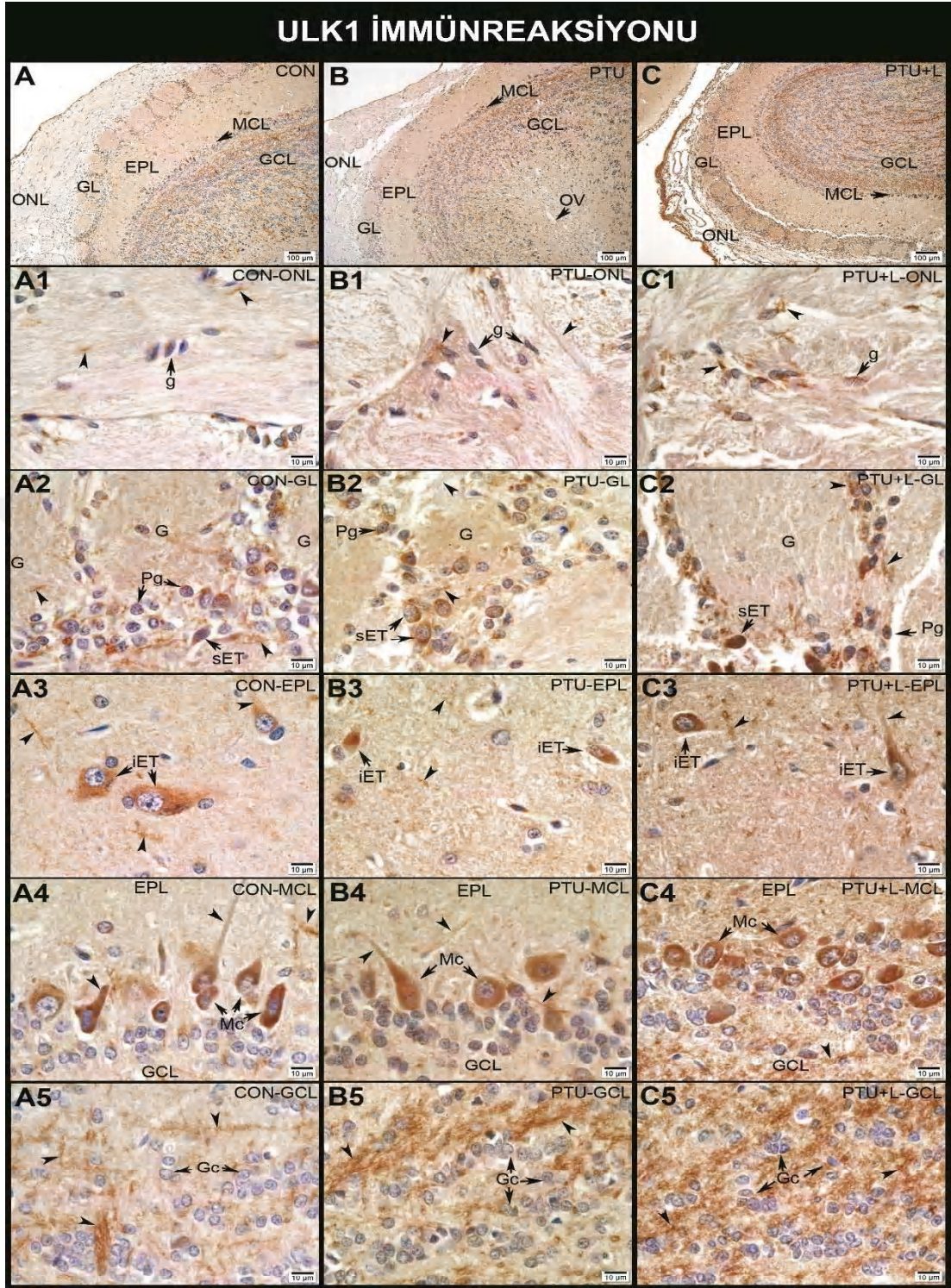
Tüm gruplarda ULK1 immünreaksiyonunun OB'nin ONL'sini oluşturan sinir tellerinde negatif ya da zayıf olduğu, ancak bu katmandaki gliya hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli pozitif olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra diğer katmanlardaki bazı akson ve dendritlerin ve özellikle de GCL'deki sinir tellerinin kuvvetli ULK1-pozitif olduğu dikkati çekti. Glomerüler katmanda nöropildeki ULK1 reaksiyonu CON ve PTU gruplarında orta dereceli iken, PTU+L grubunda zayıf olarak izlendi. Periglomerüler, püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmaları ULK1 için pozitif reaksiyon sergilerken GCL'deki granül hücrelerde reaksiyonun negatif olduğu tespit edildi. Mitral hücrelerdeki reaksiyon CON grubunda deney grubundakilere göre daha yoğun olarak izlendi (Şekil 4.9.).

Fosfo-ULK1 (Ser467) için immün boyanmaların OB'nin periglomerüler, püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde lokalize olduğu gözlemlendi. Genel olarak ONL katmanının sinir tellerinde reaksiyon negatif iken glomerüler nöropilde PTU+L grubunda orta derecede pozitif bir reaksiyon görüldü. Granül hücrelerinde p-ULK1 (Ser467) immünreaksiyonu CON grubunda negatif iken, her iki deney grubunda bazı hücrelerin çekirdeklerinde orta dereceli pozitif olarak izlendi. Ayrıca PTU grubunda püsküllü ve mitral hücrelerdeki çekirdek boyanmasının sitoplazmik reaksiyondan daha kuvvetli olduğu, PTU+L grubunda ise sitoplazma ve çekirdekdeki immünreaksiyonun

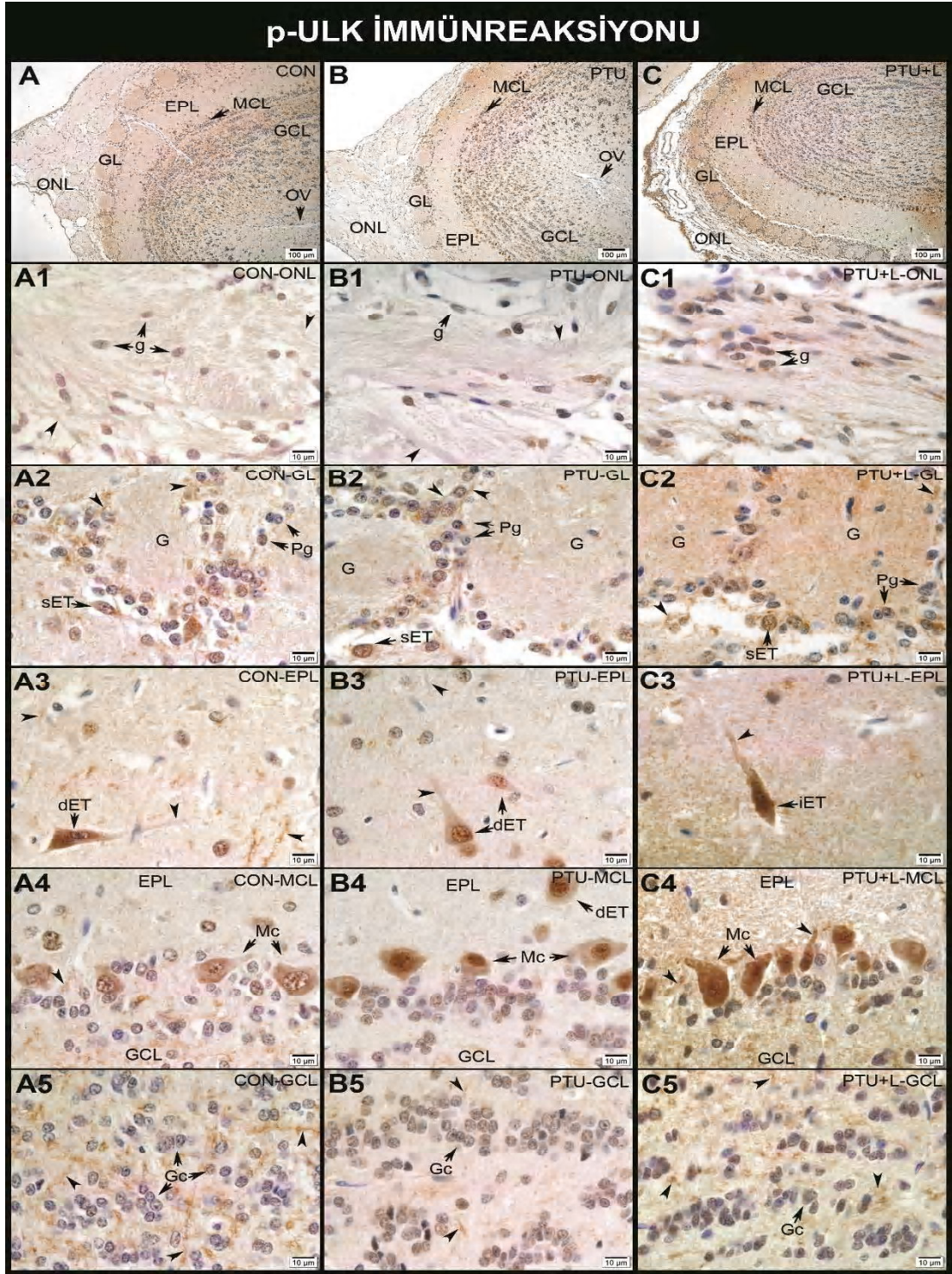
da kuvvetli olduğu dikkati çekti (Şekil 4.10.).



Şekil 04.8. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktör bulbusunda ULK1 ve p-ULK1 (Ser467)'nin Western blot analizi. ULK1 ve p-ULK1 (Ser467)'nin göreceli miktarları β -aktin ekspresyonuna normalize edilmiştir. (a ve b) ULK1, p-ULK1 (Ser467)'nin ve β -aktinin temsili immünoblotu. (c) ULK1 ve p-ULK1 (Ser467)'nin göreceli sinyal yoğunlukları (d) p-ULK1/ULK1 oranı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata (çubuklar, standart hatayı göstermektedir) olarak sunulmuştur. ANOVA ve takiben Tukey'in post hoc testi ile farklılıkların anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktor bulbus örneklerinde ULK1 immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; OV: Olfaktör ventrikül; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.



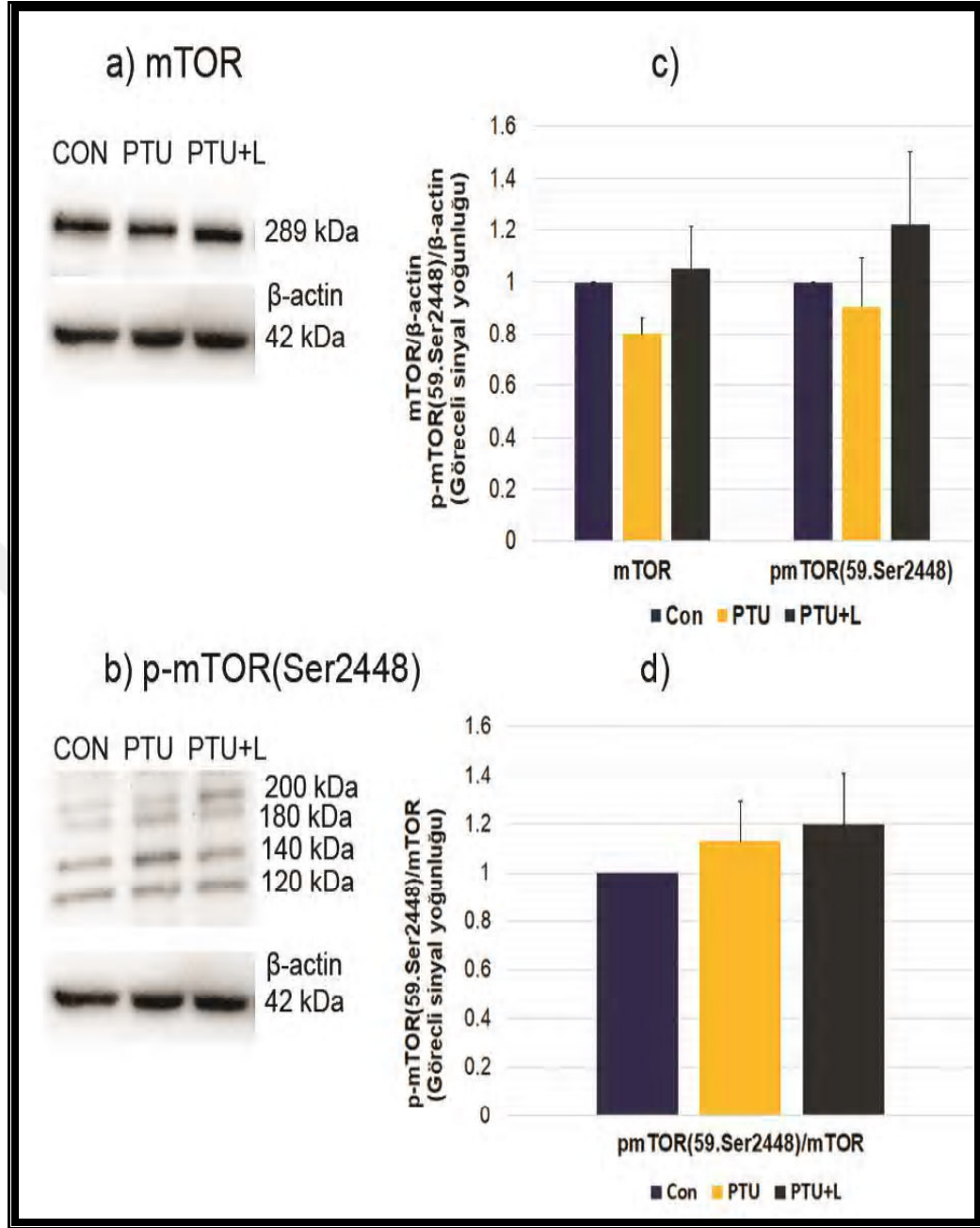
Şekil 4.10. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktor bulbus örneklerinde p-ULK1 (Ser467) immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktor sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; OV: Olfaktör ventrikül; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.

4.4.3. mTOR ve Fosfo-mTOR (59.Ser2448) Ekspresyonu ve İmmünlokalizasyonu

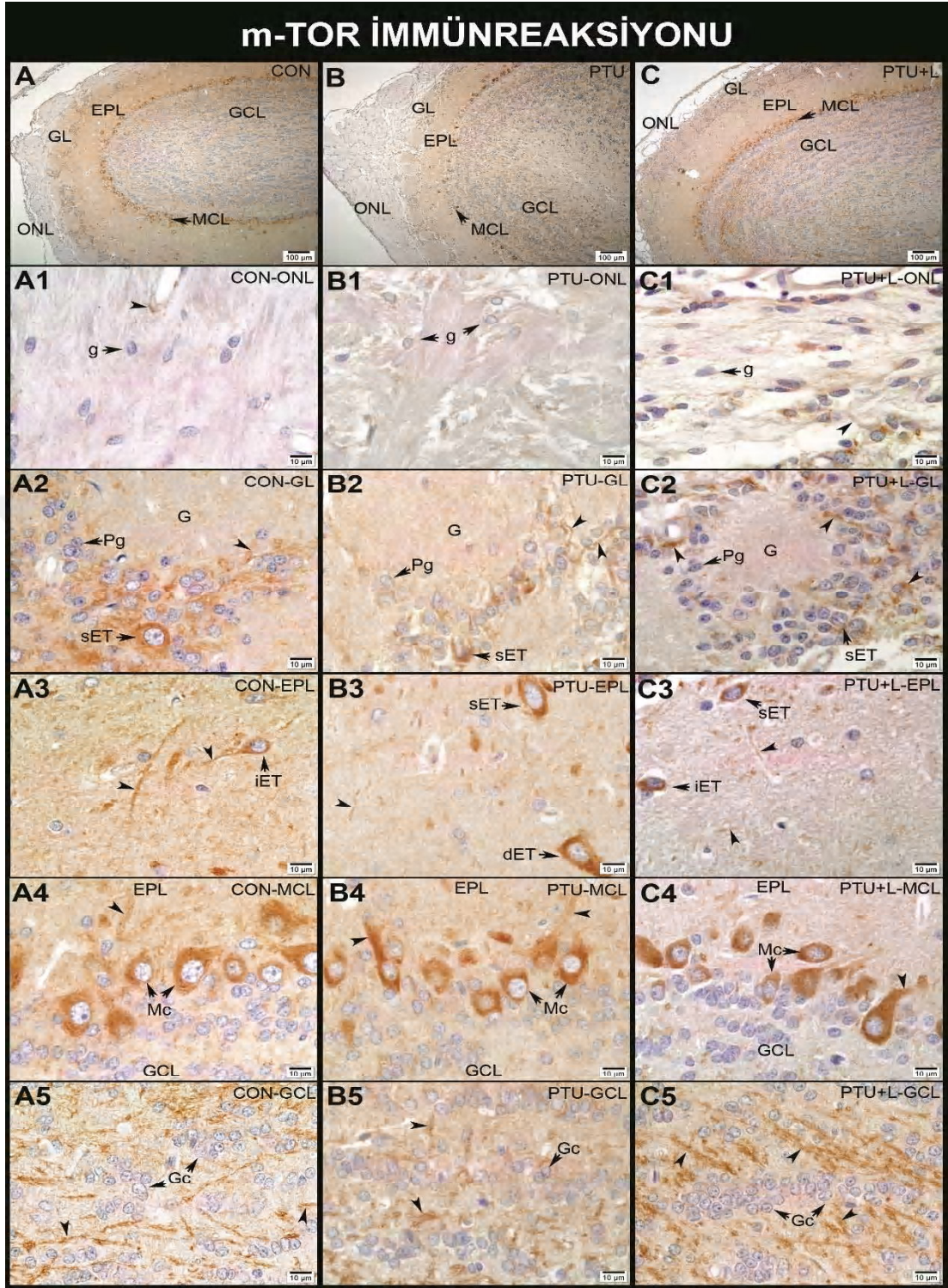
Western blot analizleri mTOR ve p-mTOR'nin (59.Ser2448) CON ve deney gruplarındaki sıçanların OB'sinde eksprese edildiğini gösterdi. Şekil 4.11.a ve b'de gösterildiği üzere mTOR'nin 289 kDa ağırlıklarına sahip bir bant, p-mTOR'nin (59.Ser2448) ise ~200/180/140 ve 120 kDa ağırlıklarına sahip çok sayıda bant sergilediği saptandı. Şekil 4.11.c'de CON, PTU ve PTU+L gruplarının OB'lerindeki mTOR ve p-mTOR'nin (59.Ser2448) miktarlarını niceliksel olarak karşılaştırılmaktadır. Şekil 4.11.d'de ise p-mTOR/mTOR oranı gösterilmektedir. WB analiz sonuçları mTOR ekspresyonunun PTU grubunda en düşük, PTU+L grubunda ise en yüksek olduğu belirlendi. Fosfo-mTOR/mTOR oranının her iki deney grubunda CON grubundakinden daha yüksek olduğu dolayısıyla da deney gruplarında mTOR fosforilasyonunun gerçekleştiği tespit edildi. Bununla birlikte CON ve deney grupları arasında farklılıklar önemsiz bulundu ($P>0.05$).

Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi reaksiyonunun ONL'sinde sinir telleri ile gliya hücrelerinde ve glomerüler nöropilde negatif olduğu saptandı. Bununla birlikte diğer katmanlardaki nöropilde bulunan akson ve dendritlerde mTOR için orta derecede pozitif immünreaksiyon gözlemlendi. Ancak PTU+L grubunda GCL'deki sinir tellerindeki mTOR reaksiyonunun kuvvetli olduğu ve diğer gruplardakilerden farklı olarak bu sinir tellerinin demetler oluşturduğu ve miktarca da fazla olduğu görüldü. Periglomerüler, püsküllü ve mitral hücrelerde mTOR reaksiyonunun sitoplazmada yerleştiği, tüm gruplarda mitral hücrelerdeki kuvvetli pozitif boyanma yoğunluğunun benzer olduğu, ancak püsküllü hücrelerin CON ve PTU+L grubunda PTU grubuna göre daha yoğun boyandığı tespit edildi (Şekil 4.12.).

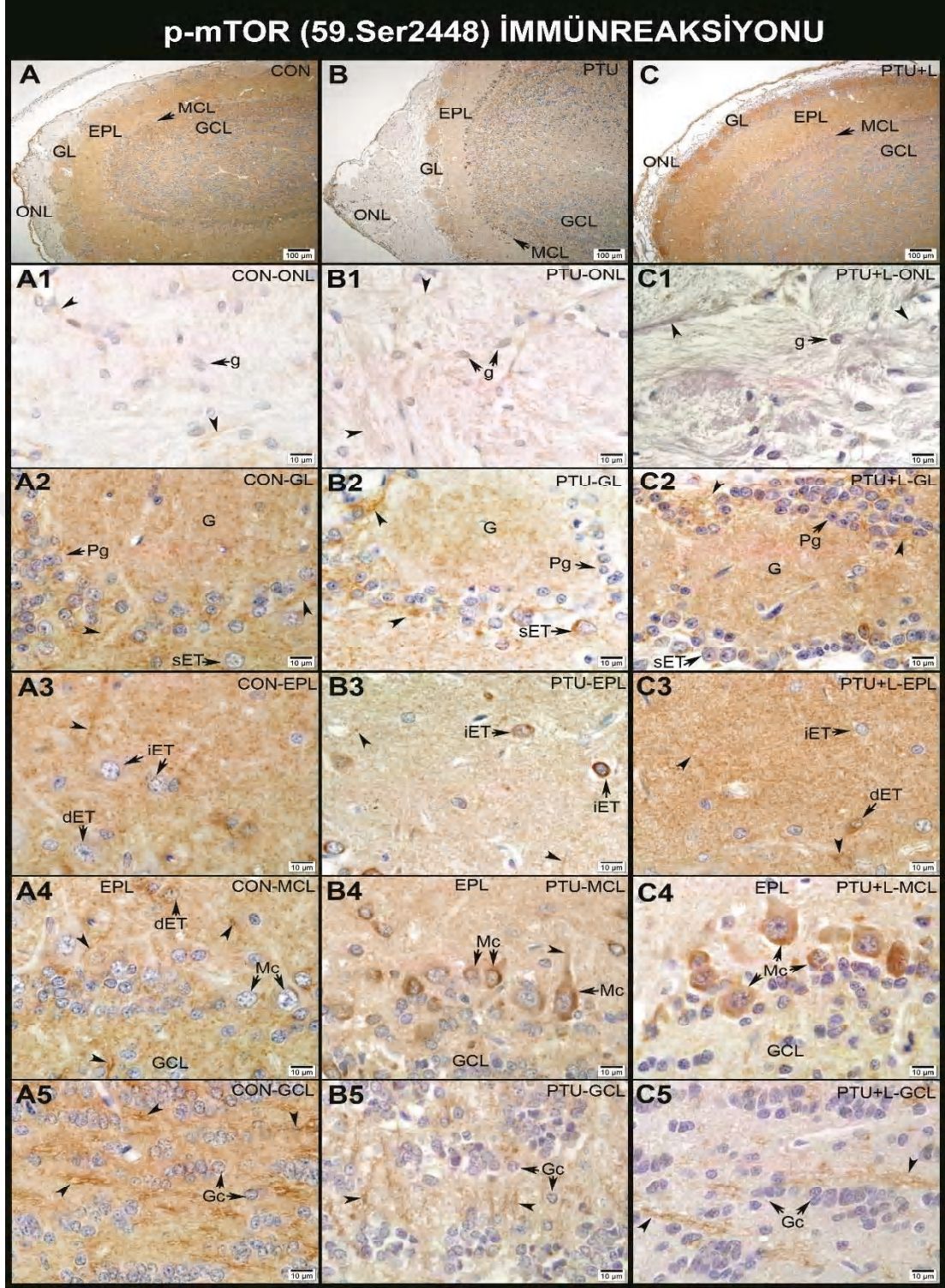
Fosfo-mTOR (59.Ser2448) immünreaksiyonunun OB'de sinir telleri katmanındaki sinir telleri ile gliya hücrelerinde ve periglomerüler hücrelerde bulunmadığı, ancak glomerüler ve diğer katmanların nöropilinde PTU grubunda zayıf, CON ve PTU+L grubunda orta derecede olduğu tespit edildi. Kontrol grubunda sadece mitral hücrelerde orta derecede sitoplazmik reaksiyon görülürken, PTU ve PTU+L gruplarında püsküllü ve mitral hücrelerde kuvvetli olarak izlendi. Ayrıca CON ve PTU+L gruplarında GCL'de sinir tellerindeki boyanmanın orta derece olduğu tespit edildi (Şekil 4.13.).



Şekil 04.11. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktor bulbusunda mTOR ve p-mTOR'nin (59.Ser2448) Western blot analizi. mTOR ve p-mTOR'nin (59.Ser2448) göreceli miktarları β-aktin ekspresyonuna normalize edilmiştir. (a ve b) mTOR, p-mTOR (59.Ser2448) ve β-aktinin temsili immünoblotu. (c) mTOR ve p-mTOR'nin (59.Ser2448) göreceli sinyal yoğunlukları (d) p-mTOR/mTOR oranı. Veriler ortalama ±standart hata (çubuklar, standart hatayı göstermektedir) olarak sunulmuştur. ANOVA ve takiben Tukey'in post hoc testi ile farklılıkların anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.12. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde mTOR immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.



Şekil 4.13. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktor bulbus örneklerinde p-mTOR (59. Ser2448) immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktor sınır katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.

Tablo 4.1. Kontrol (CON), Hipotiroidi (PTU) ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların OB’inde, AMPK, p-AMPK, ULK1, p-ULK1, mTOR ve p-mTOR proteinlerinin yerleşimleri ve boyanma yoğunlukları (np: nöropil, c: sitoplazma, n: çekirdek, - : negatif boyanma, +: zayıf boyanma, ++: orta derecede boyanma, +++: güçlü boyanma)

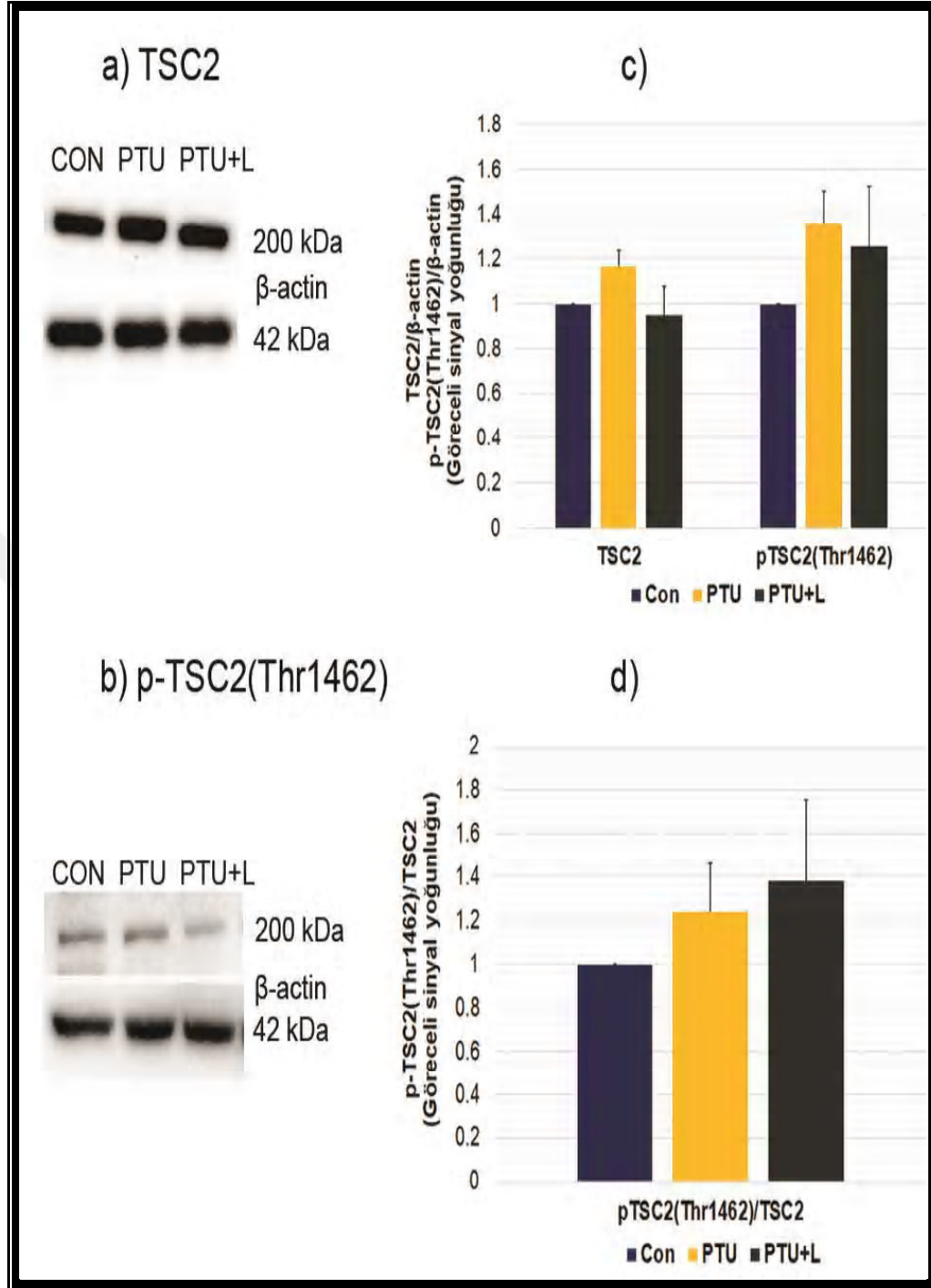
Protein	Grup	ONL	GL	EPL	MCL	GCL
AMPK	CON	gc:- np:+++	c:- np:+++	c:+++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:++
	PTU	gc:- np:+++	c:- np:++	c:+ np:++	c:++ np:++	c:- np:++
	PTU+L	gc:- np:+++	c:- np:+++	c:++ np:++	c:++ np:++	c:- np:+++
p-AMPK	CON	n:- gc:- np:+++	n:+ c:+ np:+++	n:+ c:++ np:++	n:+++ c:++ np:+++	n:+ c:- np:+++
	PTU	n:- gc:- np:+++	n:+ c:+ np:+++	n:+ c:++ np:++	n:+++ c:+++ np:+++	n:+ c:- np:+++
	PTU+L	n:- gc:- np:+++	n:+ c:+ np:+++	n:+ c:++ np:++	n:+++ c:++ np:+++	n:+ c:- np:+++
ULK1	CON	gc:+++ np:-	c:++ np:++	c:++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:+++
	PTU	gc:+++ np:+	c:++ np:++	c:++ np:++	c:++ np:++	c:- np:+++
	PTU+L	gc:+++ np:+	c:++ np:+	c:++ np:++	c:++ np:++	c:- np:+++
p-ULK1	CON	n:- gc:- np:-	n:+ c:+ np:+	n:++ c:++ np:+	n:++ c:++ np:+	n:- c:- np:+
	PTU	n:- gc:- np:-	n:+++ c:++ np:+	n:+++ c:++ np:+	n:+++ c:++ np:+	n:++ c:- np:+
	PTU+L	n:- gc:- np:-	n:+ c:+ np:++	n:+++ c:+++ np:+	n:+++ c:+++ np:+	n:++ c:- np:+
mTOR	CON	gc:- np:-	c:+ np:-	c:+++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:++
	PTU	gc:- np:-	c:+ np:-	c:++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:++
	PTU+L	gc:- np:-	c:+ np:-	c:+++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:+++
p-mTOR	CON	gc:- np:-	c:- np:+4	c:- np:++	c:++ np:++	c:- np:++
	PTU	gc:- np:-	c:- np:+	c:+++ np:+	c:+++ np:+	c:- np:+
	PTU+L	gc:- np:-	c:- np:+	c:+++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:++

4.4.4. TSC2 ve Fosfo-TSC2 (Thr1462) İmmünlokalizasyonu ve Ekspresyonu

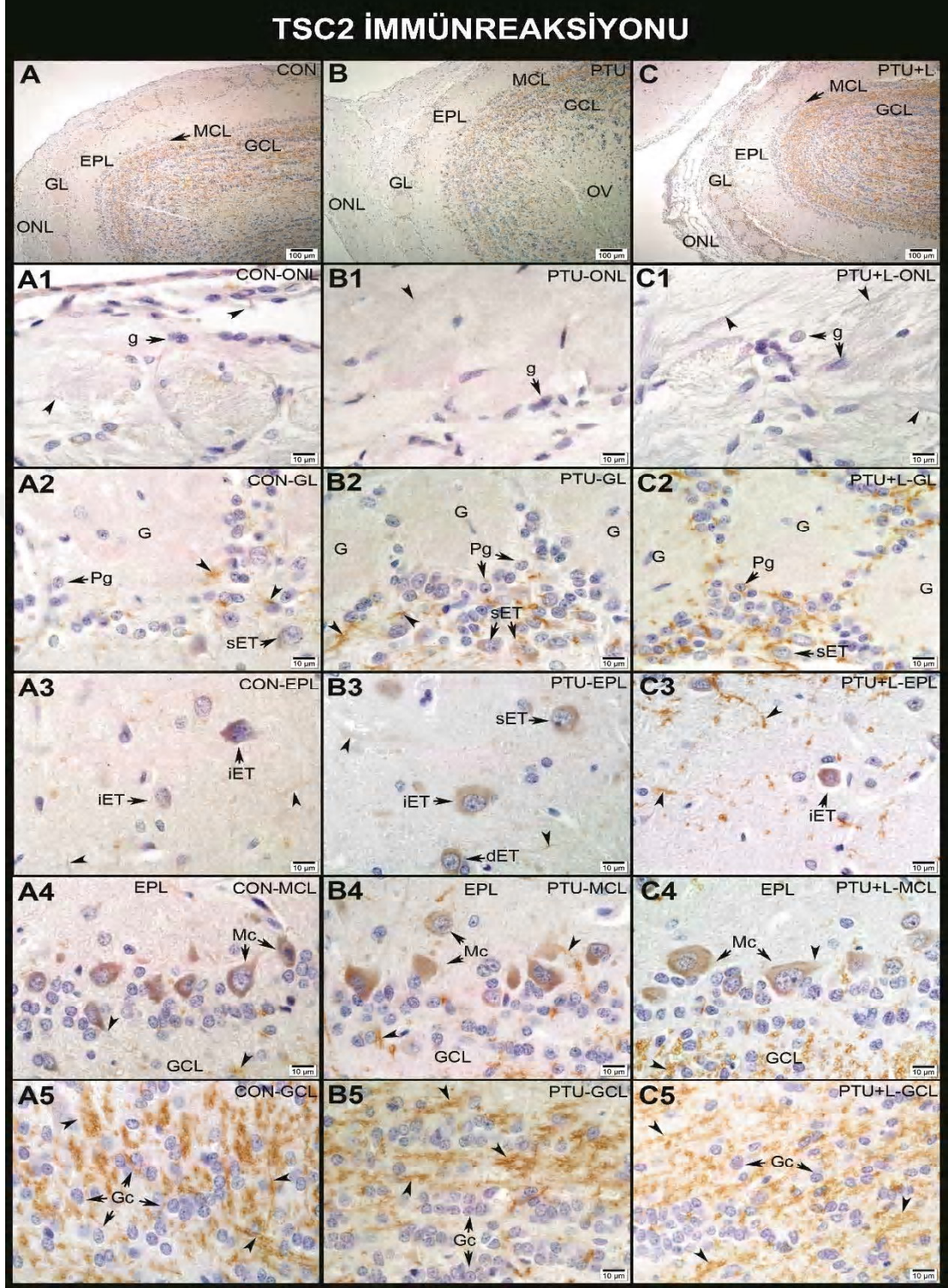
Western blot analizleri TSC2 ve p-TSC2 (Thr1462)'nin CON ve deney gruplarındaki sıçanların OB'sinde eksprese edildiğini gösterdi. Şekil 4.14.a ve b'de görüldüğü üzere TSC2 ve p-TSC2 (Thr1462)'nin 200 kDa ağırlıklarına sahip band sergilediği tespit edildi. Şekil 4.14.c'de CON, PTU ve PTU+L gruplarının OB'lerindeki TSC2 ve p-TSC2 (Thr1462)'nin miktarlarını niceliksel olarak karşılaştırmaktadır. Şekil 4.14.d ise p-TSC2(Thr1462)/TSC2 oranını göstermektedir. TSC2'nin göreceli miktarının PTU grubunda CON grubuna göre arttığı, PTU+L grubunda ise azaldığı, p-TSC2'nin ise her iki deney grubunda artış eğilimi gösterdiği belirlendi. Deney gruplarında CON grubuna göre artan fosforilasyon oranı saptanmış olup bu PTU ve PTU+L gruplarında TSC2'nin Thr1462'de fosforile olarak inhibe olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte CON ve deney grupları arasında farklılıklar istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($P>0.05$).

