

**HEXOSAMİNİDASE A VE SİALİDAZ ENZİM EKSİKLİĞİ BULUNAN
FARE BEYİNLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL, BİYOKİMYASAL
VE MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER İLE ANALİZİ**

Proje No: 113S489

Prof. Dr. Volkan Seyrantepe

Mart 2015

İZMİR

ÖNSÖZ

Tay-Sachs hastalığı insan 15. Kromozomunda bulunan HexA genindeki mutasyonların sebep olduğu ve β -Hekzosaminidaz A enzim eksikliği sonucu ortaya çıkan ölümcül bir lizozomal depo hastalığıdır. Otozomal çekinik olarak kalıtılan ve bir çocukluk çağı hastalığı olan Tay-Sachs'ın patolojisini daha iyi anlamak ve uygun ilaç tedavi yöntemleri geliştirmek amacı ile β -Hekzosaminidaz A eksikliği olan fare modeli (HexA^{-/-}) yaratılmış fakat insandaki lizozomal depo hastalığı bulguları bu farelerde gözlenmemiştir. Bunun sonucunda insan ile fare arasında GM2 glikolipidlerin yıkım yollarının farklı olduğu, farede bir ya da daha fazla sialidaz enziminin yer aldığı bir bypass mekanizmasının varlığı ileri sürülmüştür (SANGO, 1995). Haziran 2012'de sonuçlandırılan hızlı destek projemizde bu hipotezi test etmek amacı ile β -Hekzosaminidaz A ve sialidaz Neu4 eksikliği olan farelerin (HexA^{-/-}, Neu4^{-/-}) yanı sıra β -Hekzosaminidaz A ile birlikte iki sialidaz (Neu1 ve Neu4) enzim eksikliği olan farelerin (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}) beyin gangliosid düzeyleri ince tabaka kromatografisi analiz edilmiş ve 9 aylık farelerin beyin dokusunda gangliosid GM2 yanı sıra diğer gangliosid miktarlarında da farklılıklar görülmüştür. Bu proje kapsamında ise sialidaz enzimlerinin farelerde gangliosid yıkım yolağındaki rolünü daha iyi anlamak için 3, 6 ve 9 aylık fare beyinleri immunohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler kullanarak analiz edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

<u>Konu</u>	<u>Sayfa No</u>
Özet	VI
Abstract	VII
Bölüm 1. Giriş	1
Bölüm 2. Gereç ve Yöntem	3
Bölüm 3. Sonuçlar	10
Bölüm 4. Tartışma	19
Kaynakça	26

ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

<u>Şekil / Tablo</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1: 3 aylık fare beyinlerinde GM2 gangliosidinin birikimi.	10
Şekil 3.2: 6 aylık fare beyinlerinde GM2 gangliosidinin birikimi.	11
Şekil 3.3: 9 aylık fare beyinlerinde GM2 gangliosidinin birikimi.	11
Şekil 3.4: 3 aylık fare beyinlerinde Sialidaz (A), β -Galaktozidaz (B), β -Glukozidaz (C), α -L-Iduronidaz