İmmünohistokimyasal analizde TSC2'nin püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmalarında ve GL, EPL, MCL'sindeki akson ve dendritler ile GCL'deki sinir tellerinde eksprese olduğu görüldü. Gruplara göre TSC2'nin boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında püsküllü hücrelerdeki boyanmanın tüm gruplarda orta şiddette, mitral hücrelerde ise PTU grubunda kuvvetli diğer gruplarda ise orta derecede olduğu belirlendi. Granül hücre katmanında sinir tellerindeki TSC2 pozitif boyanmanın CON ve PTU grubunda kuvvetli olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15.).

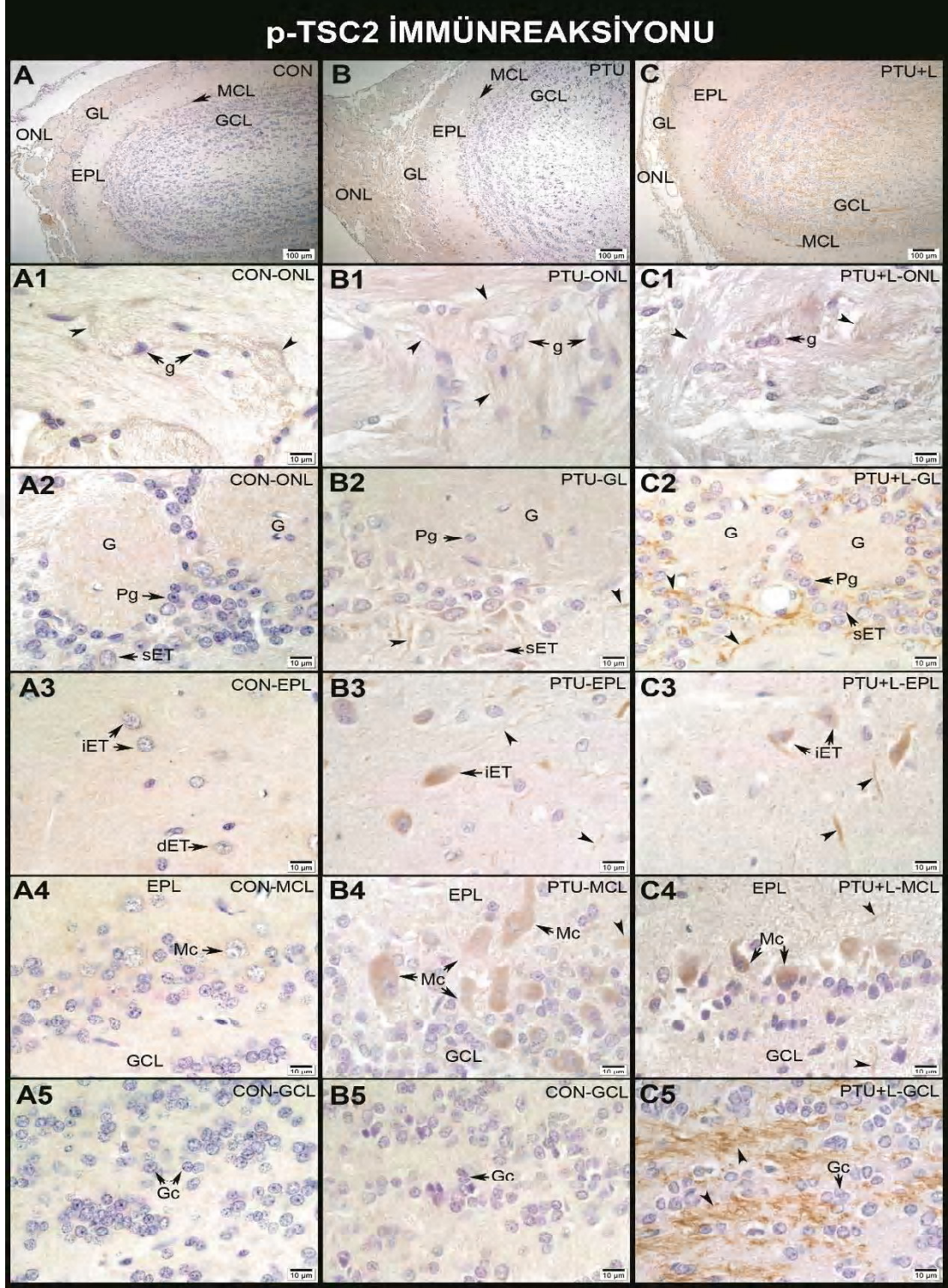
Fosfo-TSC2 (Thr1462)'nin PTU ve PTU+L grubunda püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmasında, glomerüller etrafındaki akson veya dendritlerde orta derecede boyanma sergilediği, CON grubunda hücrelerde negatif, glomerüler nöropil, EPL ve, MCL nöropilinde de zayıf reaksiyon verdiği tespit edildi. Ayrıca p-TSC2'nin sadece PTU+L grubun GCL'sindeki aksonlarda pozitif immün boyanma sergilediği dikkati çekti (Şekil 4.16.).



Şekil 04.14. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktor bulbusunda TSC2 ve p-TSC2 (Thr1462)'nin Western blot analizi. TSC2 ve p-TSC2 (Thr1462)'nin göreceli miktarları β -aktin ekspresyonuna normalize edilmiştir. (a ve b) TSC2, p-TSC2 (Thr1462)'nin ve β -aktinin temsili immünoblotu. (c) TSC2 ve p-TSC2 (Thr1462)'nin göreceli sinyal yoğunlukları (d) p-TSC2/TSC2 oranı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata (çubuklar, standart hatayı göstermektedir) olarak sunulmuştur. ANOVA ve takiben Tukey'in post hoc testi ile farklılıkların anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.15. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde TSC2 immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; OV: Olfaktörik ventrikül; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.



Şekil 4.16. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde p-TSC2 (Thr1462) immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.

4.4.5. Beclin 1 ve p62/SQSTM1'in Ekspresyonu ve İmmünlokalizasyonu

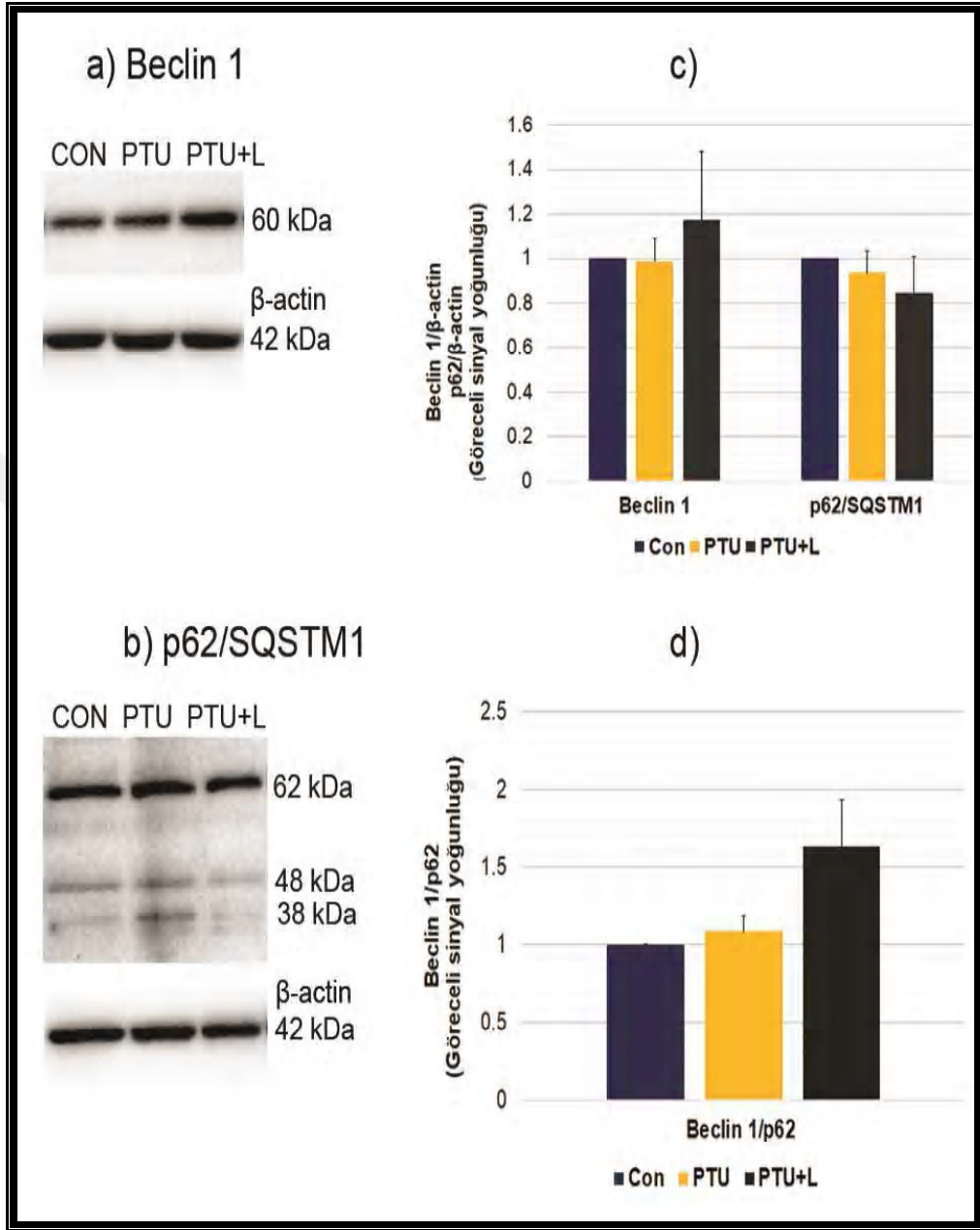
Western blot analizleri Beclin 1 ve p62/SQSTM1'in CON ve deney gruplarındaki sıçanların OB'sinde eksprese edildiğini gösterdi. Şekil 4.17.a'da gösterildiği üzere Beclin 1 için 60 kDa moleküler ağırlığına sahip bir bant elde edildi. Genel olarak P62'nin moleküler ağırlığının 48/38 kDa (izoformuna bağlı olarak) olduğu bilinmesine karşılık, western blot analizinde kullanılan insan kaynaklı SQSTM1'in 151-440 amino asitlerine karşı hazırlanmış olan p62/SQSTM1 antikoru ile sırasıyla 48/38 ve 62-65 kDa civarında üç band saptandı (Şekil 4.17.b). Çoğu çalışmada 62 kDa moleküler ağırlığa sahip bandın p62/SQSTM1'i tanımlandığı bildirildiğinden ve bu bandın densitometrik yoğunluğu diğer bantlardan daha yüksek olduğundan çalışmada bu bandın densitometrik analiz değerleri p62/SQSTM1 için veri olarak kullanıldı. Şekil 4.17.c CON, PTU ve PTU+L gruplarının OB'lerindeki Beclin 1 ve p62/SQSTM1'in miktarlarını niceliksel olarak karşılaştırmaktadır. Şekil 4.17.d ise Beclin 1/p62/SQSTM1'i göstermektedir.

PTU+L grubunda Beclin 1 ekspresyonunun göreceli miktarı CON ve PTU grubundakinden daha yüksek, p62/SQSTM1 ekspresyonu ise PTU+L grubunda ise diğer gruplardan daha düşük bulundu. Bunun yanı sıra Beclin 1/p62 oranının PTU+L grubunda en yüksek CON grubunda ise en düşük olduğu gözlemlendi. Ancak tüm bu verilere ilişkin olarak gruplar arası farklılıkların anlamlı olmadığı ($P>0.05$) tespit edildi.

Beclin 1'in CON grubunda sadece mitral hücrelerde, PTU+L grubunda da hem püsküllü hem de mitral hücrelerde zayıf bir boyanma sergilediği, bununla birlikte tüm gruplarda glomerüller etrafındaki ve diğer katmanlardaki bazı akson ve dendritlerde kuvvetli olduğu görüldü. Deneysel hipotiroidizm oluşturulduktan sonra LT4 ile tedavi edilmiş grupta glomerüller etrafındaki ve GCL katmanındaki Beclin 1-pozitif sinir teli miktarının diğer gruplardakinden daha fazla olduğu dikkati çekti (Şekil 4.18.).

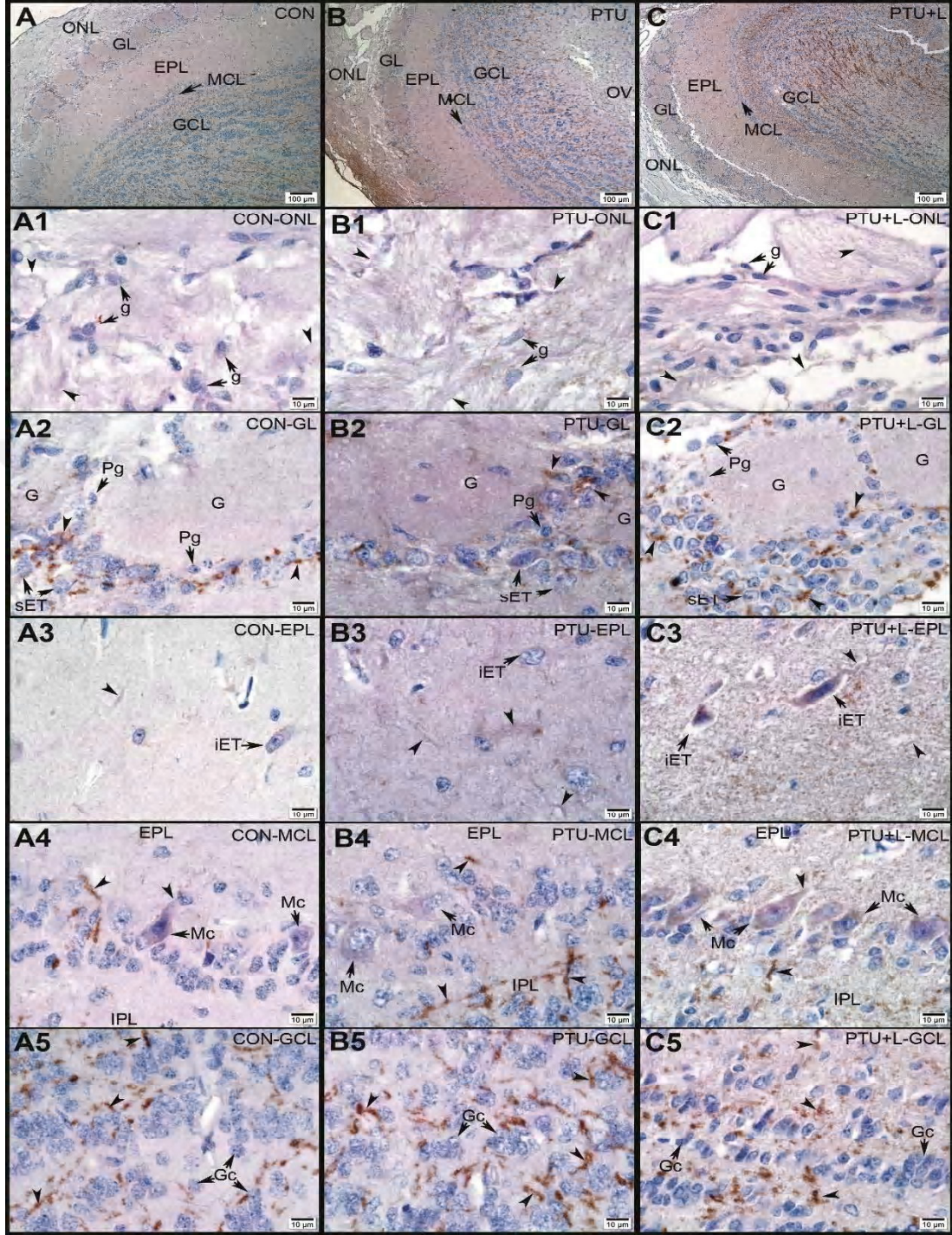
P62/SQSTM1'in glomerüler ve diğer katman nöropillerinde, gliya, püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmalarında ve GL, EPL, MCL'deki akson veya dendritlerde ve GCL'deki sinir tellerinde lokalize olduğu belirlendi. Kontrol grubunda glomerüler nöropildeki boyanma kuvvetli pozitif iken, PTU grubunda orta derecede, PTU+L

grubunda ise zayıf olarak gözlemlendi. Ayrıca tüm gruplarda püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmalarında reaksiyonların kuvvetli olduğu görüldü (Şekil 4.19.).

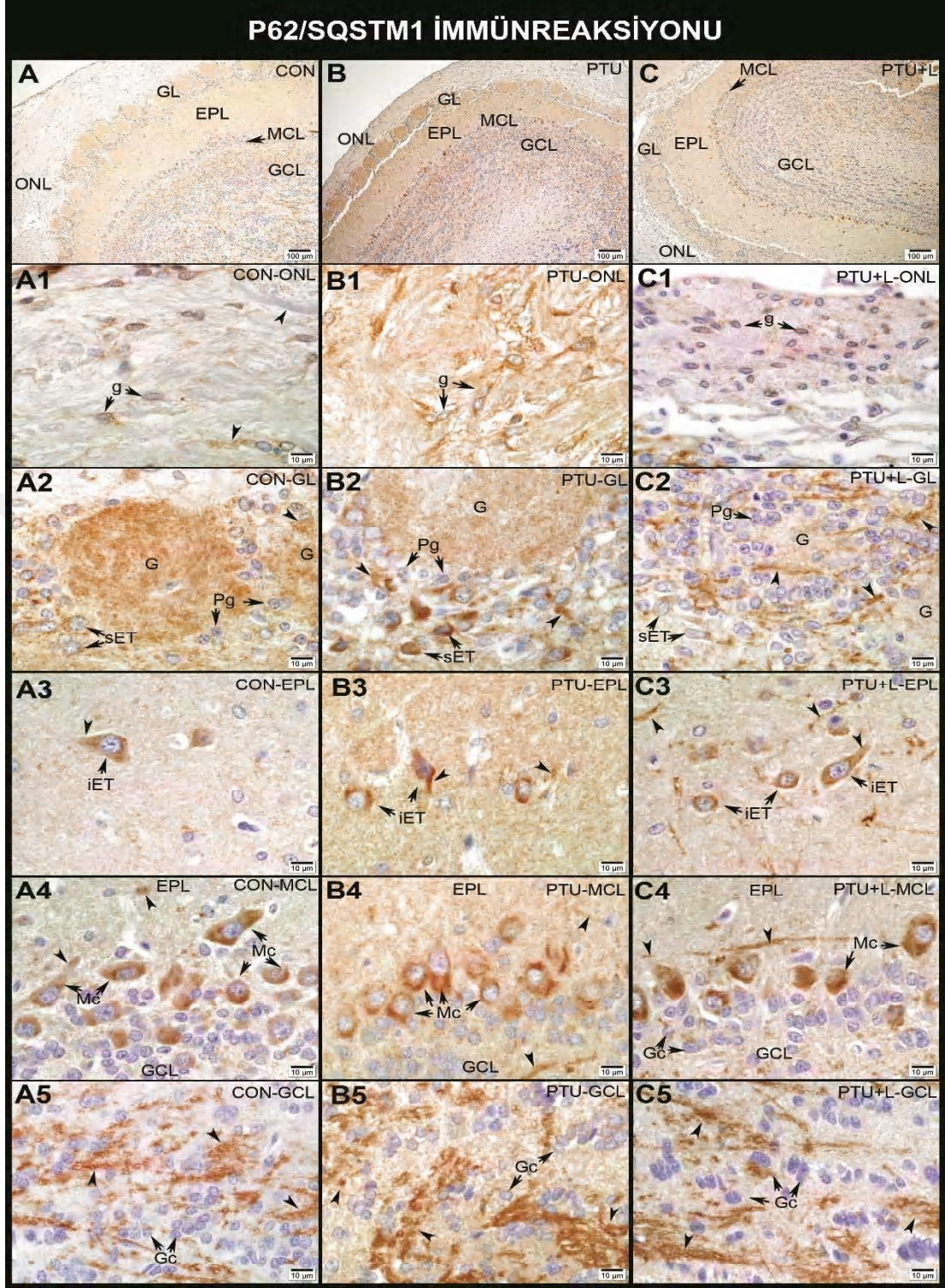


Şekil 04.17. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktör bulbusunda Beclin 1 ve p62/SQSTM1'in Western blot analizi. Beclin 1 ve p62/SQSTM1'in göreceli miktarları β-aktin ekspresyonuna normalize edilmiştir. (a ve b) Beclin 1, p62/SQSTM1'in ve β-aktinin temsili immünoblotu. (c) Beclin 1 ve p62/SQSTM1'in göreceli sinyal yoğunlukları (d) Beclin 1'in p62/SQSTM1'e oranı. Veriler ortalama ±standart hata (çubuklar, standart hatayı göstermektedir) olarak sunulmuştur. ANOVA ve takiben Tukey'in post hoc testi ile farklılıkların anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.

BECN/Beclin1 İMMÜNREAKSİYONU



Şekil 4.18. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde Beclin 1 immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; IPL: İç Pleksiform Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.



Şekil 4.19. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktor bulbus örneklerinde P62/SQSTM1 immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktor sınır katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.

4.4.6. MAPLC3 α/β ve MAP1LC3A'nın İmmünlolokalizasyonu ve Ekspresyonu

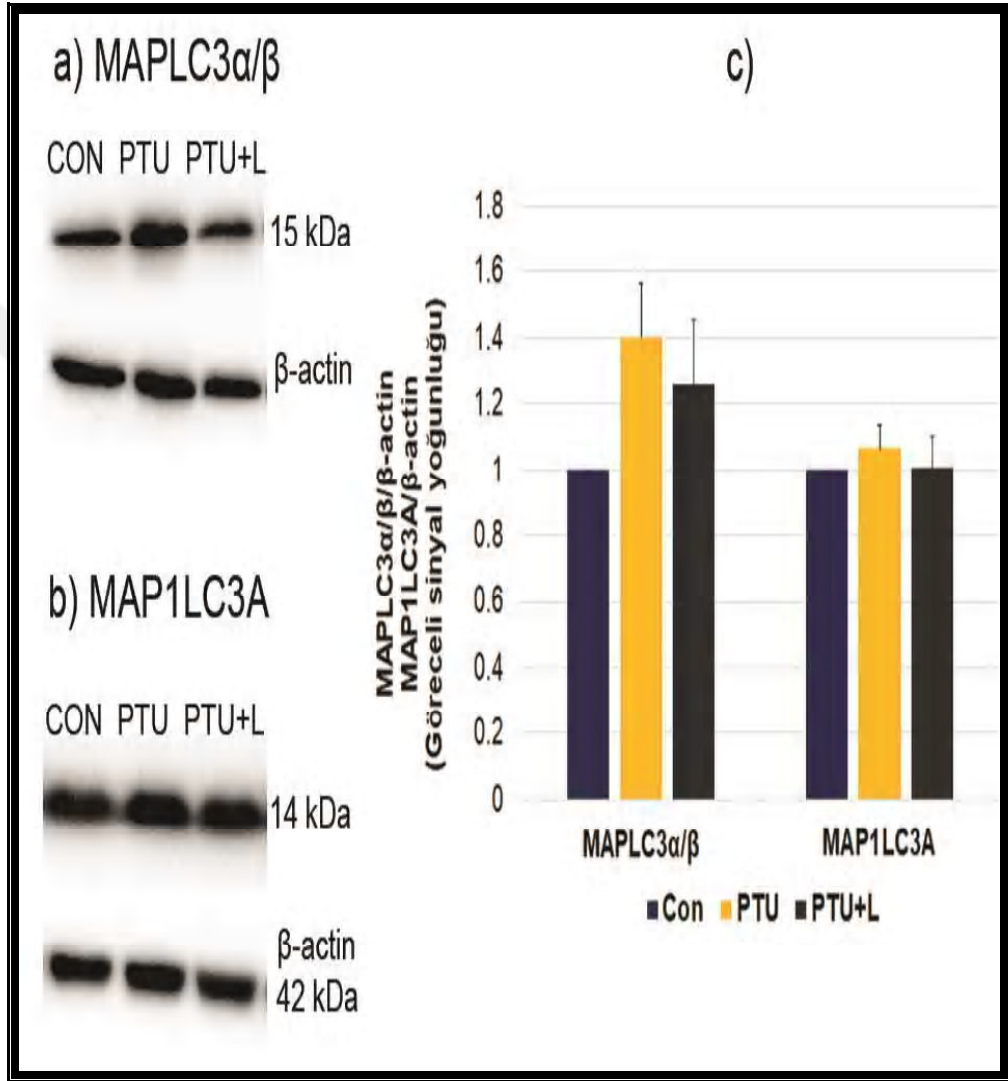
Kontrol, PTU ve PTU+L grubundaki sıçanlardan alınan OB dokularında otofagozomun şekillenmesinin önemli belirteci olarak kabul edilen LC3'ün ekspresyon ve lokalizasyonlarındaki olası değişiklikler western blot analiz ve immünohistokimya teknikleriyle incelendi. Çalışmada iki farklı firma tarafından üretilen MAPLC3 α/β ve MAP1LC3A adlı antikorlar kullanıldı. Bunlardan MAPLC3 α/β (G-4), insan kaynaklı MAPLC3 β 'nın bir iç bölgesi içinde 33-56 amino asitleri arasındaki epitop haritalamasına spesifik bir fare monoklonal antikorudur. Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3A antikorunun üretilmesinde kullanılan kesin immünojen dizisi hakkındaki bilgi tescilli olduğundan bilinmemektedir. Bu antikor otofagozom belirteci olarak tanımlanmış olup tavşanda hazırlanmış rekombinant monoklonal antikordur.

Western blot analizi kullanılan her iki LC3 antikorunun CON ve deney gruplarındaki sıçanların OB'sinde eksprese edildiğini gösterdi. Şekil 4.20.a ve b'de gösterildiği üzere her iki bandın yaklaşık 14-15 kDa ağırlığında tek bant sergilediği tespit edildi. Şekil 4.20.c CON, PTU ve PTU+L gruplarının OB'lerindeki MAPLC3 α/β ve MAP1LC3A miktarlarını niceliksel olarak karşılaştırmaktadır. Her iki antikorun ekspresyonlarının göreceli miktarlarının CON grubunda en düşük, PTU grubunda ise en yüksek olduğu, ancak bu farklılıkların önemli olmadığı ($P>0.05$) tespit edildi.

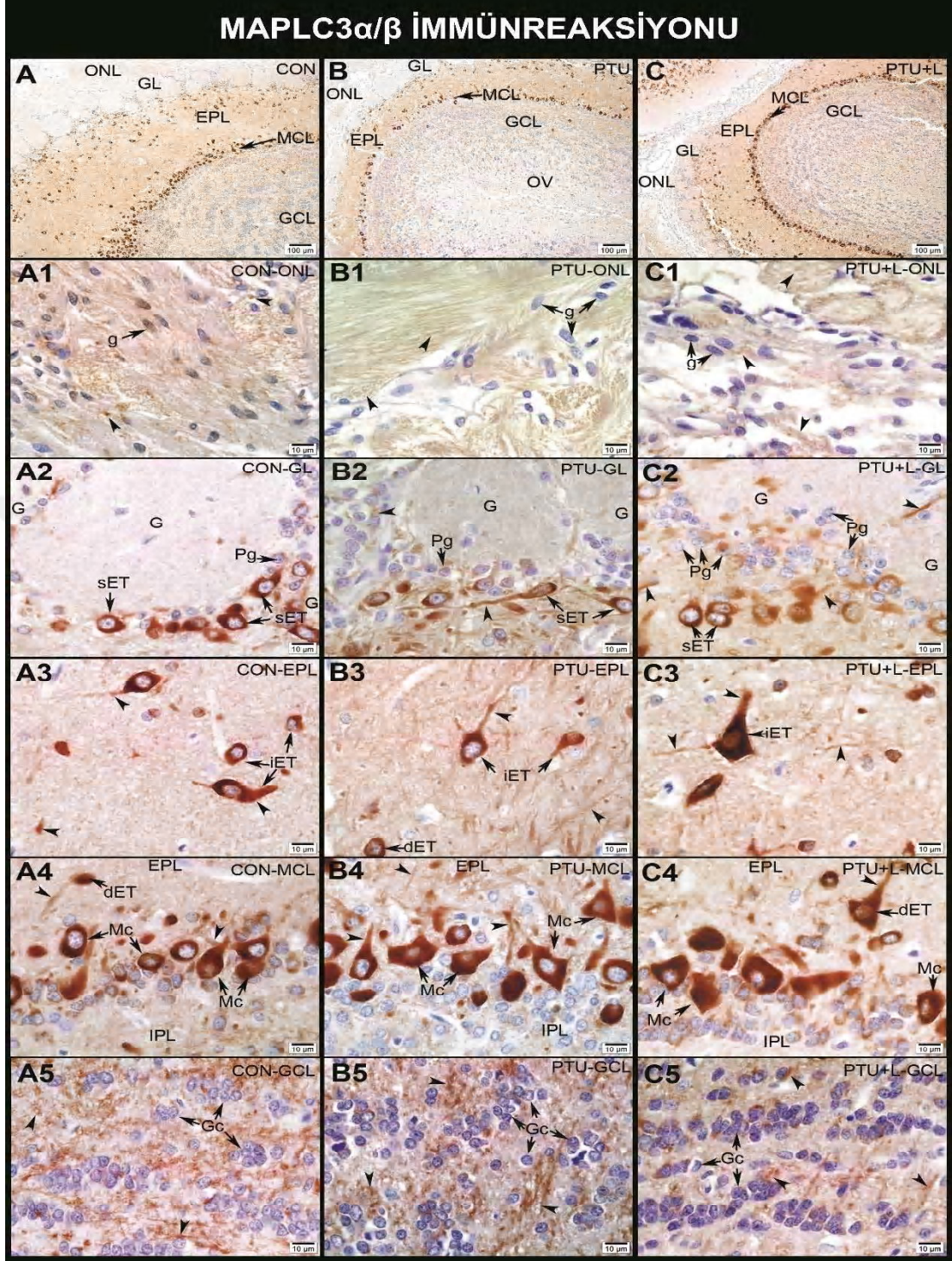
MAPLC3 α/β antikoru ile elde edilen immünohistokimya sonuçları tüm gruplarda püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmalarının kuvvetli pozitif olduğunu ve ayrıca OB'nin tüm katmanlarında bulunan akson ve dendritlerin de ortadan kuvvetliye doğru değişen yoğunluklarda boyandığını gösterdi. Kontrol ve PTU grubunda MCL katmanında bulunan bazı granül hücrelerin sitoplazmalarında da MAPLC3 α/β -pozitif immünreaksiyon tespit edildi. Püsküllü ve mitral hücrelerdeki boyanma incelendiğinde sitoplazmada homojen boyanmanın olmadığı, bazı alanlarda yoğunlaştığı dikkati çekti. Bu yoğun alanlar PTU ve PTU+L grubunda daha belirgindi (Şekil 4.21.).

Otofagozom belirteci olan MAP1LC3A antikoru ile elde edilen sonuçlar MAPLC3 α/β 'ninkinden daha farklı olarak izlendi. Olfaktör sinir telleri katmanında sinir tellerinin, glomerüler ve diğer katmanların nöropillerinin MAP1LC3A ile orta

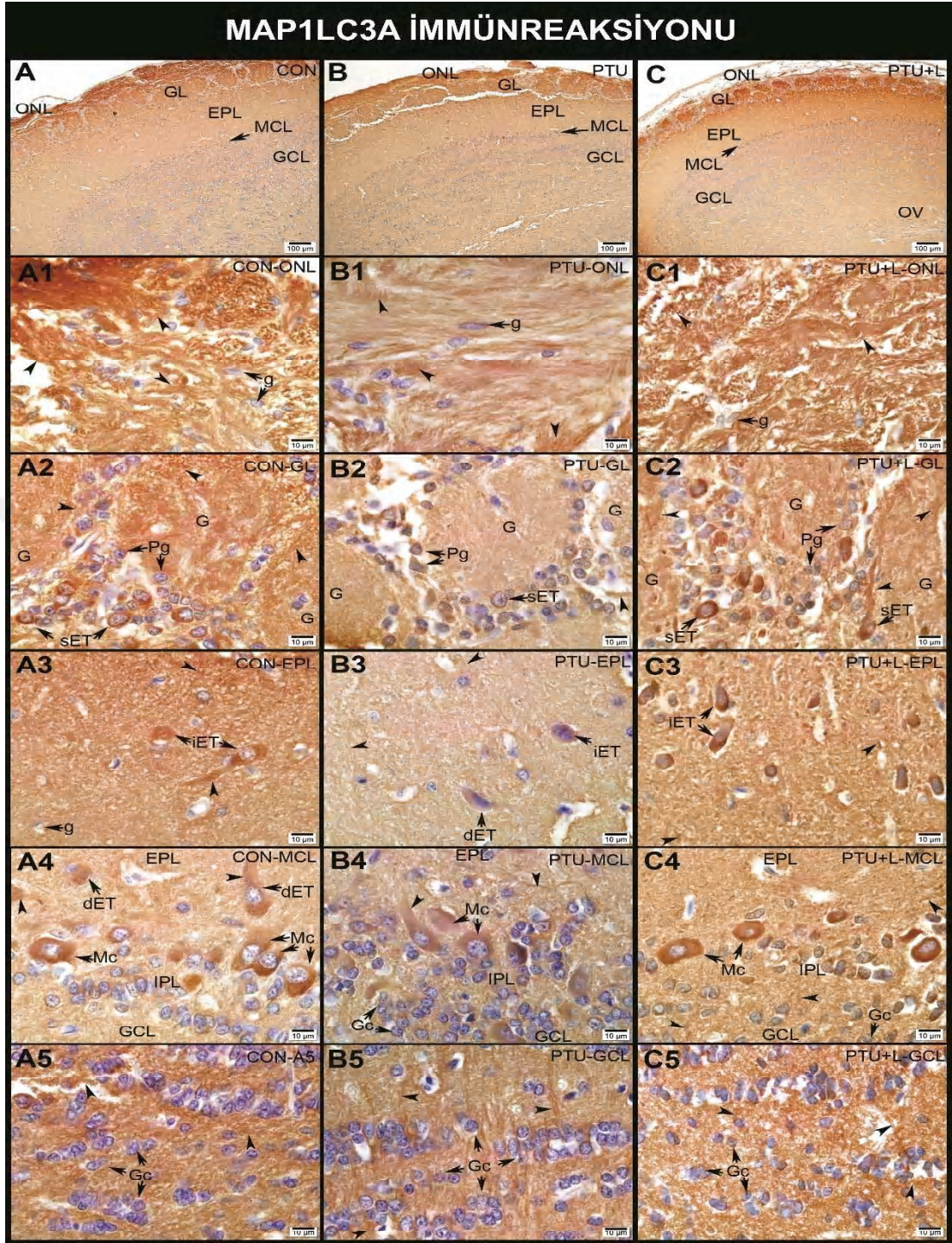
dereceden kuvvetliye kadar değişen yoğunluklarda boyandığı gözlemlendi. Püsküllü ve mitral hücre sitoplazmalarında CON ve PTU+L grubunda kuvvetli, PTU grubunda ise orta derecede bir reaksiyon görülürken, GCL’indeki sinir tellerinin PTU grubunda kuvvetli boyandığı ve CON ve PTU+L grubunda bu aksonların belirgin olmadığı tespit edildi (Şekil 4.22.).



Şekil 04.20. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların olfaktor bulbusunda MAPLC3α/β ve MAP1LC3A’nın Western blot analizi. MAPLC3α/β ve MAP1LC3A’nın göreceli miktarları β-aktin ekspresyonuna normalize edilmiştir. (a ve b) MAPLC3α/β, MAP1LC3A’nın ve β-aktinin temsili immünoblotu. (c) MAPLC3α/β ve MAP1LC3A’nın göreceli sinyal yoğunlukları. Veriler ortalama ±standart hata (çubuklar, standart hatayı göstermektedir) olarak sunulmuştur. ANOVA ve takiben Tukey’in post hoc testi ile farklılıkların anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.21. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde MAPLC3 α/β immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sinir katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; IPL: İç Pleksiform Katman; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; OV: Olfaktör ventrikül; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 μ m, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10 μ m.



Şekil 4.22. Kontrol (CON), hipotiroidi (PTU) ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanlardan alınan olfaktör bulbus örneklerinde MAP1LC3A immünlokalizasyonu. Strep-Avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmünoperoksidaz Boyama. ONL: Olfaktör sınır katmanı, GL: Glomerüler Katman, EPL: Dış Pleksiform Katman; MCL: Mitral Hücre Katmanı; IPL: İç Pleksiform Katman; GCL: Granül Hücre Katmanı; g: Glial hücre; G: Glomerül; Pg: Periglomerül hücre; Gc: Granül hücre; Mc: Mitral hücre; sET: süperfisiyal (dış) püsküllü hücre; iET: orta püsküllü hücre; dET: derin püsküllü hücre; OV: Olfaktör ventrikül; ok başları: akson ve dendritler. Bar: A-C:100 µm, A1-A5, B1-B5, C1-C5: 10µm.

Tablo 4.2. Kontrol (CON), Hipotiroidi (PTU) ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi (PTU+L) grubu sıçanların OB'sinde, TSC2, pTSC2, Beclin 1, SQSTM1/p62, MAPLC3 α/β ve MAP1LC3A, proteinlerinin yerleşimleri ve boyanma yoğunlukları (np: nöropil, c: sitoplazma, n: çekirdek, -: negatif boyanma, +: zayıf boyanma, ++: orta derecede boyanma, +++: güçlü boyanma)

Protein	Grup	ONL	GL	EPL	MCL	GCL
TSC2	CON	gc:- np:-	c:- np:++	c:++ np:++	c:++ np:++	c:- np:+++
	PTU	gc:- np:-	c:- np:++	c:++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:+++
	PTU+L	gc:- np:-	c:- np:++	c:++ np:++	c:++ np:++	c:- np:++
p-TSC2	CON	gc:- np:-	c:- np:+	c:- np:+	c:- np:+	c:- np:-
	PTU	gc:- np:+	c:- np:++	c:++ np:+	c:++ np:+	c:- np:-
	PTU+L	gc:- np:+	c:- np:++	c:+ np:++	c:++ np:++	c:- np:+++
Beclin1	CON	gc:- np:-	c:- np:+++	c:- np:+	c:+ np:+	c:- np:++
	PTU	gc:- np:-	c:- np:+++	c:- np:+	c:- np:++	c:- np:+++
	PTU+L	gc:- np:-	c:- np:+++	c:+ np:+	c:+ np:++	c:- np:+++
SQSTM1/p62	CON	gc:+ np:-	c:- np:+++	c:+++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:++
	PTU	gc:+ np:-	c:- np:++	c:+++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:++
	PTU+L	gc:+ np:-	c:- np:+	c:+++ np:++	c:+++ np:++	c:- np:++
MAPLC3 α/β	CON	n:- gc:- np:++	n:- c:- np:++	n:- c:+++ np:+++	n:- c:+++ np:+++	n:- c:+ np:+++
	PTU	n:- gc:- np:++	n:- c:- np:++	n:- c:+++ np:+++	n:- c:+++ np:+++	n:- c:+ np:+++
	PTU+L	n:- gc:- np:++	n:- c:- np:++	n:- c:+++ np:+++	n:- c:+++ np:+++	n:- c:- np:+++
MAP1LC3A	CON	gc:- np:++	c:- np:+++	c:+++ np:+++	c:+++ np:+++	c:- np:++
	PTU	gc:- np:++	c:- np:++	c:++ np:+++	c:++ np:+++	c:- np:+++
	PTU+L	gc:- np:++	c:- np:+++	c:+++ np:+++	c:+++ np:+++	c:- np:++

5. TARTIŞMA

Tiroid bezi, organizmanın gelişimi sırasında ve yetişkinlikte pleiotropik etkiler gösteren tiroid hormonları T4 ve T3 ile kalsitonin hormonunu üretir. Bu hormonlar progenitör dönüşümü, hücrenin hayatta kalması ve farklılaşması, hücresel homeostaz ve çoklu doku tipleri ile organlardaki metabolik düzenleme gibi çeşitli hücresel süreçlerde önemli rol oynar (Pascual ve Aranda, 2013; Sirakov ve ark., 2013; Yen, 2001). Beyin, tiroid hormonu etkisine oldukça duyarlı olup yapılan çalışmalar TH'lerinin memelilerde sinir sistemi gelişiminin ilk aşamalarında önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Bernal, 2007; Horn ve Heuer, 2010; Koibuchi ve Chin, 2000; Préau ve ark., 2015). Çoğu memelinin nöronları doğum öncesi ve doğum sonrası erken yaşamda üretildiğinden, embriyonik ve erken postnatal dönemde tiroid hormon durumunun bozulmasının doğum sonrası gelişim sürecinde ciddi nörolojik bozukluklara neden olduğu tespit edilmiştir (de Escobar ve ark., 2007; Williams, 2008; Zoeller ve Rovet, 2004). Yetişkinlerde de tiroid hormonlarının hipokampüste dentat girusun SGZ bölgesinde ve lateral ventrikülleri kaplayan SVZ bölgesinde yetişkin progenitör gelişiminin farklı aşamalarını etkileyerek nörogenezi düzenlediği gösterilmiştir (Kapoor ve ark., 2015; Remaud ve ark., 2014). Tiroid hormonunun yetişkin hipokampal nöroenez üzerindeki etkisi ilk olarak kemirgen modellerinde gerçekleştirilmiş olup, hipotiroidi durumu guatrojen tedavisi (örn. PTU verilmesiyle) veya tiroidektomi kullanılarak, hipertiroidi ise ekzojen tiroid hormonu uygulanarak indüklenmiştir (Ambrogini ve ark., 2005, Desouza ve ark., 2005, Montero-Pedrazuela ve ark., 2006). Sıçanlarda yetişkin başlangıçlı hipotiroidizmin, hipokampal progenitörlerin postmitotik sağkalımını ve nöronal farklılaşmasını, proliferasyonlarını etkilemeden önemli ölçüde azalttığı (Ambrogini ve ark., 2005, Desouza ve ark., 2005; Montero-Pedrazuela ve ark., 2006), progenitör hücre sağkalımındaki bu azalmaya muhtemelen artan apoptotik hücre ölümünün aracılık ettiği, hipotiroid hayvanlarda

hem progenitor sağkalımındaki düşüşün hem de nöronal farklılaşmanın tiroid hormonu replasman tedavisi ile (ötiroid durumunun restorasyonu) normalleştirildiği ortaya konmuştur (Desouza ve ark., 2005). Sıçanlardaki bir başka rapor, guatrojen aracılı hipotiroidizmin ardından gecikmiş nöronal morfolojik olgunlaşmanın şekillendiğini göstermiştir (Ambrogini ve ark., 2005).

Yetişkin beyinde, SVZ'de doğan nöronal öncü hücreler OB'ye doğru göç ederler. Olfaktör bulbusda granül ve periglomerüler nöronlara farklılaşırlar (Lledo ve Saghatelian, 2005). Bu hücreler OB ana nöronları ile dendrodendritik sinapslar kurarlar (Whitman ve Greer, 2007b) ve koku uyarılarına yanıt verirler (Carlén ve ark., 2002; Magavi ve ark., 2005). Yetişkinlikte üretilen internöronlar yaşlı granül hücrelerinin yerini alır ve böylece OB ağının yapısal bütünlüğünü korur (Breton-Provencher ve ark., 2009). Sonuç olarak SVZ'deki nörogenez, OB'deki nöronların işlevsel entegrasyonu ile sonuçlanır. Bunun hafıza ve koku/feromon ayrımı gibi koku alma davranışlarında önemli olduğu gösterilmiştir (Breton-Provencher ve ark., 2009).

Tiroid hormonunun SVZ nörogenezi üzerindeki etkilerinin, koku ayrımının tiroid hormonu tarafından modüle edilmesiyle ilgili olabildiği ileri sürülmektedir. Nitekim postnatal yaşam sırasında tiroid hormonunun koku alma yolu gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Hoyk ve ark., 1996; Mackay-Sim ve Beard, 1987; Malvaut ve Saghatelian, 2016; Paternostro ve Meisami, 1991; Sakamoto ve ark., 2014). Walczak ve arkadaşları (2002), konjenital hipotiroidizm hastalarında, tiroid hormonlarının kokunun tespitinde ve ayırt edilmesinde önemli olduğunu belirlemişlerdir. Koku alma sisteminin tiroid hormonuna karşı bu hassasiyetini yetişkinlerde de koruduğu ve hipo ve hipertiroidili kemiricilerde koku alma davranışının değiştii ortaya konmuştur (Beard ve Mackay-Sim, 1987; Brunjes ve ark., 1982; Deniz ve ark., 2016; Günbey ve ark., 2015; Johanson, 1980). Bu çalışmalar SVZ nörogenezindeki bozulmalar nedeniyle OB'de nörojenik değişikliklerin meydana geldiğini ve tiroid hormonunun koku alma üzerindeki etkilerinin varlığını ortaya koymaktadır. Ancak tiroid hormonu bozukluklarının OB'de hangi mekanizmaları etkileyerek koku bozukluklarına neden olduğu bilinmemektedir.

Çeşitli hastalıklara bağlı koku alma bozukluklarında otofaji ile ilişki sinyal yollarının önemli rol oynadığı son çalışmalarla ortaya konmuştur (Chen ve ark.,

2022; Takahashi ve ark., 2023). Bununla birlikte hipotiroidizm sırasında şekillenen olası koku alma duyusu bozukluklarında TH'lerinin nongenomik etkilerine aracılık eden AMPK sinyalizasyonunun bozulup bozulmadığına, ayrıca distiroidi sırasında otofajinin çeşitli basamaklarını düzenleyen proteinlerin aktivasyonunun/inaktivasyonunun etkilenerek otofajinin aktive ve/veya inhibe edip etmediğine dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada PTU verilerek hipotiroidizm oluşturulan ve hipotiroidizm şekillendikten sonra L-tiroksine ile tedavi edilen erişkin sıçan OB dokusunda AMPK α 1, mTOR, ULK1, TSC2 (tuberin), BECLIN1, p62 ve MAPLC3 gibi otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin göreceli miktarları ve lokalizasyonları tanımlandı. Western blot analizi sözü edilen proteinlerin CON ve deney gruplarında protein düzeyinde ifade edildiğini gösterdi. İmmünohistokimyasal analiz sonuçları ise bu proteinlerin her birinin OB dokusunda farklı katmanlarda ve hücre tiplerinde lokalize olduğunu ve farklı boyanma yoğunluğu sergilediğini gösterdi. Bu çalışmada tiroid hormonunun otofaji sinyal yolağının farklı basamaklarında rol oynayan proteinlerin hem ekspresyon hem de lokalizasyonları üzerine etkileri ilk kez incelendi.

Hipotiroidizmde düşük TH konsantrasyonlarının bilişsel gerileme, depresyon, demans, disfoni (ses kalitesinin bozulması) ve koma gibi nöropsikiyatrik semptomlara neden olduğu, yaygın zihinsel bozulmanın bir uzantısı olarak demans gelişebildiği ve levotiroksin tedavisinden sonra nörobilişsel yeteneklerin iyileştiği gösterilmiştir (Jurado-Flores ve ark., 2022). Primer hipotiroidizm hastalarında karşılaşılan yaygın bir diğer klinik problemin de sensorinöral koku alma bozuklukları (disomia) olduğu (Chen ve ark., 2021) ve bu gibi hastalarda, tiroid hormonları ile tedavinin bu kusurları büyük ölçüde tersine çevirdiği tespit edilmiştir (Baskoy ve ark., 2016; McConnell ve ark., 1975). Son yıllarda yapılan çalışmalarda da subklinik hipotiroidizmin (Baskoy ve ark., 2016) ve primer hipotiroidizmin (Deniz ve ark., 2016) koku alma duyarlılığını negatif yönde etkilediği gösterilmiştir. Dahası, hipotiroidizmin yetişkin farelerde koku almanın kısmen veya tamamen kaybolmasına (anosmia) neden olduğu gösterilmiştir (Beard ve Mackay-Sim, 1987). Bu tez çalışmasında da hipotiroidizmin sıçanlarda koku alma bozukluğuna neden olup olmadığı araştırıldı. Çalışmada materyal ve metod bölümünde anlatıldığı üzere hipotiroidizm grubundaki hayvanlara PTU 39 gün yaştan itibaren 28 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulandı. Tedavi grubundaki

hayvanlara da aynı prosedür uygulandıktan sonra 15 gün süreyle L-tiroksin verildi. Her gruptaki hayvanlar takiben koku testine (yiyecek bulma testi) tabi tutuldu. Kemirgen modellerinde yetişkin başlangıçlı hipotiroidizmin koku algılarında bir azalmaya neden olduğu (Beard ve Mackay-Sim, 1987), hipotiroidi hastalarının hormon replasmanı ile düzeltilebilen disosmi sergiledikleri (Deniz ve ark., 2016, Günbey ve ark., 2015) bildirilmesine karşılık bu çalışmada en uzun yiyecek bulma süresinin PTU+L grubundaki sıçanlara ait olduğu belirlendi. PTU ve PTU+L grubunda koku alma sürelerinin uzadığı, ancak sadece PTU+L grubundaki sıçanlara ait ortalama değerlerin hem CON hem de PTU grubundaki ortalama değerlerden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi ($P<0.05$). Bu sonuçlar PTU ile indüklenmiş sıçan modelinde hipotiroidizmin koku alma yeteneğinin bozulmasına neden olduğunu göstermekle birlikte literatürde bildirilenin (Deniz ve ark., 2016; Günbey ve ark., 2015) aksine L-tiroksin ile tedavinin koku bozukluklarını düzeltmek yerine artırdığını göstermektedir. Bu durum sıçanların bireysel farklılık gösterdiği şeklinde yorumlandı. Bu farklılığın hayvan türüne ve PTU'nun uygulama şekli ya da süresine bağlı olabileceği düşünüldü.

Bugüne değin yapılan çalışmalar ile olfaktör mukozadaki reseptör nöronların, merkezi koku alma alanlarının (OB gibi) ve üst düzey bilişsel sistemlerin tümünün hipotiroidizmin hedefi olduğu gösterilmiştir. Dhong ve ark. (2003) immünohistokimya kullanarak yetişkin sıçanların koku epiteli düzeyinde hipotiroidizmle ilişkili değişiklikleri değerlendirmiş ve koku reseptör nöronlarının olgunlaşmasında PTU maruziyetiyle ilişkili bir azalmanın olduğunu, ancak toplam reseptör sayısı ve yoğunluğu, olfaktör epitel yüzey alanı ve kalınlığının PTU'ya maruz kalma ile ilişkili olarak farklılık göstermediğini bulmuşlardır. Paternostro ve ark. (1991) hipotiroidizmin yeni doğan sıçanlarda gelişimleri sırasında koku epiteli üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve koku reseptör hücrelerinde olgunlaşma oranında azalma olduğunu; yüzey epitel kalınlığının PTU ile artan maruziyet süresiyle değişmediğini göstermişlerdir. Yetişkin sıçanlarda PTU ile indüklenen hipotiroidizmin OB'de nöral kök hücre proliferasyonu artırdığı, hipertiroidizmin ise azalttığı tespit edilmiş ve böylece tiroid hormonlarının nöral kök hücre proliferasyonunu ve olgunlaşmasını yetişkinlikte de etkilediği ileri sürülmüştür (Fernandez ve ark., 2004). Hoyk ve ark. (1996), doğum öncesi PTU uygulanarak hipotiroidizm oluşturulan sıçanların OB'lerinde EPL genişliğinde belirgin bir azalma ve tiroksin uygulanan hipertiroidili

sıçanların OB'lerinin EPL katmanının genişliğinde belirgin bir artış gözlemiştir. Prenatal PTU verilen sıçanlarda mitral hücre dentritlerinde, postnatal PTU verilen hipotiroidili sıçanlarda granüler hücre dendritlerinde ve tiroksin verilen sıçanlarda glia hücrelerinin uzantılarında önemli bir azalmanın olduğunu belirlemişlerdir (Hoyk ve ark., 1996). Daha önceki çalışmalarda hipotiroidizmin olfaktör epiteldeki etkileri detaylı olarak incelendiğinden bu tez çalışmasında sadece OB'de histolojik bir değişim olup olmadığı incelendi. Olfaktör mukozadaki olfaktör duyu nöronlarının afferent özellikteki miyelinsiz akson demetleri ile bunlar arasındaki glia hücrelerinin bulunduğu en dış katman olan ONL'nin yapısal olarak gruplar arasında bazı farklılıklar sergilediği tespit edildi. PTU+L grubu sıçanlarda ONL'nin diğer gruplara göre geniş olduğu ve gliya hücrelerinin miktarının arttığı gözlemlendi. PTU ve PTU+L gruplarında kontrol grubuna göre GL'deki glomerüllerin daha küçük olduğu, ancak periglomerüller ve dış püsküllü hücre morfolojilerinin CON grubundakine benzer olduğu görüldü. EPL seyrek yerleşimli püsküllü hücre gövdeleriyle karakterize edilen bir katman olmasına karşılık CON grubuna göre PTU+L grubunda daha küçük hücre gövdeleri saptandı. PTU+L grubunda MCL'sinde mitral hücrelerin daha büyük olduğu gözlemlendi. MCL'nin altında yer alan ince bir tabaka olan IPL'nin az miktarda hücre (horizontal hücre) içerdiği ve yapısal olarak tüm gruplarda benzer olduğu tespit edildi. Olfaktör bulbusun GCL'sini oluşturan granül hücrelerin PTU grubunda miktarca arttığı ve büyük kümeler şeklinde dizildiği dikkati çekti. Bu bulgular Hoyk ve ark. (1996) tarafından bildirildiği gibi tiroid fonksiyon bozukluğunun OB'de bazı yapısal değişikliklere neden olabileceğinin önemli göstergesidir.

Tiroid hormonlarının embriyonik gelişim, hücresel büyüme, metabolizma farklılaşma, ve proliferasyon dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçleri genomik ve nongenomik etkileri ile modüle ettiği bilinmektedir. Genomik sinyal yolu gen transkripsiyonu ve translasyonunu doğrudan etkilerken, genomik olmayan yol daha hızlı hücresel değişiklikleri içerir ve bunların bazıları daha dolaylı sinyal yoluyla gen ifadesini de düzenler (Moeller ve Broecker-Preuss 2011). Tiroid hormonlarının genomik etkilerine T3 için tercihlili bir afinitye sahip olan tiroid hormonu reseptörü α (THRA) ve tiroid hormonu reseptörü β (THRB) genleri tarafından kodlanan tiroid hormonu reseptörleri (TR veya THR'ler) aracılık eder (Evans, 1988; Lazar ve Chin, 1990; Marsili ve ark., 2011). Tiroid hormonunun nongenomik etkilerine mitokondriyal

TR, sitoplazmik TR (TR β 1, TR α 1 gibi) veya plazma membran reseptörleri (integrin alfaVbeta3, integrin α v β 3) aracılık yapar (Cheng ve ark., 2010; Davis ve ark., 2021; Hammes, 2015; Wrutniak, 1998). Tiroid hormonları genomik olmayan işlevlerini yerine getirirken fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), protein kinaz B (Akt), AMPK gibi çeşitli kinazların aracılık ettiği sinyal yollarını aktive etmek için bu sitosolik proteinlerle de etkileşime girerler (Segal, 1990; Senese ve ark., 2014; Shih ve ark., 2004). Serin/treonin (Ser/Thr) kinaz grubunun bir üyesi olan AMPK, hücrenin ve tüm organizmanın enerji durumunu algılayan bir metabolik yakıt göstergesi veya enerji sensörü olarak görev yapar (Hardie, 2007). Enerji rezervlerinin sınırlandırılması veya ilgili hücrel stres koşulları altında, AMPK aktive olur ve bu da ATP tüketen biyosentetik yolların inhibisyonuna ve ATP üretimini artıran katabolik yolların aktivasyonuna yol açar. Dolayısıyla, AMPK birçok fizyolojik ve patolojik sürecin düzenlenmesine katılır ve otofajinin düzenlenmesi, metabolik strese yanıt verilmesi ve hücre içi enerji homeostazının korunması için çok önemlidir (Carling ve ark., 2012). Yapısal olarak, memeli AMPK'yı katalitik α alt birimleri ile düzenleyici β ve γ alt birimlerinden oluşan heterotrimerik komplekstir (Cheung ve ark., 2000; Stapleton ve ark., 1997). Çalışmalar AMPK'nın beyin (Amato ve ark., 2011), kalp (Miller ve ark., 2008), karaciğer (Duca ve ark., 2015), böbrek (Zhao ve ark., 2015) ve gastrointestinal sistem (Muanprasat ve ark., 2015) dahil olmak üzere çeşitli organlarda bulunduğunu ve önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Nöronlarda metabolizmanın doğrudan düzenlenmesinin yanı sıra, AMPK'nın nörogelişimsel süreçlere de dahil olduğu gösterilmiştir (Lee ve ark., 2007). Nöronal büyüme ve sinaptik işlev, sinaptaki hassas protein üretimine ve cirosuna bağlıdır. AMPK'nın nöronal çoğalma, göç, morfogenez ve sinaptik iletişim dahil olmak üzere beyin gelişimi ve işlevinin birçok yönünün yanı sıra nöronal hücre ölümü, enerji tükenmesi ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir rolü olduğu ortaya konmuştur (Amato ve Man, 2011). AMPK izoformlarının ekspresyonları ve lokalizasyonlarının merkezi sinir sisteminin OB'yi de içeren çeşitli bölümlerinde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Turnley ve ark., 1999). Turnley ve arkadaşları (1999) farelerin OB'sinde AMPK izoformlarının ekspresyonlarını ve yerleşimlerini immunohistokimyasal yöntemle incelemişler ve AMPK α 1'in sadece glomerüllerde, AMPK α 2'nin periglomerüler, mitral ve granül hücreleri gibi nöronlar tarafından yüksek düzeyde glomerüllerde ise düşük düzeyde ifade edildiğini rapor

etmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca OB’de AMPK β 1’in sadece mitral hücreler ve bazı periglomerüler hücreler tarafından eksprese edildiğini, ancak granül hücrelerinde bulunmadığını, AMPK β 2’nin OB’de hiç ifade edilmezken, AMPK γ 1’in hafif glomerüler boyanma ile α 2 ile aynı yaygın nöronal ekspresyon gösterdiğini saptamışlardır. Bu araştırmacılar AMPK α 1, α 2, β 1, β 2, γ 1 ve γ 2 alt birimlerinin peptidlerine karşı tavşanda hazırlanmış antikorları kullanmışlardır. Bu tez çalışmasında hipotiroidizm oluşturulmuş (PTU) ve hipotiroidizm oluşturulduktan sonra L-tiroksin ile tedavi edilmiş (PTU+L) sıçanların OB’sinde AMPK α 1/2’nin ve p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172’nin ve püsküllü hücreler ile mitral hücrelerin sitoplazmalarında lokalize olduğu, gliya hücreleri (astrositler) ve granül hücrelerde ise bulunmadığını gösterdi. Bu sonuçlar ekspresyonu ve lokalizasyonunda herhangi bir değişim olmadığı immünohistokimya ve western blot analiz teknikleri kullanılarak araştırıldı. Çalışmada insan kaynaklı AMPK α 1’in C-terminusundaki 251-550 amino asitlerine karşı geliştirilmiş olan ve fare, sıçan ve insan kaynaklı AMPK α 1 ve AMPK α 2’nin western blot ve immünohistokimya teknikleri ile saptanabilmesi için önerilen fare monoklonal IgG2a κ AMPK α 1/2 antikoruna ile AMPK α 1/2(Thr183/Thr172) antikoruna kullanıldı. İmmünohistokimyasal sonuçlar tüm gruplarda AMPK α 1/2’nin OB’nin ONL’sindeki sinir tellerinde, glomerüler nöropilde ve ayrıca her katmandaki akson ve dendritlerde sıçan OB’sinde AMPK α 1/2’nin fare OB’sindekinden (Turnley ve ark., 1999) farklı lokalizasyon örnekleri sergilediğini göstermekle birlikte, lokalizasyondaki bu farklılığın her iki çalışmada farklı antikorların kullanılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Sunulan çalışmada CON ve PTU+L gruplarında ONL, glomerüler nöropil ve GCL’sindeki akson demetlerindeki boyanma kuvvetli, PTU grubunda ise glomerüler nöropilde orta dereceli olarak izlendi. CON grubunda ayrıca EPL ve MCL’de bulunan püsküllü hücreler ve MCL’deki mitral hücrelerin sitoplazmalarında kuvvetli, PTU+L grubunda orta derecede, PTU grubunda püsküllü hücrelerde zayıf, mitral hücrelerde orta derecede AMPK immünreaksiyonu gözlemlendi. Çalışmada ayrıca p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172’nin OB’de olfaktör sinir katmanındaki sinir telleri, glomerüler nöropil, GCL’deki sinir tellerinde, periglomerüler, püsküllü hücreler ile mitral hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde, granül hücrelerin ise çekirdeklerinde lokalize olduğu belirlendi. Tüm gruplarda mitral hücrelerin somalarının yanı sıra akson ve

dendritlerinde p-AMPK immünreaksiyonu oldukça belirgindi. Tüm gruplarda ET hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli bir boyanmanın baskın olduğu görüldü. PTU grubunda mitral hücrelerdeki p-AMPK-pozitif sitoplazma ve çekirdek immünreaksiyonun diğer gruplara göre daha kuvvetli olduğu gözlenirken PTU+L grubunda periglomerüler ve yüzeysel püsküllü hücrelerdeki ve granül hücrelerin çekirdeklerindeki pozitif boyanmanın diğer gruplardakinden daha yoğun olduğu belirlendi. Western blot analizi de AMPK α 1/2'nin göreceli miktarının PTU grubunda diğer gruplara göre düşük olduğunu, p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172'nin ekspresyon düzeyi ile pAMPK/AMPK oranının ise PTU+L grubunda en yüksek olduğunu, ancak gruplar arası farklılıkların önem taşımadığını ortaya koydu ($P>0.05$). Bununla birlikte bu sonuçlar PTU+L grubunda AMPK'nın fosforilasyonun olarak aktifleştğini ve çok yüksek oranda olmasa otofajinin indüklenmiş olabileceğini göstermektedir. Nitekim koku alma işlev bozukluğu olan alerjik rinitli fare modelinde özellikle olfaktör epitelde p-AMPK ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği p-mTOR düzeyinin ise azaldığı bildirilmiş ve sonuç olarak koku alma işlev bozukluğuna olfaktör epitelde AMPK/mTOR aracılı otofaji yolağının rolünün bulunduğu ileri sürülmüştür (Chen ve ark., 2022). Bazal metabolizma hızı insanlarda enerji harcamasının birincil kaynağıdır ve bazal metabolizma hızındaki azalmalar obezite ve kilo alımıyla sonuçlanabilir (Ravussin ve ark., 1988). Tiroid hormonları bazal metabolizma hızının önemli bir düzenleyicisi olup metabolik süreçler için ATP üretimini artırarak bazal metabolizma hızını uyarır (Mullur ve ark., 2014). Bilindiği üzere hücrel besinlerin tükenmesi nedeniyle AMPK'nın aktivasyonu da ATP üretmek için katabolik yolları harekete geçirir ve ATP tüketimini engellemek için anabolik yolları azaltır (Carling ve ark., 2012). Bu çalışmada PTU+L grubuna ait OB'lerde AMPK'nın aktivasyonu yani fosforilasyonunun tedavi amaçlı kullanılan levotiroksinin nongenomik etkisiyle ilişkili olduğu ileri sürülebilir (Segal, 1990; Senese ve ark., 2014; Shih ve ark., 2004). Ayrıca akut AMPK fosforilasyonu/aktivasyonunun beyindeki metabolik homeostazın yeniden sağlanmasında rol oynadığı (Didier ve ark., 2018), bunun yanı sıra hücre boyutunun, nörit uzunluğunun ve nöronal polarizasyonun azalmasına da neden olduğu bildirilmiştir (Amato ve ark., 2011). Bu bilgilere dayanarak PTU+L grubunda AMPK

aktivasyonunun OB’de metabolik hemostazın sağlanmasına katkı sağlayabileceği ileri sürülebilir.

Otofagozom oluşumunda devreye giren ilk otofajiye özgü kompleks, ULK1'in kendisi, ATG13, FIP200 ve ATG101'den oluşan ULK1 kompleksidir. ULK1 bir serin/treonin protein kinazdır ve mayadaki ATG1'in memeli ortoloğudur. Beş ULK1 homoloğu vardır (ULK1, ULK2, ULK3, ULK4 ve STK36 (serin/treonin kinaz 36). Bunlardan sadece ULK1 ve ULK2'nin geleneksel otofaji sinyalizasyonunda yer aldığına inanılmaktadır. Ulk1, pro-otofajik bir kinaz ve mTORC1'in doğrudan substratıdır. Çoğu hücre hattında, bir protein kinaz için beklenebileceği gibi, ULK1'in kinaz aktivitesi otofajinin başlatılması için gereklidir (Lee ve Tournier, 2011). Ulk1'in kanonik olmayan işlevleri, nöron gelişimi ve işlevi için de hayati önem taşıyan Golgi-ER trafiğini içerir (Sokolov, 2021). ULK1 kompleksinin normal koşullar altındaki lokalizasyonu belirsizdir, ancak amino asit açlığı üzerine ER'ye yakın noktasal yapılar oluşturur. Bu noktasal yapılar, otofagozom biyogenezini destekleyen ER'nin omegazomlarıyla birlikte lokalize olur (Karanasios ve ark., 2013). ULK1'in OB’de lokalizasyon ve ekspresyonunun incelendiği sadece bir araştırma bulunmaktadır (Okazaki ve ark., 2000). Okazaki ve ark. (2000), ULK1 immünreaktivitesinin sıçanda OB’nin mitral hücre tabakasında yoğun, dış pleksiform ve granüler katmanda zayıf, iç pleksiform katmanda ise negatif olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, ULK1’in granülsüz ER fraksiyonunda bulunduğunu ancak lizozomal fraksiyonda bulunmadığı, immünositokimya tekniğinde ise boyanmanın noktasal olduğu ve ER veya Golgi’de bulunmadığı ancak granülsüz endoplazmik retikulum fraksiyonunda başka bir vezikülde lokalize olduğu ve bu vezikülün otofagozom için membran kaynağı olabileceği rapor edilmiştir (Okazaki ve ark., 2000). Sunulan tez çalışmasında ULK1’in OB’deki lokalizasyonu incelendiğinde tüm gruplarda OB’nin ONL’sini oluşturan sinir tellerinde negatif ya da zayıf olduğu, ancak bu katmandaki gliya hücrelerinin sitoplazmalarında kuvvetli pozitif olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra diğer katmanlardaki bazı akson ve dendritlerin ve özellikle de GCL’deki aksonların kuvvetli ULK1-pozitif olduğu dikkati çekti. Glomerüler katmanda nöropildeki ULK1 reaksiyonu CON ve PTU gruplarında orta dereceli iken, PTU+L grubunda zayıf olarak izlendi. Periglomerüler, püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmaları ULK1 için pozitif reaksiyon sergilerken GCL’deki granül hücrelerde reaksiyonun negatif olduğu tespit

edildi. Mitral hücrelerdeki reaksiyon CON grubunda deney grubundakilere göre daha yoğun olarak izlendi. Bu tez çalışmasında OB nöronlarındaki sitoplazmik reaksiyon yüksek objektif büyütmesinde incelendiğinde boyanmanın homojen olmadığı ve sitoplazmada daha koyu boyanan küçük sitoplazmik alanların olduğu dikkati çekti. Çalışmamızda bu bulgular Okazaki ve arkadaşlarının (2000) bulgularıyla örtüşmekte olup ULK1'in OB nöronlarındaki lokalizasyonları bu proteinin omegazomlarda yerleşebileceğini kanıtlar niteliktedir.

ULK1'deki Ser467, Ser555, Thr574 ve Ser637'nin AMPK tarafından fosforilasyonunun, amino asit açlığı sırasında p62/SQSTM1 (sekestozom-1) degradasyonu ve mitokondrinin otofajik degradasyonu (mitofaji) için gerekli olduğu bulunmuştur (Egan ve ark., 2011). Bununla birlikte OB'de ULK1'in fosforilasyonuna ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında ULK1'deki Ser467'nin fosforilasyonunun varlığı ve OB'deki lokalizasyonu ilk kez incelenmiş olup p-ULK1 (Ser467) için immün boyanmaların OB'de periglomerüler, püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde lokalize olduğu, ONL katmanının sinir tellerinde reaksiyon negatif iken glomerüler nöropilde PTU+L grubunda orta derecede pozitif bir reaksiyon bulunduğu tespit edildi. Granül hücrelerinde p-ULK1 (Ser467) immünreaksiyonu CON grubunda negatif iken, her iki deney grubunda bazı hücrelerin çekirdeklerinde orta dereceli pozitif olarak izlendi. Ayrıca PTU grubunda püsküllü ve mitral hücrelerdeki çekirdek boyanmasının sitoplazmik reaksiyondan daha kuvvetli olduğu, PTU+L grubunda ise hem sitoplazma ve hem de çekirdekteki immünreaksiyonun kuvvetli olduğu dikkati çekti. İmmünohistokimyasal bulguları destekleyecek şekilde Western blot analiz sonuçları ULK1 ve p-ULK1 (Ser467)'nin sıçan OB'sinde eksprese edildiğini gösterdi. ULK1'in göreceli miktarının CON grubunda ise en yüksek, PTU+L grubunda en düşük olduğu, p-ULK1 (Ser467)'nin ise, CON grubunda en düşük, PTU+L grubunda en yüksek olduğu belirlendi. P-ULK1/ULK1 oranı da PTL+L grubunda en yüksek olarak bulundu. Ancak bu farklılıkların istatistiksel önem taşımadığı tespit edildi ($P>0.05$). Bununla birlikte bu sonuçlar özellikle PTU+L grubunda daha belirgin olmak üzere her iki deney grubunda ULK1'in Ser467'de fosforile olarak aktifleştiğini göstermektedir.

AMP ile aktive olan kinaz, otofagozom biyogenezini desteklemek için ULK1 (Ser317, Ser467, Ser555, Ser574, Ser637, Ser659, Ser777) ve ATG13'ü (Ser224) fosforile eder

(Puente ve ark., 2016; Sanchez ve ark., 2012; Shang ve ark., 2011). Araştırmalar, AMPK'nın ULK1'i doğrudan veya dolaylı yoldan aktiveştirerek otofajiyi aktive ettiğini göstermiştir (Egan ve ark., 2011; Kim ve ark., 2011). Öncelikle AMPK otofajiyi indüklemek amacıyla doğrudan ULK1'i fosforile ederek aktiveştirir. İkinci olarak, AMPK ULK1'i fosforile ederek ULK1-AMPK etkileşimini bozan mTORC1'i inhibe eder ve böylelikle ULK1'i dolaylı yoldan aktive etmiş olur (Kim ve ark., 2011). Bu bilgilere dayanarak PTU+L grubunda hem AMPK fosforilasyonunun hem de p-ULK1 (Ser467)'nin ve p-ULK1/ULK1 oranının yüksek bulunması bulgusu birlikte değerlendirildiğinde hipotiroidizmin levotiroksin ile tedavi sürecinde aktiveşen AMPK'nın ULK1'i Ser467'de fosforile etmesi sonucu yüksek düzeyde olmasa bile otofajinin indüklenmiş olabileceği ileri sürülebilir.

Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi kinaz her yerde ifade edilen fosfatidilinositol 3-kinaz ilişkili kinazlar (PIKK) ailesinde yer alan bir serin (Ser)/treonin (Thr) protein kinazdır (Guertin ve Sabatini, 2009). Temel biyolojik süreçleri kontrol eden hücre içi sinyal ağının merkezinde yer alan mTOR birden fazla yardımcı protein ile bağlanarak mTORC1 ve mTORC2 olmakzere iki farklı sinyal kompleksi oluşturur. Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1'in bir parçası olarak mTOR protein, lipid, kolesterol ve nükleotid sentezi dahil olmakzere hücredeki çoğu anabolik süreci yönlendirirken, aynı zamanda hücre dışı besin alımını artırır ve otofajik katabolizmayı engeller (Saxton ve Sabatini 2017; Valvezan ve Manning, 2019). Otofajinin başlaması mTORC1 aktivitesinin aşağı regülasyonu ile ilişkilidir. Aktive edilmiş mTORC1, ATG13'n hiperfosforilasyonuna neden olarak, ATG1/ULK1 ile etkileşimini azaltarak ve Vps34-Bec11 kompleksi gibi otofaji efektörlerinin fosforilasyonunu kontrol ederek otofajiyi inhibe eder (Behrends ve ark., 2010). Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefi sinyalinin düzensizliği nörolojik ve psikiyatrik hastalıklarla bağlantılıdır. Bununla birlikte, mTOR sinyalinin yetişkin beyindeki fizyolojik işlevleri tam olarak anlaşılamamıştır. Çeşitli alışmalar mTOR'nin nöroenezin birçok yönüyle ilgili olduğunu göstermiştir. Rapamisin'in memeli/meکانistik hedefinin aktivasyonu NSC farklılaşmasını, nöral progenitör hücre göçünü, dendrit gelişimini ve nöron olgunlaşmasını değiştirir. Doğum sonrası yaşamın ilk haftasında, embriyonik ventriküler bölge (VZ), kendini yenileme veya farklılaşmayı yönlendiren mTOR aktivitesi ile yetişkin SVZ'ye geçiş yapar. Subventriküler bölgedeki mTORC1

aktivitesi, nöral soy genişlemesiyle bağlantılı olup proliferatif hücreler ve yeni doğan nöroblastların şekillenmesiyle sonuçlanır. Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1'in hiperaktivasyonun NSC'lerin proliferatif yavru hücelere simetrik farklılaşmasını indüklediğı bildirilmiştir (Mahoney ve ark., 2016). SVZ kaynaklı nöronların dendritogenezi için hem mTORC1 hem de mTORC2'nin gerekli olduğu, ayrıca SVZ'deki nöral kök hücrelerin in vivo elektroporasyonu ve mTOR'nin genetik ve farmakolojik inhibisyonunun bir kombinasyonu kullanıldığında, mTOR'nin fizyolojik koşullar altında postnatal olarak doğan OB nöronlarında bazal ve apikal dendritlerin büyümesi için çok önemli olduğu ve bazal dendritlerinin stabilizasyonuna katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. Rapamisinin memeli/meکانistik hedefinin devreden çıkarılmasının apikal dendrit dallanmasını engellediğı, ancak mTORC1'e özgü inhibisyonun dendrit karmaşıklığını azaltmadığı gösterilmiştir (Skalecka ve ark., 2016). Ayrıca mTOR'nin OB'nin tüm katmanlarında güçlü aktivite gösterdiği ve koku alma duyusunu düzenlemede kritik bir rol oynadığı ortaya konmuştur (Liu ve ark., 2018). Bununla birlikte hipotiroidizmin OB'deki mTOR aktivitesini etkileyip etkilemediğı bilinmemektedir. Buradan yola çıkılarak hazırlanan bu tez çalışmasında hipotiroidizm ve tedavi sonrası süreçteki sıçanların OB'lerinde mTOR ile p-mTOR'nin lokalizasyonu ve mTOR aktivitesinde herhangi bir değişim olup olmadığı incelendi. İmmünohistokimyasal sonuçlar tüm gruplarda mTOR'nin periglomerüler nöropil ile diğer katmanların nöropilindeki akson ve dendritlerde orta derecede pozitif, PTU+L grubunda özellikle GCL'deki sinir tellerinde kuvvetli pozitif olduğunu gösterdi. Periglomerüler, püsküllü ve mitral hücrelerde mTOR reaksiyonun sitoplazmada yerleştiğı, tüm gruplarda mitral hücrelerdeki kuvvetli pozitif boyandığı, ancak püsküllü hücrelerin CON ve PTU+L grubunda PTU grubuna göre daha yoğun boyandığı tespit edildi. Fosfo-mTOR (59.Ser2448) immünreaksiyonunun OB'de glomerüler ve diğer katmanların nöropilinde PTU grubunda zayıf, CON ve PTU+L grubunda orta derecede olduğu, CON grubunda sadece mitral hücrelerde orta derecede sitoplazmik reaksiyon görülürken, PTU ve PTU+L gruplarında püsküllü ve mitral hücrelerde kuvvetli olarak izlendi. Ayrıca CON ve PTU+L gruplarında GCL'de sinir tellerindeki boyanmanın orta derece olduğu gözlemlendi. mTOR veya bunun yer aldığı kompleksler olan mTORC1 ve mTORC2 kompleksleri her yerde bulunan hücresel bir ifadeye sahiptir. Olfaktör bulbusda dahil olmak üzere belirli beyin bölgeleri ve

hücrelerindeki ekspresyonları ile aktivitelerinin düzenlenmesi konusunda şimdiye kadar sistematik bir çalışma yapılmamıştır. Sadece Liu ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada mTOR'nin OB'nin tüm katmanlarında güçlü aktivite gösterdiğini bildirmişler, ancak immünohistokimyasal olarak mTOR yerleşimini göstermemişlerdir. Lee (2017) p-mTOR'nin insan normal fetal ve yetişkin dokularında ve çeşitli karsinom dokularında doku ve hücre tipine özgü yerleşim sergilediğini, normal fetal ve yetişkin dokularda p-mTOR-pozitif immünboyanmanın bağırsak kriptinde, intrahepatik safra kanalında, pankreatik kanalda, böbreğin distal nefronunda, üretelyumun şemsiye hücresinde, mezotelyal hücrede ve koroid pleksusta bulunduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte p-mTOR'nin OB'deki lokalizasyonuna ilişkin herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışması mTOR ve p-mTOR'nin OB'deki yerleşimini gösteren ilk çalışma niteliğindedir. mTOR ve p-mTOR'nin olfaktör reseptör nöronlardan doğrudan duyuşal girdi alan ve bunu bir sonraki beyin koku alma alanına aktaran OB'nin projeksiyon nöronları olarak tanımlanan mitral ve püsküllü hücrelerdeki varlığı bu proteinlerin bu hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Aktivasyonda mTOR, Thr2446, Ser2448 ve Ser2481 dahil olmak üzere çeşitli kalıntılar üzerinde fosforile edilir. Thr2446 besin mevcudiyetine yanıt olarak fosforillenir (Cheng ve ark., 2004). Başlangıçta, S2448'in bir AKT fosforilasyon bölgesi olduğu bildirilmiştir çünkü fosforilasyonu, AKT aktivitesini azaltan PI3K inhibisyonuna duyarlıdır. Ancak, daha yeni raporlar p70S6K'nın memeli hücrelerinde mTOR'nin Ser-2448'de fosforilasyonundan sorumlu başlıca protein kinaz olduğunu ortaya koymuştur (Chiang ve Abraham, 2005; Holz ve Blenis, 2005). S2481 rapamisine duyarsız bir otofosforilasyon bölgesidir (Peterson ve ark., 2000). Copp ve arkadaşları (2009) mTORC1 ve mTORC2 ile ilişkili mTOR'nin farklı şekilde fosforile edildiğini, mTORC1'in ağırlıklı olarak Ser2448 üzerinde fosforile edilmiş mTOR içerdiğini ve mTORC2'nin ağırlıklı olarak Ser2481 üzerinde fosforile edilmiş mTOR içerdiğini belirlemişler ve S2448 ve S2481'deki mTOR fosforilasyonunun işlevsel önemi anlaşılamamış olsa da, bu bölgelerin omurgalı türler arasında yüksek oranda korunmuş olması, fosforilasyonun mTOR regülasyonunda bir rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Rapamisinin memeli/meکانistik hedefi kompleksi 1 kompleksinin hormonlar, büyüme faktörleri, amino asitler ve yağ asitleri gibi çoklu girdi sinyalleri

tarafından düzenlendiği mTORC1'in protein sentezinin yanı sıra lipid sentezini, mitokondriyal metabolizmayı ve biyogenezi de kontrol edebileceği (Laplane ve Sabatini, 2009), ayrıca organel yıkımı ve protein döngüsünde önemli katabolik bir süreç olan otofajiyi negatif olarak düzenlediği (Jung ve ark., 2010) gösterilmiştir. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında mTORC1'in ağırlıklı olarak Ser2448 üzerinde fosforile edilmiş mTOR içerdiği bilgisi göz önüne alınarak OB'de p-mTOR (Ser2448)'in ekspresyonu incelendi. Bu çalışmada mTOR protein miktarı PTU grubunda en düşük, PTU+L grubunda ise en yüksek olduğu bulunurken, p-mTOR/mTOR oranının her iki deney grubunda CON grubundakinden daha yüksek olduğu, bununla birlikte CON ve deney grupları arasında farklılıkların önemsiz olduğu tespit edildi. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar hipotiroidizmin ve hipotiroidizm sonrası levotiroksin tedavisinin OB'de mTOR fosforilasyonunu teşvik ettiğini göstermektedir. Ancak gruplar arası farklılıkların önemsiz olması fosforilasyon olaylarının dinamik doğası göz önüne alındığında mTOR fosforilasyonunun mTOR sinyal yolağını aktive etmek veya otofajiyi inhibe etmek için yeterli olmadığını ve bunun da hipotiroidizm oluşturma ve tedavisi için uygulanan sürenin kısa olmasından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir.

Tüberoskleroz (TS) TSC1 veya TSC2'yi inaktive eden mutasyonların neden olduğu nörolojik gelişimsel bir bozukluktur. TSC1 ve TSC2 genleri sırasıyla hamartin ve tuberin proteinlerini kodlar. Hamartin ve Tuberin, mTOR'nin Rheb aktivasyonunu önleyen bir GTPaz aktive edici protein heteromeri oluşturur. Böylece, TSC1 veya TSC2'deki inaktive edici mutasyonlar hücrel büyüme ve protein sentezinin kontrolünde kilit bir oyuncu olan mTOR aktivitesini artırır (Riley ve ark., 2022). Tüberoz skleroz tümör baskılayıcı kompleksi 2, mTORC1 aktivitesinin önemli bir inhibitörüdür (Huang ve ark., 2008). TSC2, hem AKT hem de AMPK'nın doğrudan hedefidir. Serin/treonin kinaz AKT TSC2'nin Ser939 ve Thr1462'sini doğrudan fosforile edebilir (Manning ve ark., 2002). Tüberoz skleroz kompleksi 2'nin AKT tarafından fosforilasyonu TSC1/2 kompleksinin inaktivasyonu ile sonuçlanır (Inoki ve ark., 2002; Manning ve ark., 2002; Potter ve ark., 2002). AMP ile aktive olan kinazın enerji açlığı ile aktivasyonu, TSC2'nin T1227 ve S1345 üzerinde doğrudan fosforilasyonu ile sonuçlanır. Tüberoz skleroz kompleksi 2'nin AMPK tarafından fosforilasyonu TSC2'nin mTOR'yi inhibe etmek üzere aktivitesini artırabilir (Inoki ve ark., 2003). Tüberoskleroz çeşitli

organlarda (deri, böbrekler, kalp ve merkezi sinir sistemi gibi) organ işlevini engelleyebilen iyi huylu tümörleri içerir. Tüberosklerozda ventriküler-subventriküler bölge, korteks, olfaktör kanal ve OB'de büyüme ve lezyonlar meydana gelir (Riley ve ark., 2022). Nitekim çeşitli çalışmalar, yenidoğan SVZ NSC'lerinde TSC1'in silinmesi yoluyla TSC genlerinin OB gelişimindeki rolünü incelemiştir (Feliciano ve ark., 2012; Feliciano ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2011). Bu çalışmalarda SVZ NSC'lerinde TSC1/TSC2 mutasyonlarının anormal OB gelişimiyle sonuçlandığı (Feliciano ve ark., 2013), koşullu TSC1 geninin silinmesinin nöroblast göç kusurlarına ve daha az olfaktör granül hücrenin şekillenmesine neden olduğu (Zhou ve ark., 2011), TSC1'den yoksun nöroblastların daha yavaş göç ettikleri, granül nöronların düzensiz oldukları ve hiperaktif mTORC1'e sahip oldukları (Feliciano ve ark., 2012) gösterilmiştir. Tsc2'nin koşullu kaybının da granül hücre gelişimini değiştirdiği bildirilmiştir. Doğum sonrası 30. günde oluşan Tsc2 mutant granül hücrelerde hipertrofik dendritik dallanmanın olduğu, buna karşılık, olgun granül hücrelerden Tsc2 kaybının, soma boyutu ve dendrit arborizasyonu üzerinde ihmal edilebilir etkilerinin bulunduğu saptanmıştır. OB granül hücrelerinde Tsc2 kaybının mTOR yolunu aktive ettiği ve Tsc2mut/mut granül hücrelerin kontrol granül hücrelerden daha büyük olduğu (sitomegali) gösterilmiştir (Riley ve ark., 2022). Bu çalışmada hipotiroidizmin OB'de TSC2'nin ekspresyonu ve lokalizasyonunu etkileyip etkilemediği ve ayrıca TSC2'nin Thr1462 üzerinde fosforile olarak inaktif olup olmadığı araştırıldı. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları TSC2'nin püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmalarında, GL, EPL ve MCL'sindeki akson ve dendritler ile GCL'deki sinir tellerinde bulunduğunu, TSC2- pozitif boyanma yoğunluğunun tüm gruplarda püsküllü hücrelerde orta şiddette, mitral hücrelerde ise PTU grubunda kuvvetli diğer gruplarda ise orta derecede olduğunu, GCL'sinde sinir tellerinde ise CON ve PTU grubunda kuvvetli olduğunu gösterdi. Bunun yanısıra p-TSC2 (Thr1462)'nin ise PTU ve PTU+L grubunda püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmasında, glomerüller etrafındaki akson veya dendritlerde orta derecede boyanma sergilediği, CON grubunda negatif ya da zayıf reaksiyon verdiği, ayrıca sadece PTU+L grubunda GCL'sindeki sinir tellerinde pozitif immünboyanma sergilediği tespit edildi. Çoğu hücre hattında koşullar optimal olduğunda TSC2'nin sitoplazmada dağınık bir şekilde lokalize olduğu, oysa hücrelere tek bir inhibitör uyaran uygulandığında lizozomlara yeniden

lokalize olduğu ve böylece mTORC1'i inhibe ettiği gösterilmiştir (Demetriades ve ark., 2016). Sunulan alışmada TSC2'nin mitral ve püsküllü hücrelerde sitoplazmik boyanma sergilediği saptanmış olup, elektron mikroskopik incelemeler yapılamadığından lizozomal lokalizasyonun olup olmadığı saptanamamıştır. Western blot analiz sonuçları ise TSC2'nin göreceli miktarının PTU grubunda CON grubuna göre arttığını, PTU+L grubunda ise azaldığını, p-TSC2'nin ise her iki deney grubunda artış eğiliminde olduğunu gösterdi. CON ve deney grupları arasında farklılıklar istatistiksel olarak önemli olmasa da deney gruplarında CON grubuna göre artan fosforilasyon oranı saptanmış olup bu PTU ve PTU+L gruplarında TSC2'nin Thr1462'de fosforile olarak inhibe olduğunu göstermektedir (Inoki ve ark., 2002; Manning ve ark., 2002; Potter ve ark., 2002).

Beclin 1, otofajinin başlatılmasında kilit bir role sahip bir proteindir (Cao ve ark., 2007). Sınıf III PI 3-kinaz Vps34'ün otofajiyi teşvik edici aktivitesini düzenler (Zeng ve ark., 2006) ve otofagozomlar olarak adlandırılan anahtar otofaji veziküllerini oluşturmak için membranların toplanmasında rol oynar. Beclin 1 ayrıca Bcl-2 ile etkileşime girer (Liang ve ark., 1998) ve hücre sağkalımının düzenlenmesinde önemli bir işlev görür (Chu ve ark., 2007). Beclin 1 gibi erken dönem otofaji düzenleyicilerinin bir yandan yetişkin SVZ'deki kök hücre havuzunu koruduğu, diğer yandan da nöral öncü hücrelerin hayatta kalmasını artırarak olgunlaşmamış nöron seviyesini kontrol ederek yetişkin nöroenezinde çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Yazdankhah ve ark., 2014). Bugüne değin yapılan çalışmalar sinir sistemine ait doku ve organlarda Beclin 1'in varlığı ve lokalizasyonunun doku tipine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Alzheimer hastalığındakine benzer hasarı olan nöronlarda Beclin 1 fragmanlarının dağılımının araştırıldığı bir çalışmada Beclin 1'in hem nöron-glia ko-kültürlerinde hem de kortikal doku dilimlerinde nöronlarda eksprese edildiğini ancak astrositlerde eksprese edilmediği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2017). Bir diğer çalışmada Beclin-1'in beyinde nöronlarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Qiao ve ark., 2018). Sase ve arkadaşları (2018) Beclin-1 immünoaktivitesinin optik sinirde esas olarak gliya hücrelerinde bulunduğunu, bunun yanı sıra Beclin-1 ve nörofilamentlerin kısmi kolokalizasyonunu gözlemlediklerini, bu nedenle de Beclin-1'in nöronlarda da bulunmasının muhtemel olduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca, Beclin-1'in dağılımının

nöronların türüne bağlı olarak değişebileceğini, ancak hem nöronlarda hem de gliya hücrelerinde mevcut olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan literatür taramalarında Beclin1'in OB'de lokalizasyonuna ilişkin herhangi bir bilgiye rastlanmadı. Sunulan tez çalışmasında Beclin 1'in OB'deki immünlokalizasyonu incelendiğinde Wang ve arkadaşları (2017) tarafından beyin dokusunda bildirilenlere benzer olarak Beclin 1'in gliya hücrelerinde bulunmadığı ancak CON ve PTU grubunda OB nöronlarından sadece mitral hücrelerde, PTU+L grubunda da hem püsküllü hem de mitral hücrelerde zayıf bir boyanma sergilediği, bununla birlikte tüm gruplarda glomerüller etrafındaki ve diğer katmanlardaki bazı akson ve dendritlerde kuvvetli olduğu görüldü. PTU+L grubunda glomerüller etrafındaki ve GCL katmanındaki Beclin 1-pozitif sinir teli miktarının diğer gruplardakinden daha fazla olduğu dikkati çekti. Bu bulgular immünohistokimya tekniği ile sınırlı olduğundan Beclin 1'in OB'deki fonksiyonu tam olarak açıklanamadı. Nitekim bu çalışmada incelenen tüm otofaji ile ilişkili olarak proteinlerin de periglomerüler nöropildeki, EPL ve MCL katmanındaki akson ve dendritler ile GCL'deki sinir tellerinde de bulunduğu gözlemlendi.

Otofajik sistem, büyüyen otofagozomlar tarafından belirli kargoların yutulmasını kolaylaştırarak otofajik sürecin seçiciliğini artıran otofaji reseptörleri olarak bilinen proteinleri de kullanır (Stolz ve ark., 2014). Otofaji reseptör proteinleri, hem bir ubiquitin bağlayıcı alan (UBD) hem de LC3 ile etkileşime giren bir bölge (LIR)1,4 içeren ortak bir alan organizasyonunu paylaşır (Bento ve ark., 2016; Stolz ve ark., 2014). Bu da bir yandan otofajik kargo üzerindeki bozunma sinyalinin tanıyan ve diğer yandan büyüyen otofagozomal membrandaki LC3'ü bağlayan köprü molekülleri olarak hareket etmelerini sağlar. Otofajide önemli bir rol oynadığı gösterilen en yaygın çalışılmış otofaji reseptörü p62/SQSTM-1'dir (sekestozom-1) (Moscat ve Diaz, 2009; Stolz ve ark., 2014). Sekestozom 1 (p62/SQSTM1) proteini her yerde eksprese edilen ve özellikle makrotofaji sürecinde ubiquitin ve otofagozom membranında hafif zincir 3'e (LC3) bağlanan bir adaptör proteindir (Björkøy ve ark., 2005; Pankiv ve ark., 2007). Ubikitine proteinleri otofagozom membranına tutturarak istenmeyen moleküllerin parçalanmasını teşvik eder. Bu otofagozomlar nihayetinde lizozomlarla birleşir ve bu da substratlarının bozunmasıyla sonuçlanır (Ichimura ve ark., 2008). Aynı zamanda hücresel metabolizmada, sinyalizasyonda ve apoptozda da rolleri vardır. p62/SQSTM1 en çok agregafaji yoluyla protein agregatlarının

temizlenmesindeki rolüyle bilinir, ancak son zamanlarda mitofaji ve lipofaji gibi diğer seçici otofaji formları için bir reseptör olarak işlev gördüğü ortaya çıkmıştır (Liu ve ark., 2016). P62/SQSTM1 otofaji substratları olduğundan, otofaji bozulduğunda seviyeleri genellikle artar (Björkøy ve ark., 2005; Moscat ve Diaz-Meco, 2009).

P62/SQSTM1 proteininin nörodejeneratif hastalıklarda ve diğer protein agregasyon hastalıklarında çeşitli sitoplazmik inklüzyonların bir bileşeni olduğu ve sitoplazmik inklüzyonlarda diğer stres proteinleri ve ubiquitin ile birlikte p62/SQSTM1'in varlığının yeniden katlanma ve bozunmaya ek olarak yanlış katlanmış proteinlere karşı üçüncü bir savunma hattı olarak agregatlar halinde birikime işaret ettiği bildirilmiştir (Zatloukal ve ark., 2002). Bir diğer çalışmada, endojen ve ektopik olarak ifade edilen p62/SQSTM1'in insan HeLa hücrelerinin perinükleer alanında çok sayıda yuvarlak cisimcikte bulunduğunu kaydedilmiştir (Lamark ve ark., 2003). Björkøy ve ark. (2005) da HeLa hücrelerinde p62/SQSTM1'in sitozolde iki farklı tip cisimcikte bulunduğunu, bunlardan birinci tipin bir zarla çevrili olmayan ve canlı hücrelerde çok düşük hareketliliğe sahip büyük protein agregatları (sekestozomlar) olduğunu, ikinci tipin ise genellikle erken endozomal belirteçlerle zayıf, ancak birlikte eksprese edilen myc veya GFP (Green Fluorescent Protein) etiketli LC3 ile güçlü bir şekilde kolokelize olan çok daha yüksek hareketliliğe sahip daha küçük yapılar olduğunu tespit etmişler ve p62/SQSTM1'in kısmen membranla çevrili otofagozomlara ve kısmen de sitozolik sekestozomlara yerleştiğini bildirmişlerdir. HeLa hücrelerindeki bu lokalizasyon modelinin HEK293, MDCK II, U2OS, A431, HT1080, TERT fibroblastları, NIH3T3 fibroblastları ve çeşitli insan nöroblastom hücre hatları dahil olmak üzere çok çeşitli hücre hatlarında gözlendiğini ve bu heterojen p62/SQSTM1 dağılımının nedeninin bilinmediğini ancak, p62/SQSTM1 cisimciklerinin şu veya bu şekilde çeşitli hücre tipleri arasında yaygın olduğunu rapor etmişlerdir (Björkøy ve ark., 2005). p62/SQSTM1'in OB'deki varlığı da birkaç çalışma ile gösterilmiştir (Hubbs ve ark., 2016; Mitsui ve ark., 2018). Hubbs ve ark. (2016) konfokal mikroskop ile diasetile maruz bırakılmış farelerin OB'sinde p62/SQSTM1'in glomerüler bölgeye ve hemen bitişiğindeki nöropile lokalize olduğunu ve immünoreaktif p62/SQSTM1'in dağınık yerleşimli ve nano ölçekli noktalar halinde ve belirli odaklarda kümelenmiş birikimler halinde olmak üzere iki model sergilediğini, dağınık yerleşimli ve nano ölçekli noktalar halindeki p62/SQSTM1'in immünoreaktivitesi olfaktör marker protein-

pozitif aksonların içinde veya yakınında lokalize olduğunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar protein agregatlarının nöronlar tarafından kolayca taşındığı bilgisine dayanarak p62/SQSTM1'in veya yanlış katlanmış proteinlerin burundan OB'ye taşınarak biriktiğini ve bu nedenle p62/SQSTM1'in protein agregatlarının oluşabileceği bir iskele olarak görev yaptığını ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte OB'deki p62/SQSTM1'in lokalizasyonu ile fonksiyonu tam olarak ortaya konamamıştır. Bu tez çalışmasında p62/SQSTM1'in hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili sıçanların OB'deki lokalizasyonu ve ekspresyonunun değişip değişmediği de incelendi. İmmünohistokimyasal boyanmalar p62/SQSTM1'in glomerüler ve diğer katman nöropillerinde, gliya, püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmalarında, GL, EPL ve MCL'sindeki akson veya dendritlerde ve GCL'deki sinir tellerinde lokalize olduğu belirlendi. CON grubunda glomerüler nöropildeki pozitif boyanmanın kuvvetli, PTU grubunda orta derecede, PTU+L grubunda ise zayıf olduğu, ayrıca tüm gruplarda püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmalarında kuvvetli olduğu gözlemlendi. Bu hücrelerdeki boyanmanın nokta ya kümeler şeklinde olduğu dikkati çekti. Her ne kadar Hubbs ve ark. (2016) fare OB'sinde p62/SQSTM1'in glomerüler bölgeye ve hemen bitişiğindeki nöropile lokalize olduğunu bildirirse ve püsküllü ve mitral hücrelerdeki lokalizasyonuna ilişkin de herhangi bir veri sunmasa da sıçan OB'sinde p62/SQSTM1'in mitral ve püsküllü hücrelerdeki bu boyanma özelliği Hubbs ve arkadaşlarının (2016) immünoreaktif p62/SQSTM1'in dağınık yerleşimli noktalar halinde ve belirli odaklarda kümelenmiş birikimler halinde olmak üzere iki model sergilediğini bildiren verisiyle ve Björköy ve arkadaşlarının (2005) HeLa hücrelerinde tanımladığı bulgularla örtüşmekte olup p62/SQSTM1 cisimciklerinin bulunduğu hücre tipleri arasına OB'nin mitral ve püsküllü hücrelerinin de dahil edebileceğini göstermektedir. Ancak immünohistokimya tekniği ile sınırlı olan bu çalışma bulguları sıçan OB'sinde p62/SQSTM1'in fonksiyonunu açıklamak için yetersiz olduğundan ve CON ve deney gruplarında mitral ve püsküllü hücrelerde nokta ya da kümeler şeklindeki immünoreaktif p62/SQSTM1'in kapladığı alan ölçülemediğinden bunların hipotiroidizm ve hipotiroidizm sonrası tedavi sürecinde değişip değişmediği ortaya konamadı. Sıçan OB'sinde Beclin 1 ve p62/SQSTM1 ekspresyonunun göreceli miktarları WB analiziyle değerlendirildiğinde PTU+L grubunda Beclin 1 ekspresyonunun göreceli miktarı CON ve PTU grubundakinden

daha yüksek, p62/SQSTM1 ekspresyonu ise PTU+L grubunda ise diğer gruplardan daha düşük bulundu. Bunun yanı sıra Beclin 1/p62 oranının PTU+L grubunda en yüksek, CON grubunda ise en düşük olduğu gözlemlendi. Ancak tüm bu verilere ilişkin olarak gruplar arası farklılıkların istatistiksel açıdan önemsiz olduğu tespit edildi ($P>0.05$). Düşük Beclin 1 seviyeleri p62 birikimi ile azalmış otofajiye yansıtılabilirken, yüksek Beclin 1 seviyelerinin, otofaji aracılı bozulma yoluyla p62 cirolu otofaji aktivasyonu ile tutarlı olduğu bildirilmiştir (Komatsu ve ark., 2007a). Bu bilginin ışığında çalışmamız bulguları PTU+L grubunda yüksek düzeyde olmasa bile otofajinin indüklenmiş olabileceği fikrini desteklemektedir.

Otofajinin başlatılması sırasında otofagozom oluşumu iki ardışık ubikitin benzeri reaksiyonu içerir. İlk reaksiyon, ubikitin benzeri ATG12'yi ATG5'e konjuge eden E1 benzeri ATG7 ve E2 benzeri ATG10 enzimlerini kullanır. Bu konjugat daha sonra ATG16L1 ile bir kompleks oluşturur (Zavodszky ve ark., 2013). İkinci reaksiyon seti ubikitin benzeri LC3 protein ailesini içerir. LC3, izolasyon membranı oluştuktan sonra otofajinin geç aşamalarında yer alır. LC3-I, pro-LC3'ün ATG4 tarafından proteolitik olarak parçalanmasıyla üretilir ve bu da konjugasyona uygun bir C-terminal glisinini ortaya çıkarır. E1 benzeri enzim olan ATG7, E2 benzeri enzim olan ATG3 ve E3 benzeri enzim olan ATG5-12-16L1 kompleksi daha sonra LC3 ailesi üyelerini yeni oluşan otofagozomların yüzeyindeki fosfatidiletanolamine (PE) konjuge eder ve sonuçta LC3-II oluşur (Bento ve ark., 2016). LC3 daha sonra adaptör protein p62/SQSTM1'e bağlanarak lizozomlardaki ubikitine protein agregatlarının otofajik yıkımını kolaylaştırır (Pankiv ve ark., 2007). Bu nedenle p62/SQSTM1 ve LC3, otofaji seviyesini izlemek için rutin bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Klionsky ve ark., 2012). Modifiye edilmemiş LC3-I formu sitozoliktir, LC3-II ise muhtemelen COOH terminalinde fosfatidiletanolamine kovalent olarak bağlıdır ve otofaji için önemli bir belirteç olarak hizmet ederek otofagozomal membranlara sıkıca bağlanır.

LC3 immünohistokimya/immünohistokimya/immünofloresan teknikleri, otofagozom sayısını ölçmek için en yaygın kullanılan testlerden biridir (Menzies ve ark., 2012). Bu teknikler ile LC3-I sitosolde dağınık bir sinyal oluştururken, LC3-II otofagozomları temsil eden noktasal boyanma olarak gözlenir. Dolayısıyla bu tekniklerde, LC3-II'nin membranla ilişkili olduğu ve bu nedenle hücrede küçük farklı belirgin noktalar (punkta) olarak görüldüğü ve kolayca görselleştirilebildiği, böylece

nicelleştirilebildiği ilkesine dayanmaktadır (Bento ve ark., 2016). LC3-II nispeten spesifik olarak otofagozomlar ve otolizozomlarla ilişkili olduğundan (LC3 ile ilişkili fagositozu uyaran koşulların yokluğunda), LC3-pozitif noktaların kantifikasyonu, hücrelerdeki otofagozomların sayısını değerlendirmek için altın standart bir test olarak kabul edilir. Bu tür deneylerde, otofagozom oluşumunun artması veya bozunmanın bozulması durumunda LC3-pozitif yapıların sayısı veya toplam alanı artabilir. Bununla birlikte, otofagozom biyogenezinin bozulması durumunda LC3-pozitif yapıların sayısının ve alanlarının azalması gerektiği ve LC3-II'nin oluşmadığı hücrelerde LC3-pozitif yapıların olmaması gerektiği varsayılmıştır. Bununla birlikte, şaşırtıcı bir şekilde, LC3-I'in otofaji tehlikeye girdiğinde biriktiği ve inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu bilinen p62-pozitif agregatlarla ilişkili olabileceği gösterilmiş ve bu varsayımların yanlış olduğu ileri sürülmüştür (Björkøy ve ark., 2005; Komatsu ve ark., 2007a). Ayrıca Runwal ve arkadaşları (2019) endojen LC3-pozitif noktaların otofagozom oluşumunun iptal edildiği hücrelerde daha büyük hale geldiğini ve LC3-II oluşmadığında bile belirgin olduğunu, bu durumun otofagozom biyogenezinin geçici ve eksik inhibisyonunda bile ortaya çıktığını ve bu fenomenin, otofaji bozulduğunda biriken p62 agregatlarına LC3-I sekestrasyonundan kaynaklandığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılar bu gözlemin, otofaji bozukluğu olan hücrelerde LC3-immüno Floresan deneylerinin güvenilirliğini sorguladığını ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle otofaji deneylerinde en iyi yaklaşım LC3'ü Western blotta tespit etmek ve LC3-I/LC3-II oranlarını otofagozom sayısı veya otofagozom noktaları için pozitif olan hücrelerle ilişkilendirmektir (Klionsky ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında hipotiroidizmin ve hipotiroidizm sonrası tedavi sürecindeki sıçanların OB dokularında otofagozomun şekillenmesinin önemli belirteci olarak kabul edilen mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3)'ün ekspresyon ve lokalizasyonlarındaki olası değişiklikler immunohistokimya ve western blot analiz teknikleriyle incelendi ve bu tekniklerde iki farklı firma tarafından üretilen MAPLC3 α/β ve MAP1LC3A adlı antikorlar kullanıldı. Bunlardan MAPLC3 α/β (G-4), insan kaynaklı MAPLC3 β 'nın bir iç bölgesi içinde 33-56 amino asitleri arasındaki epitop haritalamasına spesifik bir fare monoklonal antikorudur. MAP1LC3A antikoru ise tavşanda hazırlanmış rekombinant monoklonal bir antikor otofagozom belirteci olarak tanımlanmıştır. Bu antikorun üretilmesinde kullanılan kesin immünojen dizisi

hakkındaki bilgi tescilli olduğundan bilinmemektedir. Çalışmada MAPLC3 α/β antikoru ile elde edilen immünohistokimya sonuçları tüm gruplarda püsküllü ve mitral hücrelerin sitoplazmalarının kuvvetli pozitif olduğunu ve ayrıca OB'nin tüm katmanlarında bulunan akson ve dendritlerin de ortadan kuvvetliye doğru değişen yoğunluklarda boyandığını gösterdi. CON ve PTU grubunda MCL katmanında bulunan bazı granül hücrelerin sitoplazmalarında da MAPLC3 α/β -pozitif immünreaksiyon tespit edildi. Püsküllü ve mitral hücrelerdeki boyanma incelendiğinde sitoplazmada homojen boyanmanın olmadığı, bazı alanlarda yoğun boyanmış odaklar oluşturduğu ve bu yoğun boyanan odakların PTU ve PTU+L grubunda daha belirgin olduğu gözlemlendi. MAP1LC3A antikoru ile elde edilen sonuçların MAPLC3 α/β 'ninkinden daha farklı olduğu görüldü. ONL'sinde sinir tellerinin, glomerüler ve diğer katmanların nöropillerinin MAP1LC3A ile orta dereceden kuvvetliye kadar değişen yoğunluklarda boyandığı belirlendi. Püsküllü ve mitral hücre sitoplazmalarında CON ve PTU+L grubunda kuvvetli, PTU grubunda ise orta derecede bir reaksiyon görülürken, GCL'sindeki sinir tellerinin PTU grubunda kuvvetli boyandığı, CON ve PTU+L grubunda ise çok belirgin olmadığı tespit edildi. Literatür bilgileri (Bento ve ark., 2016) ışığında değerlendirildiğinde OB'de mitral ve püsküllü hücrelerdeki sitoplazmik boyanmanın yanı sıra daha yoğun boyanan MAPLC3 α/β -pozitif odakların bu hücrelerde bulunan otofagozomlar veya otolizozomlar ile ilişkili olduğu düşünüldü. Bununla birlikte MAPLC3 α/β -pozitif odakların Runwal ve arkadaşları (2019) tarafından bildirildiği gibi küçük belirgin noktalardan (punkta) ziyade daha büyük olduğu ve mitral ve püsküllü hücrelerdeki p62 boyanmasına benzediği dikkati çekti.

Moleküler kütle olarak daha büyük olmasına rağmen, potansiyel olarak artan hidrofobiklik nedeniyle LC3-II SDS-PAGE jellerinde daha hızlı elektroforetik hareketlilik gösterir. LC3-II, LC3-I için 16-18 kDa'ya kıyasla 14-16 kDa'da görünür. LC3-I ve LC3-II'nin farklı hareketliliği, Western blot testinde tespit edilmelerine ve karakterize edilmelerine yardımcı olur ve LC3-I'in daha düşük göç eden LC3-II formuna dönüşümü sayısız çalışmada otofajinin bir göstergesi olarak kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında Western blot analizi kullanılan her iki LC3 antikorumun CON ve deney gruplarındaki sıçanların OB'sinde eksprese edildiğini gösterdi. Çalışmada OB örneklerinde LC3-I ve LC3-II'yi gösteren iki bandın şekillenmesi beklenirken yaklaşık

14-15 kDa ağırlığında tek bant bulunduğu tespit edildi. Çalışmada kullanılan antikolar otofagozom belirteci olarak üretilmiş olduğundan bu bandın LC3-II'yi temsil ettiği varsayıldı. Nitekim Kim ve arkadaşları (2008) retinal gangliyon hücrelerinde LC3 ekspresyonunu incelemişler ve WB analizinde LC3-II'yi tek bant olarak görüntülemişlerdir. Çalışmada kullanılan her iki antikorun özellikle de MAPLC3 α/β ekspresyonunun göreceli miktarlarının CON grubunda en düşük, PTU grubunda ise en yüksek olduğđ, ancak bu farklılıkların önemli olmadığı ($P>0.05$) tespit edilmiş olup, bu sonuçlar OB'deki LC3-II seviyesinin hipotiroidi durumunda arttığını ve hipotiroidizmin tedavi edilmesini takiben azaldığını ve her iki durumda da kontrollerden daha yüksek kaldığını göstermektedir. Bu durumda hipotiroidizm ve hipotiroidizm sonrası süreçte otofagozomların şekillenmiş olabileceği, otofajinin OB'yi olumsuz bir ortama adapte etmek için aktive edildiğini ve otofajinin bu modelde nöroprotektif olarak rol oynadığı ileri sürülebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hipotiroidizm oluşturulmuş ve hipotiroidizm oluşturulup levotiroksin ile tedavi edilmiş erişkin sıçan modelinde tiroid bezi disfonksiyonuna bağlı olarak şekillendiği bildirilen olası koku alma bozukluklarında OB dokusunda otofajinin rolünün olup olmadığının araştırıldığı bu çalışmanın sonunda koku bozukluğunun hipotiroidili sıçanlarda önemli ölçüde şekillenmesi beklenirken, levotiroksin ile tedavi edilen hayvanlarda daha yüksek düzeyde oluştuğu belirlendi. Sıçanların OB'sinde otofaji ile ilişkili proteinlerin eksprese olduğu ve bunların OB bileşenlerindeki lokalizasyonlarının farklı olduğu, olfaktör nöronlar olan mitral ve püsküllü hücrelerde Beclin hariç olmak üzere AMPK α 1/2, p-AMPK α -1/2(Thr183/Thr172), ULK1, pULK1(Ser467), mTOR, p-mTOR, TSC2, pTSC2, p62/SQSTM1 ve LC3'ün eksprese edildiği belirlendi. Çalışmada incelenen otofaji biyobelirteçlerinin ekspresyonlarının hem hipotiroidizm hem de hipotiroidizm oluşturulup levotiroksin ile tedavi edilmiş erişkin sıçan modelinde normal OB'ye kıyasla değiştiği, tedavi grubunda koku fonksiyon kaybına paralel olarak OB'yi olumsuz bir ortama adapte etmek için yüksek düzeyde olmasa bile otofajinin aktive edildiği tespit edildi. Bu sonuçlar tiroid disfonksiyonunun OB'de otofajinin çeşitli basamaklarını düzenleyen sinyal yollarını değiştirebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte tiroid fonksiyon bozukluklarında kesin olarak otofaji aktive olur veya inhibe olur diyebilmek için hipotiroidi oluşturma ve tedavi protokollerinde kullanılan propiltiourasil ve levotiroksin gibi maddelerin daha uzun süre uygulanması veya alternatif kimyasalların kullanılarak olfaktör sistem üzerindeki etkilerinin araştırılmasının gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca hipertiroidizm oluşturulup bunun OB'deki otofaji sürecini nasıl etkilediği sorusunun da araştırılması yararlı olacaktır. Bu otofajinin tedavide kullanılan levotiroksin etkisiyle mi oluştuğu yoksa levotiroksinin hipotiroidizm

şekillenmediği durumda bile otofajinin indüksiyonu veya inhibisyonunda etkili olduğu sorularının yanıtlanmasına katkı sağlayacaktır.



7. KAYNAKLAR

- Abaffy T, Lu HY, Matsunami H. Sex steroid hormone synthesis, metabolism and the effects on the mammalian olfactory system. *Cell Tissue Res*, 2023; 391: 19-42.
- Abalovich M, Amino N, Barbour LA, Cobin RH, De Groot LJ, Glinioer D, Mandel SJ, Stagnaro-Green A. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92: S1-S47.
- Abraham P, Acharya S. Current and emerging treatment options for Graves' hyperthyroidism. *Ther Clin Risk Manag*, 2010; 6: 29-40.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*, 2005; 85: 523-569.
- Agarraberes FA, Dice JF. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*, 2001; 114: 2491-2499.
- Aguilar Martínez N, Aguado Carrillo G, Saucedo Alvarado PE, Mendoza García CA, Velasco Monroy AL, Velasco-Campos F. Clinical importance of olfactory function in neurodegenerative diseases. *Rev Méd Hosp Gen Méx*, 2018; 81: 268-275.
- Ahrén B. Effects of calcitonin, katelectin and calcitonin gene-related peptide on basal and TSH-stimulated thyroid hormone secretion in the mouse. *Acta Physiol Scand*, 1989; 135: 133-173.
- Ahrén B. Regulatory peptides in the thyroid gland-a review on their localization and function. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1991; 124: 225-232.
- Albanesi J, Wang H, Sun HQ, Levine B, Yin H. GABARAP-mediated targeting of PI4K2A/PI4KIIalpha to autophagosomes regulates PtdIns4P-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 2015; 11: 2127-2129.
- Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, Olsvik H, Øvervatn A, Kirkin V, Johansen T. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *J Biol Chem*. 2012; 287: 39275-39290.
- Alfaro IE, Albornoz A, Molina A, Moreno J, Cordero K, Criollo A, Budini M. Chaperone mediated autophagy in the crosstalk of neurodegenerative diseases and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019; 9: 778.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*, 2002; 22: 629-634.

- Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008; 73: 357-65.
- Álvarez-Camacho M, Gonella S, Campbell S, Scrimger RA, Wismer WV. A systematic review of smell alterations after radio therapy for head and neck cancer. *Cancer Treat Rev*, 2017; 54: 110-121.
- Alvarez-Dolado M, Figueroa A, Kozlov S, Sonderegger P, Furley AJ, Munoz A. Thyroid hormone regulates TAG-1 expression in the develop in grat brain. *Eur J Neurosci*, 2001; 14: 1209-1218.
- Amato S, Liu X, Zheng B, Cantley L, Rakic P, Man HY. AMP-Activated Protein Kinase Regulates Neuronal Polarization by Interfering with PI 3-Kinase Localization. *Science*, 2011; 332: 247-251.
- Amato S, Man HY. Bioenergy sensing in the brain: the role of AMP-activated protein kinase in neuronal metabolism, development and neurological diseases. *Cell Cycle*, 2011; 10: 3452-3460.
- Ambivero CT, Cilenti L, Main S, Zervos AS. Mulan E3 ubiquitin ligase interacts with multiple E2 conjugating enzymes and participates in mitophagy by recruiting GABARAP. *Cell Signal*, 2014; 26: 2921-2929.
- Ambrogini P, Cuppini R, Ferri P, Mancini C, Ciaroni S, Voci A, Gerdoni E, Gallo G. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology*, 2005; 81: 244-253.
- Angelo K, Margrie TW. Population diversity and function of hyperpolarization-activated current in olfactory bulb mitral cells. *Sci Rep*, 2011; 1:50.
- Antal M, Eyre M, Finklea B, Nusser Z. External tufted cells in the main olfactory bulb form two distinct subpopulations. *Eur J Neurosci*, 2006; 24: 1124-1136.
- Arias E, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol*, 2011; 23: 184-189.
- Ariosa AR, Klionsky DJ. Autophagy core machinery: over comings patial barriers in neurons. *J Mol Med (Berl)*, 2016; 94: 1217-1227.
- Asan E, Drenckhahn D: Immunocytochemical characterization of two types of microvillarcells in rodent olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol*, 2005, 123: 157-168.
- Atakpa P, Thillaiappan NB, Mataragka S, Prole DL, Taylor CW. IP3 receptors preferentially associate with ER-lysosome contact sites and selectively deliver Ca²⁺ to lysosomes. *Cell Rep*, 2018; 25: 3180-3193.
- Aungst JL, Heyward PM, Puche AC, Karnup SV, Hayar A, Szabo G, Shipley MT. Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature*, 2003; 426, 623-629.
- Auteri JS, Okada A, Bochaki V, Dice JF. Regulation of intracellular protein degradation in IMR-90 human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol*, 1983; 115: 167-174.

- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, T Ktistakis NT. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 2008; 182: 685-701.
- Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD, Kandel ER. Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signalling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 5280-5285.
- Bach M, Larance M, James DE, Ramm G. The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochem J*, 2011; 440: 283-291.
- Bahn Chair RS, Burch HB, Cooper DS, Garber JR, Greenlee MC, Klein I, Laurberg P, McDougall IR, Montori VM, Rivkees SA, Ross DS, Sosa JA, Stan MN. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Thyroid*, 2011; 21: 593-646.
- Bailey MS, Shipley MT. Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J Comp Neurol*, 1993; 328: 501-526.
- Bakalyar HA, Reed RR. Identification of a specialized adenylylcyclase that may mediate odorant detection. *Science*, 1990; 250: 1403-1406.
- Bakker J, Leinders-Zufall T. The sense of smell: role of the olfactory systems in detecting pheromones. In: Pfaff D, Volkow N (eds), *Neuroscience in the 21st Century*. Springer, New York 2016; p.: 1-26.
- Ballesteros-Álvarez J, Andersen JK. mTORC2: The other mTOR in autophagy regulation. *Aging Cell*, 2021; 20: e13431.
- Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol*, 2008; 28: 5747-5763.
- Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kaushik S, Kiffin R, Cuervo AM. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell*, 2010; 39: 535-547.
- Baqui MM, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immuno fluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, 2000; 141: 4309-4312.
- Baqui M, Botero D, Gereben B, Curcio C, Harney JW, Salvatore D, Sorimachi K, Larsen PR, Bianco AC. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and under goes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem*, 2003; 278: 1206-1211.
- Barasch JM, Mackey H, Tamir H, Nunez EA, Gershon MD. Induction of a neural phenotype in a serotonergic endocrine cell derived from the neural crest. *J Neurosci*, 1987; 7: 2874-2883.

- Baskoy K, Ay SA, Altundag A, Kurt O, Salihoglu M, Deniz F, Tekeli H, Yonem A, Hummel T. Is there any effect on smell and taste functions with levothyroxine treatment in subclinical hypothyroidism? *PLoS One*, 2016; 11: e0149979.
- Bassett JH, Boyde A, Howell PG, Bassett RH, Galliford TM, Archanco M, Evans H, Lawson MA, Croucher P, St Germain DL, Galton VA, Williams GR. Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 7604-7609.
- Bath KG, Mandairon N, Jing D, Rajagopal R, Kapoor R, Chen ZY, Khan T, Proenca CC, Kraemer R, Cleland TA, Hempstead BL, Chao MV, Lee FS. Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J Neurosci*, 2008; 28: 2383-2393.
- Batrinos ML. The problem of exogenous subclinical hyperthyroidism. *Hormones (Athens)*, 2006; 5: 119-125.
- Beard MD, Mackay-Sim A. Loss of sense of smell in adult, hypothyroid mice. *Dev Brain Res*, 1987; 36: 181-189.
- Beckley JT, Laguesse S, Phamluong K, Morisot N, Wegner SA, Ron D. The first alcohol drink triggers mTORC1-dependent synaptic plasticity in nucleus accumbens Dopamine D1 receptor neurons. *J Neurosci*, 2016; 36: 701-713.
- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature*, 2010; 466: 68-76.
- Belluscio L, Lodovichi C, Feinstein P, Mombaerts P, Katz LC. Odorant receptors instruct functional circuitry in the mouse olfactory bulb. *Nature*, 2002; 419: 296-300.
- Benarroch EE. Olfactory system: functional organization and involvement in neurodegenerative disease. *Neurology*, 2010; 75: 1104-1109.
- Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem*, 2016; 85: 685-713.
- Benvenuti S, Luciani P, Cellai I, Deledda C, Baglioni S, Saccardi R, Urbani S, Francini F, Squecco R, Giuliani C, Vannelli GB, Serio M, Pinchera A, Peri A. Thyroid hormones promote cell differentiation and up-regulate the expression of the *seladin-1* gene in in vitro models of human neuronal precursors. *J Endocrinol*, 2008; 197: 437-446.
- Berbel P, Auso E, Garcia-Velasco JV, Molina ML, Camacho M. Role of thyroid hormones in the maturation and organization of rat barrel cortex. *Neuroscience*, 2001; 107: 383-394.
- Berchtold NC, Coleman PD, Cribbs DH, Rogers J, Gillen DL, Cotman CW. Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2012; 34: 1653-1661.
- Bernal J, Nunez J. Thyroid hormones and brain development. *Eur J Endocrinol*, 1995; 133: 390-398.

- Bernal J, Guadaño-Ferraz A, Morte B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid*, 2003; 13: 1005-1012.
- Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007; 3: 249-259.
- Bernal J. Thyroid hormone regulated genes in cerebral cortex development. *J Endocrinol*, 2017; 232: R83-97.
- Bernd P, Gershon MD, Nunez EA, Tamir H. Separation of dissociated thyroid follicular and parafollicular cells: association of serotonin binding protein with parafollicular cells. *J Cell Biol*, 1981; 88: 499-508.
- Bhandawat V, Reisert J, Yau KW. Elementary response of olfactory receptor neurons to odorants. *Science*, 2005; 308: 1931-1934.
- Bhatia S, Sircar SS, Ghorai BK. Taste disorder in hypo and hyperthyroidism. *Indian J Physiol Pharmacol*, 1991; 35: 152-158.
- Bianco AC, Silva JE. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *Am J Physiol*, 1988; 255: E496-503.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*, 2002; 23: 38-89.
- Bianco AC, da Conceição RR. The deiodinase trio and thyroid hormone signaling. *Methods Mol Biol*, 2018; 1801: 67-83.
- Biazik J, Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy*, 2015; 11: 439-541.
- Biondi B, Palmieri EA, Klain M, Schlumberger M, Filetti S, Lombardi G. Subclinical hyperthyroidism: clinical features and treatment options. *Eur J Endocrinol*, 2005; 152: 1-9.
- Birgisdóttir AB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*, 2013; 126: 3237-3247.
- Birgisdóttir AB, Mouilleron S, Bhujabal Z, Wirth M, Sjøttem E, Evjen G, Zhang W, Lee R, O'Reilly N, Tooze SA, Lamark T, Johansen T. Members of the autophagy class III phosphatidylinositol 3-kinase complex I interact with GABARAP and GABARAPL1 via LIR motifs. *Autophagy*, 2019; 15: 1333-1355.
- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 2005; 171: 603-614.
- Bloom G, Engström H. The structure of the epithelial surface in the olfactory region. *Exp Cell Res*, 1952; 3: 699-701.
- Bonomi M, Proverbio MC, Weber G, Chiumello G, Beck-Peccoz P, Persani L. Hyperplastic pituitary gland, high serum glycoprotein hormone α -subunit, and variable circulating thyrotropin (TSH) levels as hallmark of central

- hypothyroidism due to mutations of the TSH β gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86: 1600-1604.
- Borgmann-Winter K, Willard SL, Sinclair D, Mirza N, Turetsky B, Berretta S, Hahn CG. Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness. *Translational Psychiatry*, 2015; 5: e527.
- Bowers J, Terrien J, Clerget-Froidevaux MS, Gothié JD, Rozing MP, Westendorp RG, van Heemst D, Demeneix BA. Thyroid hormone signalling and homeostasis during aging. *Endocr Rev*, 2013; 34: 556-589.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*, 2013; 15: 713-720.
- Bradley J, Reiser J, Frings S. Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol*, 2005; 15: 343-349.
- Braunstein GD (2022). Hypothyroidism. MD, Cedars-Sinai Medical Center. Erişim: [<https://www.msmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/thyroid-disorders/hypothyroidism>], Erişim tarihi: 09.05.2023.
- Brechbühl J, Klaey M, Broillet MC. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science*, 2008; 321: 1092-1095.
- Brechbühl J, Moine F, Klaey M, Nenniger-Tosato M, Hurni N, Sporkert F, Giroud C, Broillet MC. Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013; 110: 4762-4767.
- Brechbühl J, Klaey M, Moine F, Bovay E, Hurni N, Nenniger-Tosato M, Broillet MC. Morphological and physiological species-dependent characteristics of the rodent Grueneberg ganglion. *Front Neuroanat*, 2014; 8:87.
- Brennan PA, Zufall F. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, 2006; 444, 308-315.
- Brent GA. Clinical practice. Graves disease. *N Engl J Med*, 2008; 358: 2594-605.
- Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *The J Clin Invest*, 2011; 122: 3035-3043.
- Brent GA. Hypothyroidism and thyroiditis. In: Melmed SP, Larsen PR, Kronenberg HM (eds), *Williams Textbook of Endocrinology*, PA: Elsevier, Philadelphia 2012; p.: 416-448.
- Breton-Provencher V, Lemasson M, Peralta MR, Saghatelian A. Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *Journal of Neuroscience*, 2009; 29: 15245-15257.
- Briñón JG, Alonso JR, Arévalo E, García-Ojeda E, Lara J, Aijón J. Calbindin D-28K-positive neurons in the rat olfactory bulb. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 1992; 269: 289-297.
- Brosvic GM, Risser JM, Mackay-Sim A, Doty RL. Odor detection performance in hypothyroid and euthyroid rats. *Physiol Behav*, 1996; 59: 117-121.

- Brown Jr. WL, Eisner T, Whittaker RH. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. *Bioscience*, 1970; 20: 21.
- Brunjes PC, Schwark HD, Greenough WT. Olfactory granule cell development in normal and hyperthyroid rats. *Brain Res*, 1982; 281: 149-159.
- Buck LB. Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci*, 1996; 19: 517-544.
- Buck LB. Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr Rev*, 2004; 62: 184-188.
- Bushak L. How does your nose do what it does? The inner workings of our sense of smell. Erişim: [<http://www.medicaldaily.com/how-does-nose-smell-inner-workings-our-sense-smell-324566>], Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2023.
- Bywalez WG, Ona-Jodar T, Lukas M, Ninkovic J, Egger V. Dendritic arborization patterns of small juxtaglomerular cell subtypes within the rodent olfactory bulb. *Front Neuroanat*, 2017; 10: 127.
- Caggiano M, Kauer JS, Hunter DD. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron*, 1994; 13: 339-52.
- Cai Q, Ganesan D. Regulation of neuronal autophagy and the implications in neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis*, 2022; 162: 105582.
- Cajigas IJ, Will T, Schuman EM: Protein homeostasis and synaptic plasticity. *EMBO J*, 2010; 29: 2746-2752.
- Calebiro D, Nikolaev VO, Lohse MJ. Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol*, 2010; 45: 1-8.
- Callebaut I, Curcio-Morelli C, Mornon JP, Gereben B, Buettner C, Huang S, Castro B, Fonseca TL, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. The iodothyronine seleno deiodinase sarethioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *J BiolChem*, 2003; 278: 36887-36896.
- Calza L, Forrest D, Vennstrom B, Hokfelt T. Expression of peptides and other neurochemical markers in hypothalamus and olfactory bulb of micedevoid of all known thyroid hormone receptors. *Neuroscience*, 2000; 101: 1001-1012.
- Campos-Barros A, Amma LL, Faris JS, Shailam R, Kelley MW, Forrest D. Type 2 iodothyronine deiodinase expression in the cochlea before the onset of hearing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97: 1287-1292.
- Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res*, 2007; 17: 839-849.
- Carlén M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisén J. Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol*, 2002; 12: 606-608.
- Carleton A, Rochefort C, Morante-Oria J, Desmaisons D, Vincent JD, Gheusi G, Lledo PM. Making scents of olfactory neurogenesis. *J Physiol Paris*, 2002; 96: 115-122.

- Carling D, Thornton C, Woods A, Sanders MJ. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? *Biochem J*, 2012; 445: 11-27.
- Carr VM, Farbman AI, Colletti LM, Morgan JL. Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium. *Neuroscience*, 1991; 45: 433-449.
- Carr VM, Farbman AI. The dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp. Neurol*, 1993; 124: 308-314.
- Cavarretta F, Burton SD, Igarashi KM, Shepherd GM, Hines ML, Migliore M. Parallel odor processing by mitral and middle tufted cells in the olfactory bulb. *Sci Rep*, 2018; 8: 7625.
- Cayre M, Canoll P, Goldman JE. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 2009; 88: 41-63.
- Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *Lancet*, 2017; 390: 1550-1562.
- Chamero P, Marton TF, Logan DW, Flanagan K, Cruz JR, Saghatelian A, Cravatt BF, Stowers L. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*, 2007; 450: 899-902.
- Chamero P, Katsoulidou V, Hendrix P, Bufe B, Roberts R, Matsunami H, Abramowitz J, Birnbaumer L, Zufall F, Leinders-Zufall T. G protein G(alpha)o is essential for vomeronasal function and aggressive behavior in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108: 12898-12903.
- Chamero P, Leinders-Zufall T, Zufall F. From genestosomal communication: molecular sensing by the vomeronasal organ. *Trends Neurosci*, 2012; 35: 597-606.
- Cha-Molstad H, Yu JE, Feng Z, Lee SH, Kim JG, Yang P, Han B, Sung KW, Yoo YD, Hwang J, McGuire T, Shim SM, Song HD, Ganipiseti S, Wang N, Jang JM, Lee MJ, Kim SJ, Lee KH, Hong JT, Ciechanover A, Mook-Jung I, Kim KP, Xie XQ, Kwon YT, Kim BY. p62/SQSTM1/Sequestosome-1 Is an N-recognin of the N-end rule pathway which modulates autophagosome biogenesis. *Nat Commun*, 2017; 8: 102.
- Chan EY, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem*, 2007; 282: 25464-25474.
- Chao TL, Kasa P, Wolff JR. Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *J Comp Neurol*, 1997; 388: 191-210.
- Chen C, Zhou Z, Zhong M, Zhang Y, Li M, Zhang L, Qu M, Yang J, Wang Y, Yu Z. Thyroid hormone promotes neuronal differentiation of embryonic neural stem cells by inhibiting STAT3 signaling through TRalpha1. *Stem Cells Dev*, 2012; 21: 2667-2681.
- Chen CA, Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene*, 2001; 20: 1643-1652.
- Chen H, Cheng Y, Du H, Zhang C, Zhou Y, Zhao Z, Li Y, Friedemann T, Mei J, Schröder S, Chen M. Shufeng Jiedu capsule ameliorates olfactory dysfunction

- via the AMPK/mTOR autophagy pathway in a mouse model of allergic rhinitis. *Phytomedicine*, 2022; 107: 154426.
- Chen J, Guo R, Yan H, Tian L, You Q, Li S, Wu K. Naringin inhibits ROS-activated MAPK pathway in high glucose-induced injuries in H9c2 cardiac cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014;114: 293-304.
- Chen X, Fang H, Schwob JE. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol*, 2004; 469: 457-474.
- Chen WR, Shepherd GM. The olfactory glomerulus: a cortical module with specific functions. *J Neurocytol*, 2005; 34: 353-360.
- Chen Y, Yu C, Qian X, Gao X. Research progress in the treatment of sensori neural olfactory dysfunction. *Lin Chuang Er Bi Yan HouTouJingWai Ke ZaZhi*, 2021; 35: 365-370.
- Cheng SW, Fryer LG, Carling D, Shepherd PR. Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem*, 2004; 279: 15719-15722.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*, 2010; 31: 139-170.
- Cheng XT, Zhou B, Lin MY, Cai Q, Sheng ZH. Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes. *J Cell Biol*, 2015; 209: 377-386.
- Cheong H, Lindsten T, Wu J, Lu C, Thompson CB. Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108: 11121-11126.
- Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW, Chu CT. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol*, 2010; 190: 533-539.
- Chester J, Rotenstein D, Ringkananont U, Steuer G, Carlin B, Stewart L, Grasberger H, Refetoff S. Congenital neonatal hyperthyroidism caused by germline mutations in the TSH receptor gene. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2008; 21: 479-486.
- Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*, 2000; 346: 659-669.
- Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem*, 2005; 280: 25485-25490.
- Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*, 1989; 20; 246: 382-385.
- Choi JS, Park C, Jeong JW. AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 391: 147-151.

- Christian F, Krause E, Houslay MD, Baillie GS. PKA Phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates PB1 domain interaction partner binding. *Biochim. Biophys. Acta (Bba) - Mol Cel Res*, 2014; 1843: 2765-2774.
- Christoffolete MA, Ribeiro R, Singru P, Fekete C, da Silva WS, Gordon DF, Huang SA, Crescenzi A, Harney JW, Ridgway EC, Larsen PR, Lechan RM, Bianco AC. A typical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotroph sex plains the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism. *Endocrinology*, 2006; 147: 1735-1743.
- Chu CT, Zhu J, Dagda R. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy*, 2007; 3: 663-666.
- Chun Y, Kim J. Autophagy: An essential degradation program for cellular homeostasis and life. *Cells*, 2018; 7: 278.
- Chung H, Choi J, Park S. Ghrelin protects adult rat hippocampal neural stem cells from excessive autophagy during oxygen-glucose deprivation. *Endocr J*, 2018; 65: 63-73.
- Ciuffa R, Lamark T, Tarafder AK, Guesdon A, Rybina S, Hagen WJH, Johansen T, Sachse C. The selective autophagy receptor P62 forms a flexible filamentous helical scaffold. *Cel Rep*, 2015; 11: 748-758.
- Cohen-Kaplan V, Ciechanover A, Livneh I. Stress-induced polyubiquitination of proteasomal ubiquitin receptors targets the proteolytic complex for autophagic degradation. *Autophagy*, 2017; 13: 759-760.
- Cohen S, Valm AM, Lippincott-Schwartz J. Interacting organelles. *Curr Opin Cell Biol*, 2018; 53: 84-91.
- Colecchia D, Strambi A, Sanzone S, Iavarone C, Rossi M, Dall'Armi C, Piccioni F, di Pianella AV, Chiariello M. MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy*, 2012; 8: 1724-1740.
- Connelly T, Savigner A, Ma M. Spontaneous and sensory-evoked activity in mouse olfactory sensory neurons with defined odorant receptors. *J Neurophysiol*, 2013; 110: 55-62.
- Conti MZ, Vicini-Chilovi B, Riva M, Zanetti M, Liberini P, Padovani A, Rozzini L. Odor identification deficit predicts clinical conversion from mild cognitive impairment to dementia due to Alzheimer's disease. *Arch Clin Neuropsychol*, 2013; 28: 391-399.
- Copp J, Manning G, Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res*, 2009; 69: 1821-1827.
- Coppola DM. Studies of olfactory system neural plasticity: the contribution of the unilateral naris occlusion technique. *Neural Plast*, 2012; 2012: 351752.
- Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol*, 1994; 4: 315-324.

- Costello JL, Castro IG, Hacker C, Schrader TA, Metz J, Zeuschner D, Azadi AS, Godinho LF, Costina V, Findeisen P, Manner A, Islinger M, Schrader M. ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *J Cell Biol*, 2017; 216: 331-342.
- Courtjol E, Wilson DA. The olfactory thalamus: unanswered questions about the role of the mediodorsal thalamic nucleus in olfaction. *Front Neural Circuits*. 2015; 9: 49.
- Cox SE, Pearce B, Munday MR AMP-activated protein kinase in astrocytes. *Biochem, Soc Trans*, 1997; 25: S583.
- Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Blasco-Ibanez JM, Gutierrez-Mecinas M, Marques-Mari AI, Martinez-Guijarro FJ. Nitric oxide synthase containing periglomerular cells are GABAergic in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett*, 2003; 349: 151-154.
- Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. Thetuberous sclerosis complex. *N Engl J Med*, 2006; 355: 1345-1356.
- Cuervo AM, Knecht E, Terlecky SR, Dice JF. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol*, 1995; 269: C1200-C1208.
- Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 1996; 273: 501-503.
- Cuervo AM, Hildebrand H, Bomhard EM, Dice JF. Direct lysosomal uptake of α 2-microglobulin contributes to chemically induced nephropathy. *Kidney Int*, 1999; 55: 529-545.
- Cuervo AM. Autophagy: In sickness and in health. *Trends Cell Biol*, 2004; 14: 70-77.
- Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res*, 2014; 24: 92-104.
- Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci*, 2001; 17: 45-58.
- Cunningham AM, Manis PB, Reed RR, Ronnett GV. Olfactory receptor neuron sexist as distinct subclasses of immature and mature cells in primary culture. *Neuroscience*, 1999; 93: 1301-1312.
- Curcio-Morelli C, Gereben B, Zavacki AM, Kim BW, Huang S, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Invivo dimerization of types 1, 2 and 3 iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrinology*, 2003; 144: 937-946.
- Dalle Pezze P, Ruf S, Sonntag AG, Langelaar-Makkinje M, Hall P, Heberle AM, Razquin Navas P, van Eunen K, Tölle RC, Schwarz JJ, Wiese H, Warscheid B, Deitersen J, Stork B, Fäßler E, Schäuble S, Hahn U, Horvatovich P, Shanley DP, Thedieck K. A systems study reveals concurrent activation of AMPK and mTOR by amino acids. *Nat Commun*, 2016; 7: 13254.
- Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104: 7217-7222.

- Dasgupta B, Milbrandt J. AMP-Activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development. *Dev Cell*, 2009; 16: 256-270.
- Davis PJ, Mousa SA, Lin HY. Nongenomic actions of thyroid hormone: The integrin component. *Physiol Rev*, 2021; 101: 319-352.
- De Almeida R, McCalmon S, Cabandugama PK. Clinical review and update on the management of thyroid storm. *Mo Med*, 2022; 119: 366-371.
- De Castro F. Wiring olfaction: The cellular and molecular mechanisms that guide the development of synaptic connections from the olfactory bulb to the cortex. *Front Neurosci*, 2009; 3: 52.
- De Escobar GM, Obregon MJ, del Rey FE. Iodine deficiency and brain development in the first half of pregnancy. *Public Health Nutr*, 2007; 10: 1554-1570.
- De Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest*, 2001; 108: 1379-1385.
- De Matteis MA, Rega LR. Endoplasmic reticulum-Golgi complex membrane contact sites. *Curr Opin Cell Biol*, 2015; 35: 43-50.
- De Mello NP, Orellana AM, Mazucanti CH, de Moraes Lima G, Scavone C, Kawamoto EM. Insulin and Autophagy in Neurodegeneration. *Front Neurosci*, 2019; 13: 491.
- Débat H, Eloit C, Blon F, Sarazin B, Henry C, Huet JC, Trotier D, Pernollet JC. Identification of human olfactory cleft mucus proteins using proteomic analysis. *J Proteome Res*, 2007; 6: 1985-1996.
- Delay RJ, Dionne VE. Coupling between sensory neurons in the olfactory epithelium. *Chem Senses*, 2003; 28: 807-815.
- Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR-autophagy axis and the control of metabolism. *Front Cell Dev Biol*, 2021; 9: 655-731.
- Dellovade TL, Chan J, Vennstrom B, Forrest D, Pfaff DW. The two thyroid hormone receptor genes have opposite effects on estrogen-stimulated sex behaviors. *Nat Neurosci*, 2000; 3: 472-475.
- Delorme B, Nivet E, Gaillard J, Häupl T, Ringe J, Devèze A, Magnan J, Sohier J, Khrestchatsky M, Roman FS, Charbord P, Sensebé L, Layrolle P, Féron F. The human olfactory bulb harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev*, 2010; 19: 853-866.
- Demarquay G, Ryvlin P, Royet JP. Olfaction et pathologies neurologiques: revue de la littérature (Olfaction and neurological diseases: a review of the literature). *Rev Neurol (Paris)*, 2007; 163: 155-167.
- Demetriades C, Plescher M, Teleman AA. Lysosomal recruitment of TSC2 is a universal response to cellular stress. *Nat Commun*, 2016; 7: 10662.
- Deniz F, Ay SA, Salihoglu M, Kurt O, Baskoy K, Altundag A, Tekeli H, Yonem A, Hummel T. Thyroid hormone replacement therapy improves olfaction and taste

- sensitivity in primary hypothyroid patients: A Prospective randomised clinical trial. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016; 124: 562-567.
- Dentice M, Salvatore D. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *J Endocrinol*, 2011; 209: 273-282.
- Denver RJ, Hu F, Scanlan TS, Furlow JD. Thyroid hormone receptor subtype specificity for hormone-dependent neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 2009; 326: 155-168.
- Desouza LA, Ladiwala U, Daniel SM, Agashe S, Vaidya RA, Vaidya VA. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neuro Sci*, 2005; 29: 414-426.
- Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 1995; 48: 876-878.
- Devanand DP, Michaels-Marston KS, Liu X, Pelton GH, Padilla M, Marder K, Bell K, Stern Y, Mayeux R. Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up. *Am J Psychiatry*, 2000; 157: 1399-1405.
- Dhaliwal J, Trinkle-Mulcahy L, Lagace DC. Autophagy and adult neurogenesis: discoveries made half a century ago yet in their infancy of being connected. *Brain Plast*, 2017; 3: 99-110.
- Dhong HJ, Kim HY, Ha BS. Histologic changes to olfactory epithelium in hypothyroid rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003; 129: 24-32.
- Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L, D'Amelio M, Nardacci R, Romagnoli A, Piacentini M, Cecconi F, Fimia GM. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol*, 2010; 191: 155-168.
- Di Nardo A, Wertz MH, Kwiatkowski E, Tsai PT, Leech JD, Greene-Colozzi E, Goto J, Dilsiz P, Talos DM, Clish CB, Kwiatkowski DJ, Sahin M. Neuronal Tsc1/2 complex controls autophagy through AMPK-dependent regulation of ULK1. *Hum Mol Genet*, 2014; 23: 3865-3874.
- Diana T, Olivo PD, Kahaly GJ. Thyrotropin receptor blocking antibodies. *Horm Metab Res*, 2018; 50: 853-862.
- Didier S, Sauvé F, Domise M, Buée L, Marinangeli C, Vingtdeux V. AMP-activated Protein Kinase Controls Immediate Early Genes Expression Following Synaptic Activation Through the PKA/CREB Pathway. *Int J Mol Sci*, 2018; 19: 3716.
- Dietzel ID, Mohanasundaram S, Niederkinkhaus V, Hoffmann G, Meyer JW, Reiners C, Blasl C, Bohr K. Thyroid hormone effects on sensory perception, mental speed, neuronal excitability and ion channel regulation, In: Agrawal NK (ed), *Thyroid Hormone*. IntechOpen 2012; p.: 85-122.
- Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018; 19: 349-364.

- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 1999; 97: 703-716.
- Dooley HC, Razi M, Polson HE, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell*, 2014; 55: 238-252.
- Doty RL, Bromley SM, Stern MB. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease. development of optimal discrimination criteria. *Neurodegeneration*, 1995; 4: 93-97.
- Doty RL. The olfactory system and its disorders. *Semin Neurol*, 2009; 29:74-81.
- Doty RL. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis*, 2012; 46: 527-552.
- Doty RL, Kamath V. The influences of age on olfaction: A review. *Front Psychol*, 2014; 5: 20.
- Doty RL, Tourbier I, Ng V, Neff J, Armstrong D, Battistini M, Sammel MD, Gettes D, Evans DL, Mirza N, Moberg PJ, Connolly T, Sondheimer SJ. Influences of hormone replacement therapy on olfactory and cognitive function in postmenopausal women. *Neurobiol Aging*, 2015; 36: 2053-2059.
- Doubleday AR, Sippel RS. Hyperthyroidism. *Gland Surg*, 2020; 9: 124-135.
- Dowling AL, Martz GU, Leonard JL, Zoeller RT. Acute changes in maternal thyroid hormone induce rapid and transient changes in gene expression in fetal rat brain. *J Neurosci*, 2000; 20: 2255-2265.
- Dozin B, De Nayer P. Triiodothyronine receptors in adult rat brain: topographical distribution and effect of hypothyroidism. *Neuroendocrinology*, 1984; 39: 261-266.
- Duca FA, Cote CD, Rasmussen BA, Zadeh-Tahmasebi M, Rutter GA, Filippi BM, Lam TKT. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat Med*, 2015; 21: 506-511.
- Dugbartey AT. Neurocognitive aspects of hypothyroidism. *Arch Intern Med*, 1998; 158: 1413-1418.
- Duggan CD, Ngai J. Scent of a stem cell. *Nat Neurosci*, 2007; 10: 673-674.
- Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal*, 2009; 21: 827-35.
- Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, Hansen M, Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 Is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell*, 2011; 44: 134-146.
- Ebrahimi FA, Chess A. Olfactory G proteins: simple and complex signal transduction. *Curr Biol*, 1998; 8: R431-R433.
- Efeyan A, Zoncu R, Chang S, Gumper I, Snitkin H, Wolfson RL, Kirak O, Sabatini DD, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature*, 2013; 493: 679-683.

- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino SR, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 2011; 331: 456-461.
- Egan DF, Chun MG, Vamos M, Zou H, Rong J, Miller CJ, Lou HJ, Raveendra-Panickar D, Yang CC, Sheffler DJ, Teriete P, Asara JM, Turk BE, Cosford ND, Shaw RJ. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates. *Mol Cell*, 2015; 59: 285-297.
- Eggo MC, Quiney VM, Campbell S. Local factors regulating growth and function of human thyroid cells in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol*, 2003; 213: 47-58.
- Ehninger D, de Vries PJ, Silva AJ. From mTOR to cognition: molecular and cellular mechanisms of cognitive impairments in tuberous sclerosis. *J Intellect Disabil Res*, 2009; 53: 838-851.
- Elkalawy S, Abo-Elnour R, El DD, Yousry M. Histological and immunohistochemical study of the effect of experimentally induced hypothyroidism on the thyroid gland and bone of male albino rats. *Egypt J Histol*, 2013; 36: 92-102.
- Elsaesser R, Paysan J. The sense of smell, its signalling pathways and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC Neurosci*, 2007; 8: S1.
- Engedal N, Seglen PO. Autophagy of cytoplasmic bulk cargo does not require LC3. *Autophagy*, 2016; 12: 439-441.
- Ennis M, Hamilton KA, Hayar A. Neurochemistry of the main olfactory system. In: Laitha A, Johnson DA (eds), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (3rd ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2007; p.: 139-182.
- Ennis M, Hayar A. Physiology of the main olfactory bulb. In Firestein S, Beauchamp GK (eds), *The Senses: A Comprehensive Reference*. Academic Press, San Diego, CA 2008; p.: 641-686.
- Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signalling, diminished olfactory neurogenesis and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci*, 2004; 24, 8354-8365.
- Escada PA, Lima C, Madeira da Silva J. The human olfactory mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009; 266: 1675-1680.
- Eskelinen EL. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy*, 2008; 4: 257-260.
- Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 1988; 240: 889-895.
- Eyre MD, Antal M, Nusser Z. Distinct deep short-axon cell subtypes of the main olfactory bulb provide novel intra bulbar and extra bulbar GABAergic connections. *J Neurosci*, 2008; 28: 8217-8229.

- Fairbrother F, Petzl N, Scott JG, Kisely S. Lithium can cause hyperthyroidism as well as hypothyroidism: A systematic review of an under-recognised association. *Aust N Z J Psychiatry*, 2019; 53: 384-402.
- Fan W, Nassiri A, Zhong Q. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108: 7769-7774.
- Farbman AI, Margolis FL. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol*, 1980;74: 205-215.
- Farbman AI. Developmental biology of olfactory sensory neurons. *Semin Cell Biol*, 1994; 5: 3-10.
- Farebrother J, Zimmermann MB, Andersson M. Excess iodine intake: sources, assessment, and effects on thyroid function. *Ann N Y Acad Sci*, 2019; 1446: 44-65.
- Farid NR, Szkudlinski MW. Minireview: Structural and functional evolution of the thyrotropin receptor. *Endocrinology*, 2004; 145: 4048-4057.
- Farré JC, Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol*, 2004; 14: 515-523.
- Farré JC, Krick R, Subramani S, Thumm M. Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, 2009; 21: 522-530.
- Fath-Elbab MR, Abou-Elhamd AS. Histology Part II. The Respiratory System. 2016; p.: 16. Erişim: [https://www.researchgate.net/publication/280803281_Histology_II], Erişim Tarihi: 9 Mayıs 2023.
- Feely J, Peden N. Use of beta-adrenoceptor blocking drugs in hyperthyroidism. *Drugs*, 1984; 27: 425-446.
- Feliciano DM, Quon JL, Su T, Taylor MM, Bordey A. Postnatal neurogenesis generates heterotopias, olfactory micronodules and cortical infiltration following single-cell Tsc1 deletion. *Hum Mol Genet*, 2012; 21: 799-810.
- Feliciano DM, Zhang S, Quon JL, Bordey A. Hypoxia-inducible factor 1a is a Tsc1-regulated survival factor in newborn neurons in tuberous sclerosis complex. *Hum Mol Genet*. 2013; 22: 1725-1734.
- Felsenfeld AJ, Levine BS. Calcitonin, the forgotten hormone: does it deserve to be forgotten? *Clinical Kidney Journal*, 2015; 8: 180-187.
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 2014; 24: 24-41.
- Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol*, 2015; 25: 354-363.
- Fernandez M, Pirondi S, Manservigi M, Giardino L, Calzà L. Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. *Eur J Neurosci*, 2004; 20: 2059-2070.

- Ferreira E, Silva AE, Serakides R, Gomes AES, Cassali GD. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2007; 59: 1245-1249.
- Féron F, Perry C, McGrath JJ, Mackay-Sim A. New techniques for biopsy and culture of human olfactory epithelial neurons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998; 124: 861-866.
- Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, Cecconi F. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 2007; 447: 1121-1125.
- Fleischer J, Hass N, Schwarzenbacher K, Besser S, Breer H. A novel population of neuronal cells expressing the olfactory marker protein (OMP) in the anterior/dorsal region of the nasal cavity. *Histochem Cell Biol*, 2006a; 125: 337-349.
- Fleischer J, Schwarzenbacher K, Besser S, Hass N, Breer H. Olfactory receptors and signalling elements in the Grueneberg ganglion. *J Neurochem*, 2006b; 98: 543-554.
- Fleischer J, Schwarzenbacher K, Breer H. Expression of trace amine-associated receptors in the Grueneberg ganglion. *Chem. Senses*, 2007; 32: 623-631.
- Fleischer J, Mamasuew, K, Breer H. Expression of cGMP signaling elements in the Grueneberg ganglion. *Histochem Cell Biol*, 2009; 131: 75-88.
- Fleming A, Rubinsztein DC. Autophagy in Neuronal Development and Plasticity. *Trends Neurosci*, 2020; 43: 767-779.
- Fleming A, Bourdenx M, Fujimaki M, Karabiyik C, Krause GJ, Lopez A, Martín-Segura A, Puri C, Scrivo A, Skidmore J, Son SM, Stamatakou E, Wrobel L, Zhu Y, Cuervo AM, Rubinsztein DC. The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration. *Neuron*, 2022; 110: 935-966.
- Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM, Curran T. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *EMBO J*, 1996; 15: 3006-3015.
- Fox CS, Pencina MJ, D'Agostino RB, Murabito JM, Seely EW, Pearce EN, Vasan RS. Relations of thyroid function to body weight: cross-sectional and longitudinal observations in a community-based sample. *Arch Intern Med*, 2008; 168: 587-592.
- Francia S, Lodovichi C. The role of the odorant receptors in the formation of the sensory map. *BMC Biol*, 2021; 19: 174.
- Frasnelli J, Hummel T. Olfactory dysfunction and daily life. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2005; 262: 231-235.
- Frazier LL, Brunjes PC. Unilateral odor deprivation: early postnatal changes in olfactory bulb cell density and number. *J Comp Neurol*, 1988; 269: 355-370.

- Freitas BC, Gereben B, Castillo M, Kalló I, Zeöld A, Egri P, Liposits Z, Zavacki AM, Maciel RM, Jo S, Singru P, Sanchez E, Lechan RM, Bianco AC. Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. *J Clin Invest*, 2010; 120: 2206-2217.
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 2011; 334: 353-362.
- Fu AL, Zhou CY, Chen X. Thyroid hormone prevents cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 2010; 58: 722-729.
- Fu AL, Zhou R, Xu X. The synthetic thyroid hormone, levothyroxine, protects cholinergic neurons in the hippocampus of naturally aged mice. *Neural Regen Res*, 2014; 9, 864-871.
- Fujita N, Hayashi-Nishino M, Fukumoto H, Omori H, Yamamoto A, Noda T, Yoshimori T. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol Biol Cell*, 2008; 19: 4651-4659.
- Fundaro A. Behavioral modifications in relation to hypothyroidism and hyperthyroidism in adult rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1989; 13: 927-940.
- Fuss SH, Omura M, Mombaerts P. The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 2005; 22: 2649-2654.
- Gall C, Seroogy KB, Brecha N. Distribution of VIP- and NPY-like immunoreactivities in rat main olfactory bulb. *Brain Res*, 1986; 374: 389-394.
- Gall CM, Hendry SH, Seroogy KB, Jones EG, Haycock JW. Evidence for coexistence of GABA and dopamine in neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 1987; 266: 307-318.
- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*, 2009; 284: 12297-12305.
- Gao C, Cao W, Bao L, Zuo W, Xie G, Cai T, Fu W, Zhang J, Wu W, Zhang X, Chen YG. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol*, 2010; 12: 781-790.
- Gao G, Widmer J, Stapleton D, Teh T, Cox T, Kemp BE, Witters LA. Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase remember members of the SNF1 protein kinase family. *Biochim Biophys Acta*, 1995; 1266: 73-82.
- Gao G, Fernandez CS, Stapleton D, Auster AS, Widmer J, Dyck JR, Kemp BE, Witters LA. Non-catalytic beta and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1996; 271: 8675-8681.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 2004; 7: 1233-1241.

- Ge L, Melville D, Zhang M, Schekman R. The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife*, 2013; 2: e00947.
- Genovese F, Tizzano M. Microvillous cells in the olfactory epithelium express elements of the solitary chemosensory cell transduction signaling cascade. *PLoSOne*, 2018; 13: e0202754.
- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*, 2008a; 29: 898-938.
- Gereben B, Zeöld A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci*, 2008b; 65: 570-590.
- Getchell TV, Margolis FL, Getchell ML. Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog Neurobiol*, 1984; 23:317-345.
- Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97: 1823-1828.
- Gkonos PJ, Tavianini MA, Liu CC, Roos BA. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in normal thyroid parafollicular cells. *Mol Endocrinol*, 1989; 3: 2101-2109.
- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 2010; 221: 3-12.
- Gothé S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennström B, Forrest D. Mice devoid of all known thyroid hormone receptor sareviable but exhibit disorders of the pituitary-thyroidaxis, growth and bone maturation. *Genes Dev*, 1999; 13: 1329-1341.
- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96, 5263-5267.
- Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005; 6: 777-788.
- Graves AB, Bowen JD, Rajaram L, McCormick WC, McCurry SM, Schellenberg GD, Larson EB. Impaired olfaction as a marker for cognitive decline: interaction with apolipoprotein E epsilon4 status. *Neurology*, 1999; 53: 1480-1487.
- Grunwald DS, Otto NM, Park JM, Song D, Kim DH. GABARAPs and LC3s have opposite roles in regulating ULK1 for autophagy induction. *Autophagy*, 2020; 16: 600-614.
- Grüneberg H. A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 1973; 140: 39-52.
- Gu X, Karp PH, Brody SL, Pierce RA, Welsh MJ, Holtzman MJ, Ben-Shahar Y. Chemo sensory functions for pulmonary neuro endocrine cells. *Am J Res Cell Mol Biol*, 2014; 50: 637-646.

- Guadano-Ferraz A, Benavides-Piccione R, Venero C, Lancha C, Vennstrom B, Sandi C, DeFelipe J, Bernal J. Lack of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry*, 2003; 8: 30-38.
- Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal*, 2009; 2: pe24.
- Gutierrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibanez JM, Gracia-Llanes FJ, Marqués-Mari AI, Martínez-Guijarro FJ. Characterization of somatostatin and cholecystokinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 2005; 489: 467-479.
- Günbey E, Karlı R, Gökosmanoğlu F, Düzgün B, Ayhan E, Atmaca H, Ünal R. Evaluation of olfactory function in adults with primary hypothyroidism. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2015; 5: 919-22.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk, BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic check point. *Mol Cell*, 2008; 30: 214-226.
- Ha S, Ryu HY, Chung KM, Baek SH, Kim EK, Yu SW. Regulation of autophagic cell death by glycogen synthase kinase-3 β in adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal. *Mol Brain*, 2015; 8: 30.
- Ha S, Jeong SH, Yi K, Chung KM, Hong CJ, Kim SW, Kim EK, Yu SW. Phosphorylation of p62 by AMP-activated protein kinase mediates autophagic cell death in adult hippocampal neural stem cells. *J Biol Chem*, 2017; 292: 13795-13808.
- Häggström M. Medical gallery of Mikael Häggström 2014. *Wikiversity Journal of Medicine*, 2014; 1: 2.
- Hahn CG, Han LY, Rawson NE, Mirza N, Borgmann-Winter K, Lenox RH, Arnold SE. In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *J Comp Neurol*, 2005; 483: 154-163.
- Halpern M, Martínez-Marcos A. Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog in Neurobiol*, 2003; 70: 245-318.
- Hammes SR, Davis PJ. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015; 29: 581-593.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano HJN. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 2006; 441: 885-889.
- Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*, 2001; 23: 1112-1119.
- Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8: 774-785.

- Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 2011; 25: 1895-908.
- Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends Cell Biol*, 2016; 26: 190-201.
- Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 2011; 8: 108-117.
- Harris JJ, Attwell D. The energetics of CNS white matter. *J Neurosci*, 2012; 32:356-371.
- Hasin-Brumshtein Y, Lancet D, Olender T. Human olfaction: from genomic variation to phenotypic diversity. *Trends Genet*, 2009; 25: 178-184.
- Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine-172 as the major site at which it phosphorylates and activates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1996; 271: 2787-27887.
- Hayar A, Karnup S, Ennis M, Shipley MT. External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. *J Neurosci*, 2004a; 24: 6676-6685.
- Hayar A, Karnup S, Shipley MT, Ennis M. Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at the theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. *J Neurosci*, 2004b; 24: 1190-1199.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Ann Rev Genet*, 2009; 43: 67-93.
- He C, Levine B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol*, 2010; 22: 140-149.
- He CT, Hsieh AT, Pei D, Hung YJ, Wu LY, Yang TC, Lian WC, Huang WS, Kuo SW. Comparison of single daily dose of methimazole and propylthiouracil in the treatment of Graves' hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004; 60: 676-681.
- He G, Zhang YW, Lee JH, Zeng SX, Wang YV, Luo Z, Dong XC, Viollet B, Wahl GM, Lu H. AMP-activated protein kinase induces p53 by phosphorylating MDMX and inhibiting its activity. *Mol Cell Biol*, 2014; 34: 148-157.
- He L, Zhang J, Zhao J, Ma N, Kim SW, Qiao S, Ma X. Autophagy: the last defense against cellular nutritional stress. *Adv Nutr*, 2018; 9: 493-504.
- Hegg CC, Irwin M, Lucero M T. Calcium store-mediated signaling in sustentacular cells of the Mouse olfactory epithelium. *Glia*, 2009; 57: 634-644.
- Heinbockel T, Hamilton KA and Ennis M. Group I metabotropic glutamate receptors are differentially expressed by two populations of olfactory bulb granule cells. *J Neurophysiol*, 2007; 97: 3136-3141.
- Hennig P, Fenini G, Di Filippo M, Karakaya T, Beer HD. The pathways underlying the multiple roles of p62 in inflammation and cancer. *Biomedicines*, 2021; 9:707.

- Hernandez A, Fiering S, Martinez E, Galton VA, St Germain D. The gene locus encoding iodothyronine deiodinase type 3 (Dio3) is imprinted in the fetus and expresses antisense transcripts. *Endocrinology*, 2002; 143: 4483-4486.
- Hirata T, Shioi G, Abe T, Kiyonari H, Kato S, Kobayashi K, Mori K, Kawasaki T. A novel birthdate-labeling method reveals segregated parallel projections of mitral and external tufted cells in the main olfactory system. *eNeuro*, 2019; 6: ENEURO.0234-19.2019.
- Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*, 1989; 244: 76-79.
- Hollenbeck PJ. Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J Cell Biol*, 1993; 121: 305-315.
- Holz MK, Blenis J. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem*, 2005; 280: 26089-26093.
- Horn S, Heuer H. Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 315: 19-26.
- Hornix BE, Havekes R, Kas MJH. Multisensory cortical processing and dysfunction across the neuropsychiatric spectrum. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019; 97: 138-151.
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy*, 2009a; 5: 973-979.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 2009b; 20: 1981-1991.
- Howdeshell KL. A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environ Health Perspect*, 2002; 110: 337-348.
- Hoyk Z, Szilágyi T, Halász N. Modulation by thyroid hormones of the development of external plexiform layer in the rat olfactory bulb. *Neurobiology*, 1996; 4: 45-57.
- Hu Z, Yang B, Mo X, Xiao H. Mechanism and regulation of autophagy and its role in neuronal diseases. *Mol Neurobiol*, 2015; 52: 1190-1209.
- Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*, 2008; 412: 179-190.
- Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, Liu B, Chang C, Zhou T, Lippincott-Schwartz J, Liu W. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell*, 2015; 57: 456-466.
- Huang SA, Dorfman DM, Genest DR, Salvatore D, Larsen PR. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human utero placental unit and in fetal epithelium. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88: 1384-1388.

- Huang SA. Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans. *Thyroid*, 2005; 15: 875-881.
- Huang TS, Chopra IJ, Beredo A, Solomon DH, ChuaTeco GN. Skin is an active site for the inner ring monodeiodination of thyroxine to 3,3',5'-triiodothyronine. *Endocrinology*, 1985; 117: 2106-2113.
- Huang W, Choi W, Hu W, Mi N, Guo Q, Ma M, Liu M, Tian Y, Lu P, Wang FL, Deng H, Liu L, Gao N, Yu L, Shi Y. Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein. *Cell Res*, 2012; 22: 473-489.
- Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, Luskin MB, Schwob JE. Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol*, 1998; 400: 469-486.
- Hubbs AF, Fluharty KL, Edwards RJ, Barnabei JL, Grantham JT, Palmer SM, Kelly F, Sargent LM, Reynolds SH, Mercer RR, Goravanahally MP, Kashon ML, Honaker JC, Jackson MC, Cumpston AM, Goldsmith WT, McKinney W, Fedan JS, Battelli LA, Munro T, Bucklew-Moyers W, McKinstry K, Schwegler-Berry D, Friend S, Knepp AK, Smith SL, Sriram K. Accumulation of Ubiquitin and Sequestosome-1 Implicate Protein Damage in Diacetyl-Induced Cytotoxicity. *Am J Pathol*, 2016; 186: 2887-2908.
- Hugill K. The senses of touch and olfaction in early mother-infant interaction. *Br J Midwifery*, 2015; 23: 238-243.
- Ibhazehiebo K, Koibuchi N. Temporal effects of thyroid hormone (TH) and decabrominated diphenyl ether (BDE209) on Purkinje cell dendrite arborization. *Niger J Physiol Sci*, 2012; 27: 11-17.
- Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, Kominami E, Yamane T, Tanaka K, Komatsu M. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem*, 2008; 283: 22847-22857.
- Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell*, 2013; 51: 618-631.
- Idrees T, Palmer S, Maciel RMB, Bianco AC. Liothyronine and desiccated thyroid extract in the treatment of hypothyroidism. *Thyroid*, 2020; 30: 1399-1413.
- Igarashi KM, Ieki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Tanifuji M, Sakano H, Chen WR, Mori K. Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *J Neurosci*, 2012; 32: 7970-7985.
- Ihara S, Yoshikawa K, Touhara K. Chemo sensory signals and their receptors in the olfactory neural system. *Neuroscience*, 2013; 254, 45-60
- Imai T, Sakano H. Odorant receptor-mediated signaling in the mouse. *Curr Opin Neurobiol*, 2008; 18: 251-260.
- Imai T. Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014; 180-188.

- Imamura F, Nagao H, Naritsuka H, Murata Y, Taniguchi H and Mori K. A leucine-rich repeat membrane protein, 5T4, is expressed by a subtype of granule cells with dendritic arbors in specific strata of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 2006; 495: 754-768.
- Imamura F, Greer CA. Segregated labeling of olfactory bulb projection neurons based on their birthdates. *Eur J Neurosci*, 2015; 41: 147-156.
- Imamura F, Ito A, LaFever BJ. Subpopulations of projection neurons in the olfactory bulb. *Front Neural Circuits*, 2020; 14: 561822.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci*, 2008; 11: 1153-1161.
- Inaguma Y, Matsumoto A, Noda M, Tabata H, Maeda A, Goto M, Usui D, Jimbo EF, Kikkawa K, Ohtsuki M, Momoi MY, Osaka H, Yamagata T, Nagata KI. Role of Class III phosphoinositide 3-kinase in the brain development: possible involvement in specific learning disorders. *J Neurochem*, 2016; 139: 245-255.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 2002; 4: 648-657.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 2003; 115: 577-590.
- Inoki K, Guan KL. Tuberous sclerosis complex, implication from a rare genetic disease to common cancer treatment. *Hum Mol Genet*, 2009; 18(R1): R94-R100.
- Irimescu I, Bolfa P, Crişan M, Dezdrobitu C, Damian A. Gross and microscopic anatomy of the olfactory bulbs in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca*, 2015; 72: 357-362.
- Isogai S, Morimoto D, Arita K, Unzai S, Tenno T, Hasegawa J. Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of P62 and its interaction with ubiquitin. *J Biol Chem*, 2011; 286: 31864-31874.
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*, 2008; 19: 5360-5372.
- Itakura E, Mizushima N. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol*, 2011; 192:17-27.
- Iwen KA, Schroder E, Brabant G. Thyroid hormone and the metabolic syndrome. *Eur Thyroid J*, 2013; 2: 83-92.
- Jackson EL, Alvarez-Buylla A. Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. *Cells Tissues Organs*, 2008; 188: 212-224.
- Jahagirdar VR, Strouhal P, Holder G, Gama R, Singh BM. Thyrotoxicosis factitia masquerading as recurrent Graves' disease: Endogenous antibody immunoassay interference, a pitfall for the unwary. *Ann Clin Biochem*, 2008; 45: 325-327.

- Jang W, Youngentob SL, Schwob JE. Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methylbromidelesion. *J Comp Neurol*, 2003; 460: 123-140.
- Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci*, 2005; 25: 11300-11312.
- Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013; 14: 133-139.
- Jia J, Le W. Molecular network of neuronal autophagy in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurosci. Bull*, 2015; 31: 427-434.
- Joachim J, Jefferies HB, Razi M, Frith D, Snijders AP, Chakravarty P, Judith D, Tooze SA. Activation of ULK kinase and autophagy by GABARAP trafficking from the centrosome is regulated by WAC and GM130. *Mol Cell*, 2015; 60: 899-913.
- Johanson IB. Development of olfactory and thermal responsiveness in hypothyroid and hyperthyroid rat pups. *Dev Psychobiol*, 1980; 13: 343-341.
- Jones DT, Reed RR. Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*, 1989; 244: 790-795.
- Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, Cooper DS, Kim BW, Peeters RP, Rosenthal MS, Sawka AM. American thyroid association task force on thyroid hormone replacement. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid*, 2014; 24: 1670-1751.
- Jonklaas J, Bianco AC, Cappola AR, Celi FS, Fliers E, Heuer H, McAninch EA, Moeller LC, Nygaard B, Sawka AM, Watt T, Dayan CM. Evidence-based use of levothyroxine/liothyronine combinations in treating hypothyroidism: A Consensus Document. *Thyroid*, 2021; 31:156-182.
- Jourdan F. Ultrastructure of the olfactory epithelium of the rat: polymorphism of the receptors. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*, 1975; 280: 443-446.
- Ju TC, Chen HM, Lin JT, Chang CP, Chang WC, Kang JJ, Sun CP, Tao MH, Tu PH, Chang C, Dickson DW, Chern Y. Nuclear translocation of AMPK- α 1 potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Cell Biol*, 2011; 194: 209-227.
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 2009; 20: 1992-2003.
- Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 2010; 584: 1287-1295.
- Jung HJ, Shin IS, Lee JE. Olfactory function in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Laryngoscope*, 2019; 129: 362-369.
- Jurado-Flores M, Warda F, Mooradian A. Pathophysiology and clinical features of neuropsychiatric manifestations of thyroid disease. *J Endocr Soc*. 2022; 6: bvab194.

- Ka M, Smith AL, Kim WY. MTOR controls genesis and autophagy of GABAergic interneurons during brain development. *Autophagy*, 2017; 13: 1348-1363.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000; 19: 5720-5728.
- Kageyama R, Imayoshi I, Sakamoto M. The role of neurogenesis in olfaction-dependent behaviors. *Behav Brain Res*, 2012; 227, 459-463.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clue to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 2005; 1: 15-25.
- Kalvari I, Tsompanis S, Mulakkal NC, Osgood R, Johansen T, Nezis IP, Promponas VJ. iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. *Autophagy*, 2014; 10: 913-925.
- Kang YA, Sanalkumar R, O'Geen H, Linnemann AK, Chang CJ, Bouhassira EE, Farnham PJ, Keles S, Bresnick EH. Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis. *Mol Cell Biol*, 2012; 32: 226-239.
- Kaplan MM, Yaskoski KA. Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodo thyronines in rat brain homogenates. *J Clin Invest*, 1980; 66: 551-562.
- Kapoor R, Desouza LA, Nanavaty IN, Kernie SG, Vaidya VA. Thyroid hormone accelerates the differentiation of adult hippocampal progenitors. *J Neuroendocrinol*, 2012; 24: 1259-1271.
- Kapoor R, Fanibunda SE, Desouza LA, Guha SK, Vaidya VA. Perspectives on thyroid hormone action in adult neurogenesis. *J Neurochem*, 2015; 133: 599-616.
- Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, Ktistakis NT. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci*, 2013; 126: 5224-5238.
- Kasowski HJ, Kim H, Greer CA. Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J Comp Neurol*, 1999; 407, 261-274.
- Kast DJ, Dominguez R. The cytoskeleton-autophagy connection. *Curr Biol*, 2017; 27: R318-R326.
- Kaufmann A, Wollert T. Scaffolding the expansion of autophagosomes. *Autophagy*, 2014; 10: 1343-1345.
- Kaupp UB. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci*, 2010; 11: 188-200.
- Kaushik S, Massey AC, Cuervo AM. Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *EMBO J*, 2006; 25: 3921-3933.
- Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*, 2012; 22: 407-417.

- Ke MT, Fujimoto S, Imai T. See DB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*, 2013; 16:1154-1161.
- Kelsch W, Mosley CP, Lin CW, Lois C. Distinct mammalian precursors are committed to generate neurons with defined dendritic projection patterns. *PLoS Biol*, 2007; 5: e300.
- Kern A, Dikic I, Behl C. The integration of autophagy and cellular trafficking pathways via RAB GAPs. *Autophagy*. 2015; 11: 2393-2397.
- Khan YS, Farhana A. Histology, Thyroid Gland. (Last Update: December 5, 2022) Erişim: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551659/#article-32675.s6>], Erişim Tarihi: 24 Aralık 2022.
- Khurshid K, Crow AJD, Rupert PE, Minniti NL, Carswell MA, Mechanic-Hamilton DJ, Kamath V, Doty RL, Moberg PJ, Roalf DR. A quantitative meta-analysis of olfactory dysfunction in epilepsy. *Neuropsychol Rev*, 2019; 29: 328-337.
- Kırgezen T, Yüçetaş U, Server EA, Övünç O, Yiğit Ö. Possible effects of low testosterone levels on olfactory function in males. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2021; 87: 702-710.
- Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell*, 2004; 15: 4829-4840.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 2011; 13(2): 132-41.
- Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q, Guan KL. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, 2013; 152: 290-303.
- Kim JY, Duan X, Liu CY, Jang MH, Guo JU, Pow-anpongkul N, Kang E, Song H, Ming GL. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron*, 2009; 63: 761-773.
- Kim SH, Munemasa Y, Kwong JM, Ahn JH, Mareninov S, Gordon LK, Caprioli J, Piri N. Activation of autophagy in retinal ganglion cells. *J Neurosci Res*, 2008; 86: 2943-2951.
- Kirkin V, Rogov VV. A diversity of selective autophagy receptors determines the specificity of the autophagy pathway. *Mol Cell*, 2019; 76: 268-285.
- Kiyokage E, Pan YZ, Shao Z, Kobayashi K, Szabo G, Yanagawa Y, Obata K, Okano H, Toida K, Puche AC, Shipley MT. Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci*, 2010; 30: 1185-1196.
- Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions. *J Cell Sci*, 2005; 118:7-18.
- Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8: 931-937.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et al. Guidelines for the

- use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2012; 8: 445-544.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 2016; 12: 1-222.
- Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, Bülow I, Perrild H, Ovesen L, Jørgensen T. Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90: 4019-4024.
- Kocak M, Ezazi Erdi S, Jorba G, Maestro I, Farrés J, Kirkin V, Martinez A, Pless O. Targeting autophagy in disease: established and new strategies. *Autophagy*, 2022; 18: 473-495.
- Koibuchi N, Chin WW. Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol Metab*, 2000; 11: 123-128.
- Kokovay E, Goderie S, Wang Y, Lotz S, Lin G, Sun Y, Roysam B, Shen Q, Temple S. Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell*, 2010; 7: 163-173.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 2006; 441: 880-884.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura SI, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 2007a; 131: 1149-63.
- Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Iwata J, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007b; 104: 14489-14494.
- Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura SI, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*, 2010; 12: 213-23.
- Komatsu M, Kageyama S, Ichimura Y. p62/SQSTM1/A170: physiology and pathology. *Pharmacol Res*, 2012; 66: 457-62.
- Koos DS, Fraser SE. The Grueneberg ganglion projects to the olfactory bulb. *Neuroreport*, 2005; 16: 1929-1932.
- Kopel H, Schechtman E, Groysman M, Mizrahi A. Enhanced synaptic integration of adult-born neurons in the olfactory bulb of lactating mothers. *J Neurosci*, 2012; 32: 7519-7527.
- Korevaar TI, Muetzel R, Medici M, Chaker L, Jaddoe VW, de Rijke YB, Steegers EA, Visser TJ, White T, Tiemeier H, Peeters RP. Association of maternal thyroid

- function during early pregnancy with off spring IQ and brain morphology in childhood: a population-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016; 4: 35-43.
- Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol. Cell*, 2009; 33: 517-527.
- Kosaka K, Hama K, Nagatsu I, Wu JY, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Kosaka T. Postnatal development of neurons containing both catecholaminergic and GABAergic traits in the rat main olfactory bulb. *Brain Res*, 1987a; 403: 355-360.
- Kosaka K, Hama K, Nagatsu I, Wu JY, Kosaka T. Possible coexistence of amino acid (gamma-aminobutyric acid), amine (dopamine) and peptide (substance P); neurons containing immunoreactivities for glutamic acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase and substance P in the hamster main olfactory bulb. *Exp Brain Res*, 1988; 71: 633-642.
- Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. Calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Exp Brain Res*, 1994; 99: 191-204.
- Kosaka K, Aika Y, Toida K, Heizmann CW, Hunziker W, Jacobowitz DM, Nagatsu I, Streit P, Visser TJ, Kosaka T. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb. *Neurosci Res*, 1995; 23: 73-88.
- Kosaka K, Toida K, Margolis FL, Kosaka T. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--II. Prominent differences in the intraglomerular dendritic arborization and their relationship to olfactory nerve terminals. *Neuroscience*, 1997; 76: 775-786.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T. How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res*, 1998; 30: 101-110.
- Kosaka K, Kosaka T. Organization of the main olfactory bulbs of some mammals: muskshrews, moles, hedgehogs, treeshrews, bats, mice and rats. *J Comp Neurol*, 2004; 472: 1-12.
- Kosaka K, Künzle H, Kosaka T. Organization of the main olfactory bulb of lesser hedgehog tenrecs. *Neurosci Res*, 2005; 53: 353-362.
- Kosaka K, Kosaka T. Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int*, 2005; 80: 80-90.
- Kosaka K, Kosaka T. Chemical properties of type 1 and type 2 periglomerular cells in the mouse olfactory bulb are different from those in the rat olfactory bulb. *Brain Res*, 2007; 1167: 42-55.
- Kosaka T, Hataguchi Y, Hama K, Nagatsu I, WU JY. Coexistence of immunoreactivities for glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in some neurons in the periglomerular region of the rat main olfactory bulb: possible

- coexistence of gamma-aminobutyric acid (GABA) and dopamine. *Brain Res*, 1985; 343: 166-171.
- Kosaka T, Kosaka K, Hataguchi Y, Nagatsu I, Wu JY, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Hama K. Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immuno reactivities in various brain regions of the rat. *Exp Brain Res*, 1987b; 66: 191-210.
- Kosaka T, Kosaka K. Tyrosine hydroxylase-positive GABAergic juxtaglomerular neurons are the main source of the interglomerular connections in the mouse main olfactory bulb. *Neurosci Res*, 2008; 60: 349-354.
- Kosaka T, Kosaka K. Interneurons in the olfactory bulb revisited. *Neurosci Res*, 2011; 69: 93-99.
- Koyama-Honda I, Itakura E, Fujiwara TK, Mizushima N. Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy*, 2013; 9: 1491-1499.
- Kramer CK, vonMühlen D, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. Treated hypothyroidism, cognitive function and depressed mood in old age: the Rancho Bernardo Study. *Eur J Endocrinol*, 2009; 161: 917-921.
- Kravets I. Hyperthyroidism: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 2016; 93: 363-370.
- Krohn K, Führer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, Paschke R. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocr Rev*, 2005; 26: 504-524.
- Ktistakis NT. ER platforms mediating autophagosome generation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020; 1865: 158433.
- Kuiper GG, Kester MH, Peeters RP, Visser TJ. Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid*, 2005; 15: 787-798.
- Kulikov A, Torr sani J, Jeanningros R. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. *Neurosci Lett*, 1997; 234: 111-114.
- Kulkarni A, Chen J, Maday S. Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain. *Curr Opin Neurobiol*, 2018; 51: 29-36.
- Kulkarni VV, Maday S. Compartment-specific dynamics and functions of autophagy in neurons. *Dev Neurobiol*, 2018; 78: 298-310.
- Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci*, 2005; 25: 11288-11299.
- Kumar V, Mills J, Lapierre LR. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging. *Front Cell Dev Biol*, 2022; 10: 793328.
- Kume S, Thomas MC, Koya D. Nutrient sensing, autophagy and diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2012; 61: 23-29.

- Kuramoto N, Wilkins ME, Fairfax BP, Revilla-Sanchez R, Terunuma M, Tamaki K, Iemata M, Couve A, Calver A, Horvath Z, Freeman K, Carling D, Huang L, Gonzales C, Cooper E, Smart TG, Pangalos MN, Moss SJ. Phospho-dependent functional modulation of GABA(B) receptors by the metabolic sensor AMP-dependent protein kinase. *Neuron*, 2007; 53: 233-247.
- Kwon DH, Park OH, Kim L, Jung YO, Park Y, Jeong H, Kim YK, Song HK. Insights into degradation mechanism of N-end rule substrates by p62/SQSTM1 autophagy adapter. *Nat. Commun*, 2018; 9: 3291.
- Lacar B, Young SZ, Platel JC, Bordey A. Imaging and recording subventricular zone progenitor cells in live tissue of postnatal mice. *Front Neurosci*, 2010; 4: 43.
- Lafourcade CA, Lin TV, Feliciano DM, Zhang L, Hsieh LS, Bordey A. Rheb activation in subventricular zone progenitors leads to heterotopia, ectopic neuronal differentiation and rapamycin-sensitive olfactory micronodules and dendrite hypertrophy of newborn neurons. *J Neurosci*, 2013; 33: 2419-2431.
- Lamark T, Perander M, Outzen H, Kristiansen K, Øvervatn A, Michaelsen E, Bjørkøy G, Johansen T. Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J Biol Chem*, 2003; 278: 34568-34581.
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013; 14: 759-774.
- Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*, 2009; 326: 437-440.
- Landis BN, Konnerth CG, Hummel TA. Study on the frequency of olfactory dysfunction. *Laryngoscope*, 2004; 114: 1764-1769.
- Laplanche M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 2009; 122: 3589-3594.
- Larsen PR. Thyroid-pituitary interaction: feedback regulation of thyrotropin secretion by thyroid hormones. *N Engl J Med*, 1982; 306: 23-32.
- Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol*, 2010; 30: 3275-85.
- Lazar MA, Chin WW. Nuclear thyroid hormone receptors. *J Clin Investig*, 1990; 86: 1777-1782.
- Le Douarin N, Fontaine J, Le Lièvre C. New studies on the neural crest origin of the avian ultimobranchial glandular cells-interspecific combinations and cytochemical characterization of C cells based on the uptake of biogenic amine precursors. *Histochemistry*, 1974; 38: 297-305.
- Lee EJ, Tournier C. The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy*, 2011; 7: 689-695.
- Lee H. Phosphorylated mTOR expression profiles in human normal and carcinoma tissues. *Dis Markers*, 2017; 2017: 1397063.

- Lee IH, Finkel T. Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *J Biol Chem*, 2009; 284: 6322-6328.
- Lee JH, Koh H, Kim M, Kim Y, Lee SY, Karess RE, Lee SH, Shong M, Kim JM, Kim J, Chung J. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2007; 447: 1017-1020.
- Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang HG. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One*, 2010; 5: e15394.
- Lee S, Sato Y, Nixon RA. Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J Neurosci*, 2011; 31: 7817-30.
- Lee Y, Chou TF, Pittman SK, Keith AL, Razani B, Weihl CC. Keap1/Cullin3 Modulates p62/SQSTM1 activity via UBA domain ubiquitination. *Cell Rep*, 2017; 19(1): 188-202. Erratum in: *Cell Rep*, 2017; 20: 1994.
- Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep*, 2016; 49: 424-430.
- Lemasson M, Saghatelian A, Olivo-Marin JC, Lledo PM. Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, 2005; 25, 6816-6825.
- Lemkine GF, Raj A, Alfama G, Turque N, Hassani Z, Alegria-Prévot O, Samarut J, Levi G, Demeneix BA. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J*, 2005; 19, 863-865.
- Leung CT, Coulombe PA, Reed RR. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci*, 2007; 10: 720-726.
- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 2004; 6: 463-77.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008; 132: 27-42.
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists, *Science*, 2010; 329: 959-964.
- Li Q, Liberles SD. A version and attraction through olfaction. *Curr Biol*, 2015; 25, R120-R129.
- Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69: 1125-1136.
- Li Z, Cestari DM, Fortin E. Thyroid eye disease: what is new to know? *Curr Opin Ophthalmol*, 2018; 29: 528-534.
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol*, 2006; 8: 688-699.

- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*, 1998; 72: 8586-8596.
- Liberles SD. Mammalian pheromones. *Annu Rev Physiol*, 2014; 76, 151-175.
- Lim J, Lachenmayer ML, Wu S, Liu W, Kundu M, Wang R, Komatsu M, Oh YJ, Zhao Y, Yue Z. Proteotoxic Stress Induces Phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to Regulate Selective Autophagic Clearance of Protein Aggregates. *Plos Genet*, 2015; 11: e1004987.
- Lin W, Ezekwe EA Jr, Zhao Z, Liman ER, Restrepo D. TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium. *BMC Neurosci*, 2008; 9: 114.
- Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC. Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: a complex tissue for a complex injury? *Glia*, 2010; 58: 125-134.
- Liodis P, Denaxa M, Grigoriou M, Akufo-Addo C, Yanagawa Y, Pachnis V. Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci*, 2007; 27: 3078-3089.
- Lischinsky JE, Skocic J, Clairman H, Rovet J. preliminary findings show maternal hypothyroidism may contribute to abnormal cortical morphology in off spring. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016; 7: 16.
- Liu CY, Fraser SE, Koos DS. Grueneberg ganglion olfactory subsystem employs a cGMP signaling pathway. *J Comp Neurol*, 2009; 516, 36-48.
- Liu D, Stowie A, de Zavalía N, Leise T, Pathak SS, Drewes LR, Davidson AJ, Amir S, Sonenberg N, Cao R. mTOR signaling in VIP neurons regulates circadian clock synchrony and olfaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018; 115: E3296-E3304.
- Liu S, Shipley MT. Multiple conductances cooperatively regulate spontaneous bursting in mouse olfactory bulb external tufted cells. *J Neurosci*, 2008; 28: 1625-1639.
- Liu Q, Ye W, Hu N, Cai H, Yu H, Wang P. Olfactory receptor cells respond to odors in a tissue and semiconductor hybrid neuron chip. *Biosens Bioelectron*, 2010; 26: 1672-1678.
- Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*, 2016; 21: 29.
- Liu WL, Shipley MT. Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystokinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. *J Comp Neurol*, 1994; 346, 541-558.
- Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone cross talk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol Meta*, 2010; 21: 166-173.
- Lledo PM, Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci*, 2005; 28: 248-254.

- Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci*, 2008; 31: 392-400.
- Lledo PM, Valley M. Adult olfactory bulb neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016; 8: a018945.
- Lodovichi C, Belluscio L, Katz LC. Functional topography of connections linking mirror-symmetric maps in the mouse olfactory bulb. *Neuron*, 2003; 38: 265-276.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 1996; 271: 978-981.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 1994; 264: 1145-1148.
- López-Juárez A, Remaud S, Hassani Z, Jolivet P, Pierre Simons J, Sontag T, Yoshikawa K, Price J, Morvan-Dubois G, Demeneix BA. Thyroid hormone signaling acts as a neurogenesis witch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 2012; 10: 531-543.
- Lorincz P, Juhasz G. Autophagosome-lysosome fusion. *J Mol Biol*, 2020; 432: 2462-2482.
- Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (2nd ed). McGraw-Hill Book Co, New York 1960; p.: 160.
- Luo M. The necklace olfactory system in mammals. *J Neurogenet*, 2008; 22: 229-238.
- Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 1993; 11: 173-189.
- Lv X, Jiang H, Li B, Liang Q, Wang S, Zhao Q, Jiao J. The crucial role of Atg5 in cortical neurogenesis during early brain development. *Sci Rep*, 2014; 4: 6010.
- Lystad AH, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep*, 2014; 15: 557-565.
- Ma M, Grosmaître X, Iwema CL, Baker H, Greer CA, Shepherd GM. Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *J Neurosci*, 2003; 23: 317-324.
- Machado CF, Reis-Silva TM, Lyra CS, Felício LF, Malnic B. Buried food-seeking test for the assessment of olfactory detection in mice. *Bio Protoc*, 2018; 8: e2897.
- Mackay-Sim A, Beard MD. Hypothyroidism disrupts neural development in the olfactory epithelium of adult mice. *Dev Brain Res*, 1987; 36: 190-198.
- Macrides F, Schneider SP. Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. *J Comp Neurol*, 1982; 208: 419-430.
- Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol*, 2012; 196: 407-417.
- Maday S, Twelvetrees AE, Moughamian AJ, Holzbaur EL. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron*, 2014; 84: 292-309.

- Magavi SS, Mitchell BD, Szentirmai O, Carter BS, Macklis JD. Adult-born and preexisting olfactory granule neurons undergo distinct experience-dependent modifications of their olfactory responses in vivo. *J Neurosci*, 2005; 25: 10729-10739.
- Magri L, Cambiaghi M, Cominelli M, Alfaro-Cervello C, Corsi M, Pala M, Bulfone A, Garca-Verdugo JM, Leocani L, Minicucci F, Poliani PL, Galli R. Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell*, 2011; 9: 447-462.
- Mahoney C, Feliciano DM, Bordey A, Hartman NW. Switching on mTORC1 induces neurogenesis but not proliferation in neural stem cells of young mice. *Neurosci Lett*, 2016; 614: 112-118.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*, 2007; 26: 2527-2539.
- Mak GK, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I, Weiss S. Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: Possible role in mating behavior. *Nat Neurosci*, 2007; 10: 1003-1011.
- Mak GK, Weiss S. Paternal recognition of adult off-spring mediated by newly generated CNS neurons. *Nat Neurosci*, 2010; 13: 753-758.
- Malvaut S, Saghatelian A. The role of adult-born neurons in the constantly changing olfactory bulb network. *Neural Plast*, 2016; 2016: e1614329.
- Mandel SJ, Brent GA, Larsen PR. Levothyroxine therapy in patients with thyroid disease. *Ann Intern Med*, 1993; 119: 492-502.
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*, 2002; 10: 151-62.
- Marschner C. Qualitative and quantitative studies of the olfactory bulb of elephants in comparison with that of man and pigs. *Acta Anat (Basel)*, 1970; 75: 578-595.
- Marshall RS, Mcloughlin F, Vierstra RD. Autophagic turnover of inactive 26S proteasomes in yeast is directed by the ubiquitin receptor Cue5 and the Hsp42 chaperone. *Cel Rep*, 2016; 16: 1717-1732.
- Marsili A, Tang D, Harney JW, Singh P, Zavacki AM, Dentice M, Salvatore D, Larsen PR. Type II iodo thyronine deiodinase provides intracellular 3,5,3'-triiodo thyronine to normal and regenerating mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011; 301: E818-E824.
- Martinet W, Agostinis P, Vanhoecke B, Dewaele M, De Meyer GR. Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, 2009; 116: 697-712.
- Martinez J, Almendinger J, Oberst A, Ness R, Dillon CP, Fitzgerald P, Hengartner MO, Green DR. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-

- associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108: 17396-17401.
- Martino E, Bartalena L, Mariotti S, Aghini-Lombardi F, Ceccarelli C, Lippi F, Piga M, Loviselli A, Braverman L, Safran M, Pinchera A. Radioactive iodine thyroid uptake in patients with amiodarone-iodine-induced thyroid dysfunction. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1988; 119: 167-173.
- Maruyama T, Noda NN. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017; 71: 72-78.
- Marzella L, Ahlberg J, Glaumann H. In vitro uptake of particles by lysosomes. *Exp Cell Res*, 1980; 129: 460-466.
- Marzella L, Ahlberg J, Glaumann H. Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1981; 36: 219-234.
- Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004; 36: 2420-2434.
- Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol. Cell*, 2011; 44: 279-289.
- Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, Yoshimori T. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol*, 2010; 190: 511-21.
- Mattes RD. Physiologic responses to sensory stimulation by food: nutrition alimplications. *J Am Diet Assoc*, 1997; 97: 406-413.
- Mattson MP, Arumugam TV. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab*, 2018; 27: 1176-1199.
- Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol*, 2010; 22: 177-180.
- McAllister AK. Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex*, 2000; 10: 963-973.
- McConnell RJ, Menendez CE, Smith FR, Henkin RI, Rivlin RS. Defects of taste and smell in patients with hypothyroidism. *Am J Med*, 1975; 59: 354-364.
- McCruden DC, Hilditch TE, Connell JM, McLellan AR, Robertson J, Alexander WD. Duration of antithyroidaction of methimazole estimated with an intravenous perchlorate discharge test. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1987; 26: 33-39.
- McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, Coxon FP, de Stegmann DM, Bhogaraju S, Maddi K, Kirchof A, Gatti E, Helfrich MH, Wakatsuki S, Behrends C, Pierre P, Dikic I. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Mol Cell*, 2015; 57: 39-54.
- McIver B, Morris JC. The pathogenesis of Graves disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998; 27: 73-89.

- McLaughlin MB, Jialal I. Calcitonin, 2020; 34: 191-193.
- McLear JA, Garcia-Fresco G, Bhat MA, Van Dyke TA. In vivo inactivation of pRb, p107 and p130 in murine neuroprogenitor cells leads to major CNS developmental defects and high seizure rates. *Mol Cell Neurosci*, 2006; 33:260-273.
- Melia TJ, Lystad AH, Simonsen A. Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *J Cell Biol*, 2020; 219: e202002085.
- Mellert TK, Getchell ML, Sparks L, Getchell TV. Characterization of the immune barrier in human olfactory mucosa. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1992; 106: 181-188.
- Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM. *Williams Textbook of Endocrinology* (12 th ed). Saunders 2011; p.: 1250-1252.
- Menini A. Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 1999; 9: 419-426.
- Menzies FM, Moreau K, Puri C, Renna M, Rubinsztein DC. Measurement of autophagic activity in mammalian cells. *Curr Protoc Cell Biol*, 2012; Chapter 15: Unit 15.16.
- Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Füllgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C, Licitra F, Lopez Ramirez A, Pavel M, Puri C, Renna M, Ricketts T, Schlotawa L, Vicinanza M, Won H, Zhu Y, Skidmore J, Rubinsztein DC. Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities. *Neuron*, 2017; 93: 1015-1034.
- Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 2009; 5: 649-662.
- Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 17528-17532.
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 2007; 317, 381-384.
- Merkle FT, Fuentealba LC, Sander, TA, Magno L, Kessaris N, Alvarez-Buylla A. Adult neural stem cells in distinct micro domains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci*, 2014; 17: 207-214.
- Meyer A, Gläser A, Bräuer AU, Wree A, Strotmann J, Rolfs A, Witt M. Olfactory performance as an indicator for protective treatment effects in an animal model of neurodegeneration. *Front Integr Neurosci*, 2018; 12: 35.
- Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 2011; 13: 1016-1023.
- Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 2012; 13: 1016-1023.

- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 2011; 7: 673-682.
- Miller EJ, Li J, Leng L, McDonald C, Atsumi T, Bucala R. et al. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature*, 2008; 451: 578-582.
- Miller ML, Andringa A, Evans JE, Hastings L. Microvillar cells of the olfactory epithelium: morphology and regeneration following exposure to toxic compounds. *Brain Res*, 1995; 669: 1-9.
- Miller SS, Spear NE. Olfactory learning in the rat neonate soon after birth. *Dev Psychobiol*, 2008; 50: 554-565.
- Miller SS, Spear NE. Mereodor exposure learning in therat neonate immediately after birth and 1 day later. *Dev Psychobiol*, 2010; 52: 343-351.
- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 2005; 28: 223-250.
- Mirich JM, Williams NC, Berlau DJ, Brunjes PC. Comparative study of aging in the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 2002; 454: 361-372.
- Mirzaa GM, Campbell CD, Solovieff N, Goold C, Jansen LA, Menon S, Timms AE, Conti V, Biag JD, Adams C, Boyle EA, Collins S, Ishak G, Poliachik S, Girisha KM, Yeung KS, Chung BHY, Rahikkala E, Gunter SA, McDaniel SS, Macmurdo CF, Bernstein JA, Martin B, Leary R, Mahan S, Liu S, Weaver M, Doerschner M, Jhangiani S, Muzny DM, Boerwinkle E, Gibbs RA, Lupski JR, Shendure J, Saneto RP, Novotny EJ, Wilson CJ, Sellers WR, Morrissey M, Hevner RF, Ojemann JG, Guerrini R, Murphy LO, Winckler W, Dobyns WB. Association of MTOR mutations with developmental brain disorders, ncluding megalencephaly, focal cortical dysplasia and pigmentary mosaicism. *JAMA Neurol*, 2016; 73: 836-845.
- Mitchellhill KI, Stapleton D, Gao G, House C, Michell B, Katsis F, Witters LA, Kemp BE. Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem*, 1994; 269: 2361-2364.
- Mitsui S, Otomo A, Nozaki M, Ono S, Sato K, Shirakawa R, Adachi H, Aoki M, Sobue G, Shang HF, Hadano, S. Systemic overexpression of SQSTM1/p62 accelerates disease onset in a SOD1H46R-expressing ALS mouse model. *Mol Brain*, 2018; 11: 30.
- Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*, 2005; 12: 1535-1541.
- Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 2007; 21: 2861-2873.
- Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: Implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, 2007; 27: 19-40.
- Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 2007; 3: 542-5.

- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 2010;140: 313-26.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011; 27: 107-32.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 2012; 147: 728-741.
- Moberg PJ, Kamath V, Marchetto DM, Calkins ME, Doty RL, Chang-Gyu Hahn,1 Borgmann-Winter KE, Kohler CG, Gur RE, Turetsky BI. Meta-analysis of olfactory function in schizophrenia, first-degree family members and youths at-risk for psychosis. *Schizophr Bull*, 2014; 40: 50-59.
- Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res*, 2011; 4: S6.
- Mogulkoç R, Baltacı AK, Öztekin E, Aydın L, Sivrikaya A. Melatonin prevents oxidant damage in various tissues of rats with hyperthyroidism. *Life Sci*, 2006; 79: 311-315.
- Mohan V, Sinha RA, Pathak A, Rastogi L, Kumar P, Pal A, Godbole MM. Maternal thyroid hormone deficiency affects the fetal neocortico genesis by reducing the proliferating pool, rate of neurogenesis and indirect neurogenesis. *Exp Neurol*, 2012; 237: 477-88.
- Molino D, Nascimbeni AC, Giordano F, Codogno P, Morel E. ER-driven membrane contact sites: evolutionary conserved machineries for stress response and autophagy regulation? *Commun Integr Biol*, 2017; 10: e1401699.
- Momcilovic M, Hong SP, Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J BiolChem*, 2006; 281: 25336-25343.
- Montero-Pedrazuela A, Venero C, Lavado-Autric R, Fernández-Lamo I, García-Verdugo JM, Bernal J, Guadaño-Ferraz A. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry*, 2006; 11: 361-371.
- Moog NK, Entringer S, Heim C, Wadhwa PD, Kathmann N, Buss C. Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development. *Neuroscience*, 2017; 342: 68-100.
- Moore F, Weekes J, Hardie DG. Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct all osteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur J Biochem*, 1991; 199: 691-697.
- Moore F, Brophy PJ. Regulation of acetyl-CoA carboxylase (ACC) by ATP depletion in developing oligodendrocytes mimics the action of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Biochem Soc Trans*, 1994; 22: 416S.
- Moran DT, Rowley JC III, Jafek BW. Electronmicroscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: the microvillar cell. *Brain Res*, 1982; 253: 39-46.

- Morel E. Endoplasmic reticulum membrane and contact site dynamics in autophagy regulation and stress response. *Front Cell Dev Biol*, 2020; 8: 343.
- Morgado AL, Xavier JM, Dionísio PA, Ribeiro MF, Dias RB, Sebastião AM, Solá S, Rodrigues CM. MicroRNA-34a Modulates Neural Stem Cell Differentiation by Regulating Expression of Synaptic and Autophagic Proteins. *Mol Neurobiol*, 2015; 51: 1168-1183.
- Mori K, Kishi K, Ojima H. Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 1983; 219, 339-355.
- Morillo-Bernal J, Fernández-Santos JM, Utrilla JC, de Miguel M, García-Marín R, Martín-Lacave I. Functional expression of the thyrotropin receptor in C cells: new in sights into their involvement in the hypothalamic-pituitary-thyroidaxis. *J Anat*, 2009; 215: 150-158.
- Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of the human olfactory epithelium. *J Comp Neurol*, 1990; 297: 1-13.
- Morte B, Diez D, Auso E, Belinchon MM, Gil-Ibanez P, Grijota-Martinez C, Navarro D, de Escobar GM, Berbel P, Bernal J. Thyroid hormone regulation of gene expression in the developing rat fetal cerebral cortex: prominent role of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV pathway. *Endocrinology*, 2010; 151: 810-280.
- Mortimore GE, Schworer CM. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*, 1977; 270: 5633.
- Moruno F, Perez-Jimenez E, Knecht E. Regulation of autophagy by glucose in mammalian cells. *Cells*, 2012; 1: 372-395.
- Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, Campuzano S. Cell Signaling and Function Organized by PB1 Domain Interactions. *Mol Cel*, 2006; 23: 631-640.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell*, 2009; 137: 1001-1004.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. Feedback on Fat: P62-mTORC1-autophagy connections. *Cell*, 2011; 147: 724-727.
- Moscat J, Karin M, Diaz-Meco MT. p62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy. *Cell*, 2016; 167: 606-609.
- Motomura K, Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998; 27: 1-23.
- Mouradian LE, Scott JW. Cytochromeoxidase staining marks dendritic zones of the rat olfactory bulb external plexiform layer. *J Comp Neurol*, 1988; 271, 507-518.
- Moussa A, Li J. AMPK in myocardial infarction and diabetes: the yin/yang effect. *Acta Pharm Sin B*, 2020; 2: 368-378.
- Muanprasat C, Wongkrasant P, Satitsri S, Moonwiriyaakit A, Pongkorpsakol P, Mattaveewong T, Pichyangkura R, Chatsudthipong V. Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and

- potential applications in intestinal disorders. *Biochem Pharmacol*, 2015; 96: 225-36.
- Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev*, 2014; 94: 355-382.
- Murphy GJ, Darcy DP, Isaacson JS. Intraglomerular inhibition: signaling mechanisms of an olfactory microcircuit. *Nat Neurosci*, 2005; 8: 354-64.
- Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn*, 2005; 233: 496-515.
- Nagayama S, Takahashi YK, Yoshihara Y, Mori K. Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol*, 2004; 91: 2532-2540.
- Nagayama S, Enerva A, Fletcher ML, Masurkar AV, Igarashi KM, Mori K, Chen WR. Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse main olfactory system *Front Neural Circuits*, 2010; 4: 120.
- Nagayama S, Homma R, Imamura F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits*, 2014; 8: 98.
- Nakamura K, Kimple AJ, Siderovski DP, Johnson GL. PB1 domain interaction of p62/Sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF-Kb activation. *J Biol Chem*, 2010; 285: 2077-2089.
- Navarrete-Palacios E, Hudson R, Reyes-Guerrero G, Guevara-Guzman R. Lower olfactory threshold during the ovulatory phase of the menstrual cycle. *Biol Psychol*, 2003; 63: 269-279.
- Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, Gretzmeier C, Dengjel J, Piacentini M, Fimia GM, Cecconi F. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol*, 2013; 15: 406-416.
- Niimura Y. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: interaction between environments and genomic contents. *Hum Genomics*, 2009; 4: 107-118.
- Nikoletopoulou V, Papandreou ME, Tavernarakis N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death and Differentiation*, 2015; 22: 398-407.
- Nilsson M, Williams D. On the origin of cells and derivation of thyroid cancer: c cell story revisited. *Eur Thyroid J*, 2016; 5: 79-93.
- Nishimura T, Tooze SA. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discov*, 2020; 6: 32.
- Nishimura T, Tamura N, Kono N, Shimanaka Y, Arai H, Yamamoto H, Mizushima N. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *EMBO J*, 2017; 36: 1719-1735.

- Nishiyama J, Miura E, Mizushima N, Watanabe M, Yuzaki M. Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. *Autophagy*, 2007; 3: 591-596.
- Nixon RA, Yang DS. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, 2012; 4: a008839.
- Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 2013; 19: 983-97.
- Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, 2004; 7(2): 136-44.
- Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F. Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett*, 2010; 584: 1379-85.
- Nodari F, Hsu FF, Fu X, Holekamp TF, Kao LF, Turk J, Holy TE. Sulfated steroids as natural ligands of mouse pheromone-sensing neurons. *J Neurosci*, 2008; 28(25): 6407-18.
- Nussey S, Whitehead S. *Endocrinology: An Integrated Approach*. Chapter 3: The thyroid gland. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. Oxford: BIOS Scientific Publishers 2001. Erişim: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28/>], Erişim Tarihi: 9 Mayıs 2023.
- Oakhill JS, Chen ZP, Scott JW, Steel R, Castelli LA, Ling N, Macaulay SL, Kemp BE. β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107: 19237-19241.
- Okazaki N, Yan J, Yuasa S, Ueno T, Kominami E, Masuho Y, Koga H, Muramatsu M. Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000; 85: 1-12.
- Oku M, Sakai Y. Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *Bioessays*, 2018; 40: e1800008.
- Onyango IG, Lu J, Rodova M, Lezi E, Crafter AB, Swerdlow RH. Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1802: 228-234.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest*, 1991; 87: 125-132.
- Orona E, Scott JW, Rainer EC. Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 1983; 217: 227-237.
- Orona E, Rainer, EC, Scott JW. Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 1984; 226: 346-356.
- Ortiz-Leal I, Torres MV, López-Callejo LN, Fidalgo LE, López-Beceiro A, Sanchez-Quinteiro P. comparative neuroanatomical study of the main olfactory bulb in

- domestic and wild canids: dog, wolf and red fox. *Animals* (Basel), 2022; 12: 1079.
- Ota Y. Study of the fifth-type cell in the olfactory epithelium. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1998; 101:1234-1249.
- Padmanabhan K, Urban NN. Intrinsic biophysical diversity decorrelates neuronal firing while increasing information content. *Nat Neurosci*, 2010; 13: 1276-1282.
- PAGE, M.E, Erişim: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28/bin/ch3fb11.jpg>], Erişim Tarihi: 24 Haziran 2022.
- PAGE, M.E, Erişim: [https://t3.ftcdn.net/jpg/03/36/22/74/360_F_336227455_K5liv3HB0huqrgVGdKyRd1MEQuBXR9bb.jpg], Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2023.
- PAGE, M.E, Erişim: [<http://www.gensat.org/servlet/ImageProvider?code=4&imageID=26795&imgReqType=1>], Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2023.
- PAGE, M.E, Erişim: [<http://www.gensat.org/servlet/ImageProvider?code=4&imageID=7124&imgReqType=1>], Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2023.
- PAGE, M.E, Erişim: [<http://www.gensat.org/servlet/ImageProvider?code=4&imageID=24335&imgReqType=1>], Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2023.
- PAGE, M.E, Erişim: [<https://cdn.thescientist.com/assets/articleNo/67643/hImg/38273/olfactory-bulb-x.webp>], Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2023.
- PAGE, M.E, (26 February 2016). The Science of Parkinson's. A sense of (and the science of) smell. Erişim: [<https://scienceofparkinsons.com/tag/olfactory-bulb/>], Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2023.
- PAGE, M.E, What are the major molecular players involved in autophagy signaling? Erişim: [<https://www.novusbio.com/support/faqs-autophagy-and-lc3>], Erişim tarihi: 30 Haziran 2023
- Palha JA. Transthyretin as a thyroid hormone carrier: function revisited. *Clin Chem Lab Med*, 2002; 40: 1292-1300.
- Palouzier-Paulignan B, Lacroix MC, Aime P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard AK, Tucker K, Fadool DA. Olfaction under metabolic influences. *Chem Senses*, 2012; 37: 769-797.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 2007; 282: 24131-24145.
- Pankiv S, Alemu EA, Brech A, Bruun JA, Lamark T, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol*, 2010; 188: 253-269.
- Panzanelli P, Perazzini AZ, Fritschy JM, Sassoè-Pognetto M. Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid type A receptors in mitral and tufted cells of the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 2005; 484: 121-131.
- Park JM, Seo M, Jung CH, Grunwald D, Stone M, Otto N.M, Toso E, Ahn Y, Kyba M, Griffin TJ, Higgins LA, Kim DH. ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in

- association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy*, 2018; 14: 584-597.
- Parras CM, Hunt C, Sugimori M, Nakafuku M, Rowitch D, Guillemot F. The proneural gene *Mash1* specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes. *J Neurosci*, 2007; 27: 4233-4242.
- Parrish-Aungst S, Shipley MT, Erdelyi F, Szabo G, Puche AC. Quantitative analysis of neuronal diversity in the Mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 2007; 501: 825-836.
- Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 2014; 20: 460-73.
- Pascual A, Aranda A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1830: 3908-3916.
- Paternostro MA, Meisami E. Lack of thyroid hormones but not their excess affects the maturation of olfactory receptor neurons: a quantitative morphologic study in the postnatal rat. *Int J Dev Neurosci*, 1991; 9: 439-452.
- Paternostro MA, Meisami E. Developmental plasticity of the rat olfactory receptor sheet as shown by complete recovery of surface area and cell number from early hypothyroid growth retardation. *Dev Brain Res*, 1993; 76: 151-161.
- Paternostro MA, Meisami E. Essential role of thyroid hormones in maturation of olfactory receptor neurons: an immuno cytochemical study of number and cytoarchitecture of OMP-positive cells in develop in grats. *Int J Dev Neurol*, 1996; 14: 867-880.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005; 122: 927-939.
- Peng H, Yang J, Li G, You Q, Han W, Li T, Gao D, Xie X, Lee BH, Du J, Hou J, Zhang T, Rao H, Huang Y, Li Q, Zeng R, Hui L, Wang H, Xia Q, Zhang X, He Y, Komatsu M, Dikic I, Finley D, Hu R. Ubiquitylation of P62/sequestosome1 activates its autophagy receptor function and controls selective autophagy upon ubiquitin stress. *Cell Res*, 2017; 27: 657-674.
- Peterson RT, Beal PA, Comb MJ, Schreiber SL. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem*, 2000; 275:7416-7423.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*, 2002; 22: 6106-6113.
- Petrova I, Mitevska E, Gerasimovska Z, Milenkova L, Kostovska N. Histological structure of the thyroid gland in apolipoprotein E deficient female mice after levothyroxine application. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*, 2014; 35: 135-140.
- Phan TQ, Jow MM, Privalsky ML. DNA recognition by thyroid hormone and retinoic acid receptors: 3,4,5 rulemodified. *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 319: 88-98.

- Pignatelli A, Belluzzi O. Cholinergic modulation of dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *Chemical Senses*, 2008; 33: 331-338.
- Pinching AJ, Powell TP. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J Cell Sci*, 1971a; 9: 305-345.
- Pinching AJ, Powell TP. The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci*, 1971b; 9: 347-377.
- Pinching AJ, Powell TP. The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. *J Cell Sci*, 1971c; 9: 379-409.
- Platel JC, Dave KA, Gordon V, Lacar B, Rubio ME, Bordey A. NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron*, 2010; 65: 859-872.
- Poels J, Spasic MR, Callaerts P, Norga KK. An appetite for destruction: from self-eating to cell cannibalism as a neuronal survival strategy. *Autophagy*, 2012; 8: 1401-1403.
- Polyzonis B M, Kafandaris P M, Gigis P I, Demetriou T. An electronmicroscopic study of human olfactory mucosa. *J Anat*, 1979; 128: 77-83.
- Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol*, 2002; 4: 658-665.
- Préau L, Fini JB, Morvan-Dubois G, Demeneix B. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochim Biophys Acta*, 2015; 1849: 112-121.
- Price JL, Powell TP. The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*, 1970a; 7: 91-123.
- Price JL, Powell TP. The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*, 1970b; 7: 125-155.
- Prinz WA, Toulmay A, Balla T. The functional universe of membrane contact sites. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020; 21: 7-24.
- Proikas-Cezanne T, Takacs Z, Donnes P. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci*, 2015; 128: 207-217.
- Puente C, Hendrickson RC, Jiang X. Nutrient-regulated phosphorylation of Atg13 inhibits starvation-induced autophagy. *J Biol Chem*, 2016; 291: 6026-6035.
- Puopolo M, Belluzzi O. Functional heterogeneity of periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 1998; 10: 1073-1083.
- Pymirat J. Thyroid hormone receptors in rat brain. *Progr Neurobiol*, 1992; 39: 281-94.
- Qiao L, Fu J, Xue X, Shi Y, Yao L, Huang W, Li J, Zhang D, Liu N, Tong X, Du Y, Pan Y. Neuronal injury and roles of apoptosis and autophagy in a neonatal rat model of hypoxia-ischemia-induced periventricular leukomalacia. *Mol Med Rep*, 2018; 17: 5940-5949.
- Quinn NP, Rossor MN, Marsden CD. Olfactory threshold in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1987; 50: 88-89.

- Rae AS. Nodules of cellular proliferation in sheep olfactory ventricle. *Clin Neuropathol*, 1994; 13: 17-18.
- Ragavan S, Elhelw O, Majeed W, Kyriacou A, Syed A. Alemtuzumab-Induced Autoimmune Thyroid Dysfunction. *Cureus*, 2022; 14: e22751.
- Raiborg C, Wenzel EM, Stenmark H. ER-endosome contact sites?: molecular compositions and functions. *EMBO J*, 2015; 34: 1848-1858.
- Rajkovic V, Matavulj M, Johansson O. Light and electron microscopic study of the thyroid gland in rats exposed to power-frequency electromagnetic fields. *J Exp Biol*, 2006; 209: 3322-8.
- Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. *Science*, 1985; 227: 1054-1056.
- Ramamurthy S, Chang E, Cao Y, Zhu J, Ronnett GV. AMPK activation regulates neuronal structure in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*, 2014; 259:13-24.
- Ravikumar B, Moreau K, Rubinsztein DC. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*, 2010; 6: 1184-1186.
- Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, Abbott WG, Boyce V, Howard BV, Bogardus C. Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. *N Engl J Med*, 1988; 318: 467-472.
- Relucio J, Menezes MJ, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Colognato H. Laminin regulates postnatal oligodendrocyte production by promoting oligodendrocyte progenitor survival in the subventricular zone. *Glia*, 2012; 60: 1451-1467.
- Remaud S, Gothie JD, Morvan-Dubois G, Demeneix BA. Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014; 5:62.
- Riley VA, Holmberg JC, Sokolov AM, Feliciano DM. Tsc2 shapes olfactory bulb granule cell molecular and morphological characteristics. *Front Mol Neurosci*, 2022; 15: 970357.
- Rinaldi A. The scent of life. The exquisite complexity of the sense of smell in animals and humans". *EMBO Reports*, 2007; 8: 629-33.
- Riva G, Sensini M, Corvino A, Pecorari G, Garzaro M. Smell and taste impairment after total laryngectomy. *Ann Otol, Rhinol Laryngol*, 2017; 126: 548-554.
- Rivière S, Challet L, Fluegge D, Spehr M, Rodriguez I. Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature*, 2009; 459: 574-577.
- Roberts RO, Christianson TJ, Kremers WK, Mielke MM, Machulda MM, Vassilaki M, Alhurani RE, Geda YE, Knopman DS, Petersen RC. Association between olfactory dysfunction and amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease dementia. *JAMA Neurol*. 2016; 73: 93-101.
- Roberts SA, Simpson DM, Armstrong SD, Davidson AJ, Robertson DH, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL. Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biol*, 2010; 8: 75.

- Robillard L, Ethier N, Lachance M, Hébert TE. G beta gamma subunit combinations differentially modulate receptor an deffect or coupling in vivo. *Cell Signal*, 2000; 12: 673-682.
- Rocheft C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci*, 2002; 22 :2679-2689.
- Rogov V, Dotsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 2014; 53: 167-178.
- Roppolo D, Ribaud V, Jungo VP, Luscher C, Rodriguez I. Projection of the Grüneberg ganglion to the mouse olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 2006; 23: 2887-2894.
- Rosário F, Marques AR, Roque L, Rodrigues R, Ferreira TC, Limbert E, Sobrinho L, Leite V. Metastatic follicular carcinoma associated with hyperthyroidism. *Clin Nucl Med*, 2005; 30: 79-82.
- Roskams AJI, Cai X, Ronnett GV. Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. *Neuroscience*, 1998; 83: 191-200.
- Ross DS, Burch HB, Cooper DS, Greenlee MC, Laurberg P, Maia AL, Rivkees SA, Samuels M, Sosa JA, Stan MN, Walter MA. American thyroid association guidelines for diagnosis and management of hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis. *Thyroid*, 2016; 26: 1343-1421.
- Rosso P, Fioramonti M, Fracassi A, Marangoni M, Taglietti V, Siteni S, Seqatto M. AMPK in the central nervous system: physiological roles and pathological implications. *Research and Reports in Biology*, 2016; 7: 1-13.
- Rostislavleva K, Soler N, Ohashi Y, Zhang L, Pardon E, Burke JE, Masson GR, Johnson C, Steyaert J, Ktistakis NT, Williams RL. Structure and flexibility of the endosomal Vps34 complex reveals the basis of its function on membranes. *Science*, 2015; 350: aac7365.
- Rowley JC, Moran DT, Jafek BW: Peroxidase back fills suggest the mammalian olfactory epithelium contains a second morphologically distinct class of bipolar sensory neuron: the microvillar cell. *Brain Res*, 1989, 502: 387-400.
- Royet JP, Distel H, Hudson R, Gervais R. A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain Res*, 1998; 788:35-42.
- Ruan Y, Zheng XY, Zhang HL, Zhu W, Zhu J. Olfactory dysfunctions in neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res*, 2012; 90: 1693-700.
- Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol*, 2012; 22: R29-R34.
- Ruitenber MJ, Vukovic J, Sarich J, Busfield SJ, Plant GW. Olfactory ensheathing cells: characteristics, genetic engineering, and therapeutic potential. *J Neurotrauma*, 2006;23: 468-478.
- Runwal, G., Stamatakou, E., Siddiqi, Puri C, Zhu Y, Rubinsztein DC. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Sci Rep*, 2019; 9: 10147.

- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 2013; 15: 741-750.
- Rykova Y, Shuper S, Shcherbakovsky M, Kikinchuk V, Peshenko A. Morphological characteristics of the thyroid gland of mature rats in moderate degree chronic hyperthermia. *Georgian Med News*, 2019; 292: 75-81.
- Rymer TL. The role of olfactory genes in the expression of rodent paternal care behavior. *Genes (Basel)*, 2020; 11: 292.
- Ryter SW, Koo JK, Choi AM. Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2014; 17: 329-337.
- Sabatino L, Vassalle C, Del Seppia C, Iervasi G. Deiodinases and the three types of thyroid hormone deiodination reactions. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2021; 36: 952-964.
- Sagar GD, Gereben B, Callebaut I, Mornon JP, Zeöld A, Curcio-Morelli C, Harney JW, Luongo C, Mulcahey MA, Larsen PR, Huang SA, Bianco AC. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Mol Endocrinol*, 2008; 22: 1382-1393.
- Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J*, 2000; 19: 1494-1504.
- Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy*, 2014; 10: 431-441.
- Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell*, 2011; 20: 131-139.
- Sakamoto M, Kageyama R, Imayoshi I. The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. *Front Neurosci*, 2014; 8: 121.
- Salminen A, Kaarniranta K, Haapasalo A, Soininen H, Hiltunen M. AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2011; 118: 460-474.
- Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJ, Hardie DG. AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells and may regulate insulin release. *Biochem J*, 1998; 335: 533-539.
- Salvador N, Aguado C, Horst M, Knecht E. Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem*, 2000; 275: 27447-27456.
- Samadi A, Skocic J, Rovet JF. Children born to women treated for hypothyroidism during pregnancy show abnormal corpus callosum development. *Thyroid*, 2015; 25: 494-502.

- Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 2011; 478: 382-386.
- Sanchez AM, Csibi A, Raibon A, Cornille K, Gay S, Bernardi H, Candau R. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem*, 2012; 113: 695-710.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuite M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica AJ, Gutierrez A. Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol*, 2012; 123: 53-70.
- Sarnat HB, Yu W. Maturation and dysgenesis of the human olfactory bulb. *Brain Pathology*, 2016; 26: 301-318.
- Sase K, Kitaoka Y, Tsukahara C, Takagi H. Involvement of Beclin 1 in axonal protection by short term hyperglycemia against TNF induced optic nerve damage. *Mol Med Rep*, 2018; 18: 5455-5460.
- Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism and disease. *Cell*, 2017; 168: 960-976.
- Schmid A, Pyrski M, Biel M, Leinders-Zufall T, Zufall F. Grueneberg ganglion neurons are finely tuned cold sensors. *J Neurosci*, 2010; 30: 7563-7568.
- Schneider SP, Macrides F. Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res Bull*, 1978; 3: 73-82.
- Schoenfeld TA, Marchand JE, Macrides F. Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intra bulbar associational system. *J Comp Neurol*, 1985; 235: 503-518.
- Schofield PW, Moore TM, Gardner A. Traumatic brain injury and olfaction: A systematic review. *Front Neurol*, 2014; 5: 5.
- Schwob JE. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec*, 2002; 269: 33-49.
- Schwob JE. Restoring olfaction: a view from the olfactory epithelium. *Chem Senses*, 2005; 30: i131-i132.
- Science Photo Library Web Sites. Erişim: [https://media.sciencephoto.com/image/c0153276/800wm/C0153276-Smell_receptor_TEM.jpg], Erişim tarihi: 09 Mayıs 2023.
- Scorrano L, De Matteis MA, Emr S, Giordano F, Hajnóczky G, Kornmann B, Lackner LL, Levine TP, Pellegrini L, Reinisch K, Rizzuto R, Simmen T, Stenmark H, Ungermann C, Schuldiner M. Coming together to define membrane contact sites. *Nat Commun*, 2019; 10: 1287.

- Scott JW, McDonald JK, Pemberton JL. Short axon cells of the rat olfactory bulb display NADPH-diaphorase activity, neuropeptide Y-like immunoreactivity and somatostatin-like immunoreactivity. *J Comp Neurol*, 1987; 260: 378-391.
- Segal J. In vivo effect of 3,5,3'-triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: evidence for a physiological role for calcium as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane. *Endocrinology*, 1990; 127: 17-24.
- Senese R, Cioffi F, de Lange P, Goglia F, Lanni A. Thyroid: biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. *J Endocrinol*, 2014; 221: R1-R12.
- Sexton PM, Findlay DM, Martin TJ. Calcitonin. *Curr Med Chem*, 1999; 6: 1067-1093.
- Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108: 4788-4793.
- Shehata M, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, Okhawa N, Inokuchi K. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J Neurosci*, 2012; 32: 10413-10422.
- Shen DN, Zhang LH, Wei EQ, Yang Y. Autophagy in synaptic development, function and pathology. *Neurosci Bull*, 2015; 31: 416-426.
- Shepherd GM, Chen WR, Greer CA. Olfactory bulb. In: Shepherd GM (ed), *The Synaptic Organization of the Brain* (5th ed). Oxford University Press, New York, 2004; p:165-216.
- Shi SH, Jan LY, Jan YN. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*, 2003; 112: 63-75.
- Shih A, Zhang S, Cao HJ, Tang HY, Davis FB, Davis PJ, Lin HY. Disparate effects of thyroid hormone on actions of epidermal growth factor and transforming growth factor- α are mediated by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase II. *Endocrinology*, 2004; 145: 1708-1717.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female fore brain mediated by prolactin. *Science*, 2003; 299: 117-120.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: A double-edged sword. *Science*, 2004; 306: 990-995.
- Shipley MT, Ennis M. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol*, 1996; 30: 123-176.
- Shoyele O, Bacus B, Haddad L, Li Y, Shidham V. Lympho proliferative process with reactive follicular cells in thyroid fine-needle aspiration: A few simple but important diagnostic pearls. *Cytojournal*, 2019; 16: 20.
- Silva CG, Peyre E, Adhikari MH, Tielens S, Tanco S, Van Damme P, Magno L, Krusy N, Agirman G, Magiera MM, Kessaris N, Malgrange B, Andrieux A, Janke C, Nguyen L. Cell-intrinsic control of interneuron migration drives cortical morphogenesis. *Cell*, 2018; 172: 1063-1078.

- Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol*, 2009; 186: 773-782.
- Singer PA, Cooper DS, Levy EG, Ladenson PW, Braverman LE, Daniels G, Greenspan FS, McDougall IR, Nikolai TF. Treatment guidelines for patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. Standards of Care Committee, American Thyroid Association. *JAMA*, 1995; 273: 808-812.
- Singh BK, Yen PM. A clinician's guide to understanding resistance to thyroid hormone due to receptor mutations in the TR α and TR β isoforms. *Clin Diabetes Endocrinol*, 2017; 3: 8.
- Sirakov M, Skah S, Nadjar J, Plateroti M. Thyroid hormone's action on progenitor/stem cell biology: new challenge for a classic hormone? *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1830: 3917-3927.
- Skalecka A, Liszewska E, Bilinski R, Gkogkas C, Khoutorsky A, Malik AR, Sonenberg N, Jaworski J. mTOR kinase is needed for the development and stabilization of dendritic arbors in newly born olfactory bulb neurons. *Dev Neurobiol*, 2016; 76: 1308-1327.
- Slatosky J, Shipton B, Wahba H. Thyroiditis: differential diagnosis and management. *Am Fam Physician*, 2000; 61: 1047-1052.
- Slobodkin MR, Elazar Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem*, 2013; 55:51-64.
- Smithson M, Asban A, Miller J, Chen H. Considerations for thyroidectomy as treatment for Graves disease. *Clin Med Insights: Endocrinol Diabetes*, 2019; 12: 1179551419844523.
- Smitka M, Abolmaali N, Witt M, Gerber JC, Neuhuber W, Buschhueter D, Puschmann S, Hummel T. Olfactory bulb ventricles as a frequent finding in magnetic resonance imaging studies of the olfactory system. *Neuroscience*, 2009; 162: 482-485.
- Sokolov, Aidan Mikkil, "Regulation of Neuron Development by Slc7a5-mTOR-Ulk1" All Dissertations, 2021; 2776.
- Sosulski DL, Bloom ML, Cutforth T, Axel R, Datta SR. Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature*, 2011; 472: 213-216.
- Spotten LE, Corish CA, Lorton CM, Dhuibhir PM, O'Donoghue NC, O'Connor B, Walsh TD. Subjective and objective taste and smell changes in cancer. *Ann Oncol*, 2017; 28: 969-984.
- Sridharan S, Jain K, Basu A. Regulation of autophagy by kinases. *Cancers (Basel)*, 2011; 3: 2630-2654.
- Stadel D, Millarte V, Tillmann KD, Huber J, Tamin-Yecheskel BC, Akutsu M, Demishtein A, Ben-Zeev B, Anikster Y, Perez F, Dötsch V, Elazar Z, Rogov, Farhan H, Behrends C. TECPR2 cooperates with LC3C to regulate COPII-dependent ER export. *Mol Cell*, 2015; 60: 89-104.
- Stagnaro-Green A. Overt hyperthyroidism and hypothyroidism during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*, 2011; 54, 478-487.

- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*, 1996; 271: 611-614.
- Stapleton D, Woollatt E, Mitchelhill KI, Nicholl JK, Fernandez CS, Michell BJ, Witters LA, Power DA, Sutherland GR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett*, 1997; 409: 452-456.
- Stasiolek M. Neurological symptoms and signs in thyroid disease. *Thyroid Res*, 2015; 8: A25.
- Stavoe AK, Hill SE, Hall DH, Colón-Ramos DA. KIF1A/UNC-104 transports ATG-9 to regulate neurodevelopment and autophagy at synapses. *Dev Cell*, 2016; 38: 171-185.
- Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J*, 2000; 345: 437-443.
- Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol*, 2014; 16: 495-501.
- Storan MJ, Key B. Septal organ of Gröneberg is part of the olfactory system. *J Comp Neurol*, 2006; 494: 834-844.
- Sui Y, Horne MK, Stanić D. Reduced proliferation in the adult mouse subventricular zone increases survival of olfactory bulb interneurons. *PLoS One*, 2012; 7: e31549.
- Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105: 19211-19216.
- Sun Y, Wang H, Qu T, Luo J, An P, Ren F, Luo Y, Li Y. mTORC2: a multifaceted regulator of autophagy. *Cell Commun Signal*, 2023; 21: 4.
- Swaney WT, Keverne EB. The evolution of pheromonal communication. *Behav Brain Res*, 2009; 200: 239-247.
- Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta*, 2008; 1784: 116-132.
- Tahmezi L, Gökalp A, Kibar Y, Koçak I, Yalçın O, Özercan Y. Effect of hypothyroidism on the testes in mature rats and treatment with levothyroxine and zinc. *Andrologia*, 2000; 32: 85-89.
- Takacs-Vellai K, Bayci A, Vellai T. Autophagy in neuronal cell loss: A road to death. *Bioessays*, 2006; 28: 1126-1131.
- Takahashi K. Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. *Front Behav Neurosci*, 2014; 8: 72.
- Takahashi K, Tsuji M, Nakagawasai O, Katsuyama S, Hong L, Miyagawa K, Kurokawa K, Mochida-Saito A, Takeda H, Tadano T. Donepezil prevents olfactory dysfunction and α -synuclein aggregation in the olfactory bulb by

- enhancing autophagy in zinc sulfate-treated mice. *Behav Brain Res*, 2023; 438: 114175.
- Takeuchi H, Kurahashi T. Identification of second messenger mediating signal transduction in the olfactory receptor cell. *J Gen Physiol*, 2003; 122:557-567.
- Takizawa T, Yamamoto M, Arishima K, Kusanagi M, Somiya H, Eguchi Y. An electron microscopic study on follicular formation and TSH sensitivity of the fetal rat thyroid gland in organ culture. *J Vet Med Sci*, 1993; 55: 157-160.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy. *Methods Mol Biol*, 2008; 445:77-88.
- Taniguchi K, Arai T, Ogawa K. Fine structure of the septal olfactory organ of Masera and its associated gland in the golden hamster. *J Vet Med Sci*, 1993; 55: 107-16.
- Tee AR, Sampson JR, Pal DK, Bateman JM. The role of mTOR signalling in neurogenesis, insights from tuberous sclerosis complex. *Semin Cell Dev Biol*, 2016; 52: 12-20.
- Tepe B, Hill MC, Pekarek BT, Hunt PJ, Martin TJ, Martin JF, Arenkiel BR. Single-cell RNA-seq of mouse olfactory bulb reveals cellular heterogeneity and activity-dependent molecular census of adult-born neurons. *Cell Rep*, 2018; 25: 2689-2703.
- Terasawa H, Noda Y, Ito T, Hatanaka H, Ichikawa S, Ogura K, Sumimoto H, Inagaki F. Structure and ligand recognition of the PB1 domain: a novel protein module binding to the PC motif. *EMBO J*, 2001; 20: 3947-3956.
- Thomanetz V, Angliker N, Cloëtta D, Lustenberger RM, Schweighauser M, Oliveri F, Suzuki N, Rüegg MA. Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *J Cell Biol*, 2013; 201: 293-308.
- Timiras PS. Thyroid hormone and the developing brain. In: Meisami E, Timiras PS (eds), *Handbook of Human Growth and Developmental Biology*. CRC Press, Boca Raton 1988; p.: 59-82.
- Toida K, Kosaka K, Heizmann CW, Kosaka T. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. *J Comp Neurol*, 1998; 392: 179-198.
- Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, Fraichard A, Jouvenot M. Specific regional distribution of *gec1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res*, 2008; 1210: 103-115.
- Tomer Y, Menconi F. Interferon induced thyroiditis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009; 23: 703-712.
- Tonacci A, Billeci L, Tartarisco G, Ruta L, Muratori F, Pioggia G, Gangemi S. Olfaction in autism spectrum disorders: A systematic review. *Child Neuropsychol*, 2017; 23: 1-25.

- Tong H, Chen GH, Liu RY, Zhou JN. Age-related learning and memory impairment in adult on set hypothyroidism in Kunming mice. *Physiol Behav*, 2007; 91: 290-298.
- Tooze SA. Current views on the source of the autophagosome membrane. *Essays Biochem*, 2013; 55: 29-38.
- Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*, 2007; 100: 328-341.
- Tramontin AD, García-Verdugo JM, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex*, 2003; 13: 580-587.
- Treloar H, Miller A Ray A, Greer C. Development of the olfactory system. In: Menini A (ed), *The Neurobiology of Olfaction*. CRC Press 2009; p.: 131-155.
- Trombley PQ, Shepherd GM. Glycine exerts potent inhibitory actions on mammalian olfactory bulb neurons. *J Neurophysiol*, 1994; 71: 761-767.
- Tufo C, Poopalasundaram S, Dorrego-Rivas A, Ford MC, Graham A, Grubb MS. Development of the mammalian main olfactory bulb. *Development*, 2022; 149: dev200210.
- Turco E, Savova A, Gere F, Ferrari L, Romanov J, Schuschnig M, Martens S. Reconstitution defines the roles of P62, NBR1 and TAX1BP1 in ubiquitin condensate formation and autophagy initiation. *Nat. Commun*, 2021; 12: 5212.
- Turetsky BI, Hahn C-G, Borgmann-Winter K, Moberg PJ. Scents and nonsense: Olfactory dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 2009; 35: 1117-1131.
- Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in Mouse central nervous system. *J Neurochem*, 1999; 72: 1707-1716.
- Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J. Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2008; 68: 264-88.
- Uttenweiler A, Mayer A. Microautophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol*, 2008; 445: 245-59.
- Vahsen BF, Ribas VT, Sundermeyer J, Boecker A, Dambeck V, Lenz C, Shomroni O, Caldi Gomes L, Tatenhorst L, Barski E, Roser AE, Michel U, Urlaub H, Salinas G, Bähr M, Koch JC, Lingor P. Inhibition of the autophagic protein ULK1 attenuates axonal degeneration in vitro and in vivo, enhances translation and modulates splicing. *Cell Death Differ*, 2020; 27: 2810-2827.
- Valverde DP, Yu S, Boggavarapu V, Kumar N, Lees JA, Walz T, Reinisch KM, Melia TJ. ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *J Cell Biol*, 2019; 218: 1787-1798.
- Valvezan AJ, Manning BD. Molecular logic of mTORC1 signalling as a metabolic rheostat. *Nat Metab*, 2019; 1: 321-333.
- Van Den Pol AN, Gorcs T. Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. *J Neurosci*, 1988. 8, 472-492.

- Van Gehuchten A, Martin I. Le bulbe olfactif chez quelques mammifères. *Cellule*, 1891; 7: 205-237.
- Van Pelt LF. Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. *J Am Vet Med Assoc*, 1977; 171: 842-844.
- Varela-Nallar L, Parodi J, Farías GG, Inestrosa NC. Wnt-5a Is a synaptogenic factor with neuroprotective properties against A β toxicity. *Neurodegener Dis*, 2012; 10: 23-26.
- Vázquez P, Arroba AI, Cecconi F, de la Rosa EJ, Boya P, de Pablo F. Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells. *Autophagy*, 2012; 8: 187-199.
- Velayudhan L, Pritchard M, Powell JF, Proitsi P, Lovestone S. Smell identification function as a severity and progression marker in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr*, 2013; 25: 1157-1166.
- Vijayan V, Verstreken P. Autophagy in the presynaptic compartment in health and disease. *J Cell Biol*, 2017; 216: 1895-1906.
- Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Vallès J, García-Fojeda B, Criado-García O, Fernández-Sánchez E, Medraño-Fernández I, Domínguez J, García-Rocha M, Soriano E, Rodríguez de Córdoba S, Guinovart JJ. Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat Neurosci*, 2007; 10: 1407-1413.
- Wakatsuki S, Tokunaga S, Shibata M, Araki T. GSK3B-mediated phosphorylation of MCL1 regulates axonal autophagy to promote Wallerian degeneration. *J Cell Biol*, 2017; 216: 477-493.
- Walczak M, Pruszeicz A, Łacka K, Karlik M. Olfaction konjenital hipotiroidizm. *Otolaryngol Pol*, 2002; 56: 577-581.
- Walker SA, Ktistakis NT. Autophagosome biogenesis machinery. *J Mol Biol*, 2019; 432: 2449-2461.
- Wallot-Hieke N, Verma N, Schlütermann D, Berleth N, Deitersen J, Böhrer P, Stuhldreier F, Wu W, Seggewiß S, Peter C, Gohlke H, Mizushima N, Stork B. Systematic analysis of ATG13 domain requirements for autophagy induction. *Autophagy*, 2018; 14: 743-763.
- Walter FB, Boulpaep EL. Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach, Chapter 48, "Synthesis of Thyroid Hormones" in: Elsevier/Saunders; BSCS Biology: A Human Approach, 2nd edition. 2003; 1-300.
- Wang B. Dissecting the physiological roles of ULK1/2 in the mouse brain. Theses and Dissertations (ETD). University of Tennessee Health Science Center, Tennessee 2016; p.: 1-73.
- Wang B, Iyengar R, Li-Harms X, Joo JH, Wright C, Lavado A, Horner L, Yang M, Guan JL, Frase S, Green DR, Cao X, Kundu M. The autophagy-inducing kinases, ULK1 and ULK2, regulate axon guidance in the developing mouse forebrain via a noncanonical pathway. *Autophagy*, 2018; 14: 796-811.

- Wang C, Liang CC, Bian ZC, Zhu Y, Guan JL. FIP200 is required for maintenance and differentiation of postnatal neural stem cells. *Nat Neurosci*, 2013; 16: 532-42.
- Wang CR, Chen S, Yeo S, Karsli-Uzunbas G, White E, Mizushima N, Virgin HW, Guan JL. Elevated p62/SQSTM1 determines the fate of autophagy-deficient neural stem cells by increasing superoxide. *J Cell Biol*, 2016; 212: 545-60.
- Wang L, Xu XB, You WW, Lin XX, Li CT, Qian HR, Zhang LH, Yang Y. The cytoplasmic nuclear shuttling of Beclin 1 in neurons with Alzheimer's disease-like injury. *Neurosci Lett*, 2017; 661: 63-70.
- Wang QJ, Ding Y, Kohtz DS, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, Chait BT, Zhong Y, Heintz N, Yue Z. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci*, 2006; 26: 8057-8068.
- Wang YC, Lauwers E, Verstreken P. Presynaptic protein homeostasis and neuronal function. *Curr Opin Genet Dev*, 2017; 44: 38-46.
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*, 2010; 29: 1792-1802.
- Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem*, 2011; 80: 125-56.
- Weiler E, Farbman AI. Supporting cell proliferation in the olfactory epithelium decreases postnatally. *Glia*, 1998; 22: 315-328.
- Weiler E, Farbman AI. The septal organ of the rat during postnatal development. *Chem Senses*, 2003; 28: 581-593.
- Weisova P, Concannon CG, Devocelle M, Prehn JH, Ward MW. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *J Neurosci*, 2009; 29: 2997-3008.
- Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, 2000; 287: 1442-1446.
- Whitman MC, Greer CA. Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Dev Neurobiol*, 2007a; 67: 1079-1093.
- Whitman MC, Greer CA. Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *J Neurosci*, 2007b; 27: 9951-9961.
- Whitman MC, Greer CA. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol*, 2009; 89: 162-175.
- Wild P, McEwan DG, Dikic I. The LC3 interactome at a glance. *J Cell Sci*, 2014; 127: 3-9.
- Wilkinson DS, Jariwala JS, Anderson E, Mitra K, Meisenhelder J, Chang JT, Ideker T, Hunter T, Nizet V, Dillin A, Hansen M. Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy. *Mol Cell*, 2015; 57: 55-68.

- Wille M, Schumann A, Kreutzer M, Glocker MO, Wree A, Mutzbauer G, Schmitt O. The proteome profiles of the olfactory bulb of juvenile, adult and aged rats an ontogenetic study. *Proteome Sci*, 2015; 13: 8.
- Williams A, Jahreiss L, Sarkar S, Saiki S, Menzies FM, Ravikumar B, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications. *Curr Top Dev Biol*, 2006; 76: 89-101.
- Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol*, 2000; 20: 8329-8342.
- Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol*, 2008; 20: 784-794.
- Williams T, Courchet J, Viollet B, Brenman JE, Polleux F. AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis during metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108: 5849-5854.
- Willoughby KA, McAndrews MP, Rovet JF. Accuracy of episodic autobiographical memory in children with early thyroid hormone deficiency using a staged event. *Dev Cogn Neurosci*, 2014a; 9: 1-11.
- Willoughby KA, McAndrews MP, Rovet JF. Effects of maternal hypothyroidism on offspring hippocampus and memory. *Thyroid*, 2014b; 24: 576-584.
- Wilson RI, Mainen ZF. Early events in olfactory processing. *Annu Rev Neurosci*, 2006; 29: 163-201.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci*, 2002; 16: 1681-1689.
- Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res*, 2012; 22: 43-61.
- Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation-the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol*, 2013; 23: 301-309.
- Wong R, Vasilyev VV, Ting YT, Kutler DI, Willingham MC, Weintraub BD, Cheng S. Transgenic mice bearing a human mutant thyroid hormone beta 1 receptor manifest thyroid function anomalies, weight reduction and hyperactivity. *Mol Med*, 1997; 3: 303-314.
- Wong R, Ghosh A. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. *Nat Rev Neurosci*, 2002; 3: 803-812.
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*, 2003; 13: 2004-2008.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2005; 2: 21-33.

- Wooten MW, Geetha T, Seibenhener ML, Babu JR, Diaz-Meco MT, Moscat, J. The P62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-Kb activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem*, 2005; 280: 35625-35629.
- Wooten MW, Hu X, Babu JR, Seibenhener ML, Geetha T, Paine MG, Wooten MC. Signaling, polyubiquitination, trafficking and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease. *J Biomed Biotechnol*, 2006; 2006: 62079.
- Wrobel BB, Leopold DA. Clinical assessment of patients with smell and taste disorders. *Otolaryngol Clin North Am*, 2004; 37: 1127-1142.
- Wrutniak C, Rochard P, Casas F, Frayssé A, Charrier J, Cabello G. Physiological importance of the T3 mitochondrial pathway. *Ann NY Acad Sci*, 1998; 839: 93-100.
- Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2001; 26: 67-77.
- Wu H, Chen S, Ammar AB, Xu J, Wu Q, Pan K, Zhang J, Hong Y. Crosstalk between macroautophagy and chaperone-mediated autophagy: implications for the treatment of neurological diseases. *Mol Neurobiol*, 2015; 52: 1284-1296.
- Wu X, Fleming A, Ricketts T, Pavel M, Virgin H, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis. *Nat Commun*, 2015; 7: 10533.
- Xi Y, Dhaliwal JS, Ceizar M, Vaculik M, Kumar KL, Lagace DC. Knockout of Atg5 delays the maturation and reduces the survival of adult-generated neurons in the hippocampus. *Cell Death Dis*, 2016; 7: e2127.
- Xiao W, Sun Z, Yan X, Gao X, Lv Q, Wei Y. Differences in olfactory habituation between orthonasal and retronasal pathways. *J Physiol Sci*, 2001; 71: 36.
- Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, Zhang P, Gong R, Zhao S. Cloning, expression patterns and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein. *Genomics*, 2001; 74: 408-413.
- Yamagishi M, Nakamura H, Nakano Y, Kuwano R. Immunohistochemical study of the fourth cell type in the olfactory epithelium in guinea pigs and in a patient. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 1992; 54: 85-90.
- Yamaguchi M, Mori K. Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult Mouse olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102: 9697-9702.
- Yamamoto A, Yue Z. Autophagy and its normal and pathogenic states in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 2014; 37: 55-78.
- Yan Z, Tan J, Qin C, Lu Y, Ding C, Luo M. Precise circuitry links bilaterally symmetric olfactory maps. *Neuron*, 2008; 58: 613-624.
- Yang AJT, Mohammad A, Tsiani E, Necakov A, MacPherson REK. Chronic AMPK Activation Reduces the Expression and Alters Distribution of Synaptic Proteins in Neuronal SH-SY5Y Cells. *Cells*, 2022; 11: 2354.

- Yang J, Yi N, Zhang J, He W, He D, Wu E, Xu S, Li F, Fan G, Zhu X, Xue Z, Zhou W. Generation and characterization of a hypothyroidism rat model with truncated thyroid stimulating hormone receptor. *Sci Rep*, 2018; 8: 4004.
- Yang Y, Coleman M, Zhang L, Zheng X, Yue Z. Autophagy in axonal and dendritic degeneration. *Trends Neurosci*, 2013; 36: 418-28.
- Yang Z. Postnatal subventricular zone progenitors give rise not only to granular and periglomerular interneurons but also to interneurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 2008; 506: 347-358.
- Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 2010; 22: 124-31.
- Yazdankhah M, Farioli-Vecchioli S, Tonchev AB, Stoykova A, Cecconi F. The autophagy regulators Ambra1 and Beclin 1 are required for adult neurogenesis in the brain subventricular zone. *Cell Death Dis*, 2014; 5: e1403.
- Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*, 2001; 81: 1097-1142.
- Yim WWY, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov*, 2020; 6: 6.
- Yu SW, Baek SH, Brennan RT, Bradley CJ, Park SK, Lee YS, Jun EJ, Lookingland KJ, Kim EK, Lee H, Goudreau JL, Kim SW. Autophagic death of adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal. *Stem Cells*, 2008; 26: 2602-10.
- Zabel M. Ultra structural localization of calcitonin, somatostatin and serotonin in parafollicular cells of rat thyroid. *Histochem J*, 1984; 16: 1265-1272.
- Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol*, 2002; 160: 255-263.
- Zavodszky, E., Vicinanza, M. & Rubinsztein, D. C. Biology and trafficking of ATG9 and ATG16L1, two proteins that regulate autophagosome formation. *FEBS letters*, 2013; 587: 1988-1996.
- Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bösl MR, Fritschy JM. Glycinergic neurons express enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol*, 2005; 482: 123-141.
- Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci*, 2006; 119: 259-270.
- Zeppilli S, Ackels T, Attey R, Klimpert N, Ritola KD, Boeing S, Crombach A, Schaefer AT, Fleischmann A. Molecular characterization of projection neuron subtypes in the mouse olfactory bulb. *Elife*, 2021; 10: e65445.
- Zhang L, Blomgren K, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM. Effects of postnatal thyroid hormone deficiency on neurogenesis in the juvenile and adult rat. *Neurobiol Dis*, 2009; 34: 366-374.

- Zhang L, Huang T, Bordey A. Tsc1 haploinsufficiency is sufficient to increase dendritic patterning and Filamin A levels. *Neurosci Lett*, 2016; 629: 15-18.
- Zhao J, Miyamoto S, You YH, Sharma K. AMP-activated protein kinase (AMPK) activation inhibits nuclear translocation of Smad4 in mesangial cells and diabetic kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015; 308: F1167-F1177.
- Zheng X, Liang Y, He Q, Yao R, Bao W, Bao L, Wang Z. Current models of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation by growth factors and amino acids. *Int J Mol Cell Med*, 2014; 15: 20753-69.
- Zhou J, Shrikhande G, Xu J, McKay RM, Burns DK, Johnson JE, Parada LF. Tsc1 mutant neural stem/progenitor cells exhibit migration deficits and give rise to subependymal lesions in the lateral ventricle. *Genes Dev*, 2011; 25: 1595-600.
- Zhou X, Babu JR, da Silva S, Shu Q, Graef IA, Oliver T, Tomoda T, Tani T, Wooten MW, Wang F. Unc-51-like kinase 1/2-mediated endocytic processes regulate filopodia extension and branching of sensory axons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104: 5842-5847.
- Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep*, 2015; 35: e00199.
- Zoeller RT, Rovet J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol*, 2004; 16: 809-818.

KONU İLE İLGİLİ ÖĞRENCİ VE DANIŞMANA AİT YAYINLAR:

- Artis AS, Bitiktas S, Taskin E, Dolu N, Liman N, Süer C. experimental hypothyroidism delays field excitatory post-synaptic potentials and disrupts hippocampal long-term potentiation in the dentate gyrus of hippocampal formation and Y-Maze performance in adult rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 2012; 24: 422-433.
- Bitiktaş S, Tan B, Kandemir B, Kavraal Ş, Liman N, Dönmez-Altuntaş H, Aksan-Kurnaz I, Süer C. Possible involvement of shifting NR2B subunit to NR2A subunit in impaired hippocampal function induced by 21-day thyroxine treatment. *European Neuropsychopharmacology*, 2014; 24: S193.
- Bitiktaş S, Kandemir B, Tan B, Kavraal Ş, Liman N, Dursun N, Dönmez-Altuntaş H, Aksan-Kurnaz I, Süer C. Adult-onset hyperthyroidism impairs spatial learning: possible involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Neuroreport*, 2016; 27: 802-808.
- Liman BC, Liman N, Tekeli MY, Ergen E, Kavraal UK. Investigations on tissue lipid peroxidation, glutathione and antioxidant enzyme levels in the hippocampus of adult rats in experimental Hypo- and Hyperthyroidism induced by Propyl Thiouracil (Ptu) and L-Thyroxine. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi (BSBD)*, 2022; 11; 22-28.
- Liman N. Endokrin sistem. Kitap: Özer A (yazar), Veteriner Özel Histoloji 2. baskı, Bölüm 4. Nobel Yayın, Ankara 2016; s.: 67-115.

Liman N. Duyu sistemi. Kitap: Özer A (yazar), Veteriner Özel Histoloji 2. baskı, Bölüm 13. Nobel Yayın, Ankara 2016; s.: 269-324.

Liman N, Suna DC. Hücre koruyucu bir mekanizma: Otofaji. ERÜ Sağlık Bilimleri Dergisi. 2017; 26: 275-281.

Taskın E, Artıs AS, Bitiktas S, Dolu N, Liman N, Süer C. Experimentally induced hyperthyroidism disrupts hippocampal long-term potentiation in adult rats. Neuroendocrinology, 2011; 94: 218-227.





T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 28.08.2019

Toplantı Sayısı: 08

Karar No:19/148

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 28.08.2019 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Dış Hekimliği Fakültesi	
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Dr.Öğr.Üyesi	Veteriner Fakültesi	
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK	Dr.Öğr.Üyesi	Eczacılık Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Özge AL	Arş. Gör. Dr.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)	
Eray AKTUĞ	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAM	
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye	
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.'dan Prof. Dr. Narin LİMAN tarafından sunulan "Deneysel Hipotiroidizm Oluşturulan Erişkin Sıçanların Hipokampusunda Otofajinin Araştırılması" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 28.08.2019

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYЕК)



07.12.2023

Sayı : 23/266
Konu : 23/266

Sayın Prof. Dr. Narin LİMAN

Erc. Üniv. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, "**Deneyisel Hipotiroidizm Oluşturulan Erişkin Sıçanların Hipokampusünde Otofajinin Araştırılması**" başlıklı 19/148 karar numaralı Duygu Cemre SUNAYA tez konusu olarak verilen projede; yapılan literatür taramalarında olfaktör bulbusa ilişkin çalışmalarda koku testinin yapılmasının çalışma için bir zorunluluk olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu verilerin çalışmanın bilimsel içeriğini zengileştirmede önemli rol oynayacağı aşikar olup başlangıçta tez çalışmasına dahil edilmesi planlanmayan bu deneyin çalışmaya dahil edilebilmesi hususundaki 23/266 sayılı dilekçeniz 06.12.2023 tarihinde görüşülmüş uygunluğuna, oybirliği ile karar vermiştir.

Gereğini bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. Ayşe EKEN
HADYЕК Başkan Yard.

HİPOTİROİDİ OLUŞTURULMUŞ SIÇAN MODELİNDE BULBUS OLFATORYUS'DA OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 3	% 3	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.jove.com İnternet Kaynağı	% 1
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	academic.oup.com İnternet Kaynağı	<% 1
4	2dc40e33-085f-40e0-8172-9a1f898c1942.filesusr.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	Bonomo, F.. "Exploring the complexity boundary between coloring and list-coloring", Electronic Notes in Discrete Mathematics, 20060801 Yayın	<% 1
6	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	docs.wixstatic.com İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİMLİK BİLGİLERİ VE İLETİŞİM

Adı Soyadı : Duygu Cemre SUNA

Uyruğu : Türkiye (TC)

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece Tarihi	Kurum	Mezuniyet
Doktora	E. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	E.Ü. Fen Bilimler Enstitüsü -	2014
Lisans	Erciyes Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Kayseri Sümer Ahmet Eren Lisesi	2005

MESLEKİ DENEYİM

Çalıştığı Kurum	Tarih
Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü	12.2013- Devam ediyor
Diyarbakır Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü	11.2012- 11.2013
İstanbul Pendik Veteriner Enstitüsü Müdürlüğü	03.2011- 11.2012

YAPTIĞI TEZLER

Bazı Pırazol-3- Karboksilli Asit Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri Ve Dna İle Etkileşimlerinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik . Yüksek Lisans Tezi. 2014. Proje No: FBY-10-3329.

SCI, SSCI VE AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

KÖPRÜ S, Kup FO, Sabancı N, ÇADIR M, Bulut DC, DUMAN F, et al. DNA Cleavage Properties, Antimicrobial and Cytotoxic Activity and 4D-QSAR Analysis of Some Pyrazole Derivatives. LETTERS IN DRUG DESIGN & DISCOVERY. 2019; 16: ss.904-918. DOI: [10.2174/1570180815666180926104319](https://doi.org/10.2174/1570180815666180926104319).

DİĞER DERGİ YAYINLAR

Liman N, Suna DC. Hücre Koruyucu bir mekanizma:Otofaji. Sağlık Bilimleri Dergisi. 2017; ss.275-281.

KATILDIĞI KONGRELER

Posterli katılım. 21. Ulusal Biyoloji KongresiEge Üniversitesi, İzmir, Türkiye, 03-07 Eylül 2012, ss1342.

<http://www.ubk2012.ege.edu.tr>

KURS ve SERTİFİKA

Kimyasal Analizlerde Metod Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Eğitimi. Orta Anadolu Kalkınma Ajansı. 16-19 Nisan 2019. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü toplantı salonu.

TS EN ISO/IEC 17025:2017 Eğitimi. Orta Anadolu Kalkınma Ajansı. 8-9 Nisan2019, 11-12 Nisan 2019. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü toplantı salonu. Eğitimci Zeliha YILDIRIM.

İç tetkik Eğitimi. Orta Anadolu Kalkınma Ajansı. 10 Nisan2019. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü toplantı salonu. Eğitimci Gülay YILDIRIM.

Mikrobiyolojik Analizlerde Validasyon ve Ölçüm Belirsizliği Eğitimi. Orta Anadolu Kalkınma Ajansı. 25-28 Mart 2019. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü toplantı salonu. Eğitimci Zeliha YILDIRIM.

Metot Validasyon ve Ölçüm Belirsizliği. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. 01-02 Kasım 2018. Eğitimci Zeliha YILDIRIM.

HPLC Prominence-1 Kullanıcı Eğitimi. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. 17-18 Kasım 2016.

Deney Hayvanları ve Kullanım Sertifikası (2016-2017 Bahar Yarıyılı).

Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği .Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. 11-13 Temmuz 2016. Eğitimci İbrahim AKDAĞ.

Mikrobiyolojik Analizlerde Validasyon ve Ölçüm Belirsizliği. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. 14 Temmuz 2016. Eğitimci İbrahim AKDAĞ.

TS EN ISI/IEC 17025 İç Denetçi Eğitimi. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. 30.04.2014

Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. 19 Mart 2014.

Et ve Et Ürünlerinde Yabancı Dokuların Tespitine Yönelik Analiz Eğitimi. Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. 13-21.01.2014.

Başarı Belgesi. Diyarbakır Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü. 2013.

Mikrobiyolojik Testlerde Metot Validasyonu ve Ölçüm Belirsizliği Eğitimi. Diyarbakır Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü toplantısalonu. 21.03.2013

Ölçüm Belirsizliği Eğitimi. Diyarbakır Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü toplantı salonu. 20-21.03.2013

Metot Validasyonu Eğitimi. Diyarbakır Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü toplantı salonu. 18-19.03.2013

Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR). İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü. 27-29.03.2012.

BSE,IBR,EBL,BVDV, BTV ELISA Eğitimi. İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü. 26-28.09.2011.

İngilizce Hazırlık Eğitimi. Kayseri Sümer Lisesi. 10.09.2001-14.06.2002.

YABANCI DİL

İngilizce, Orta derece

BİLGİSAYAR PROGRAMLARI

Office word, Office Excel, Office Power point Programları.

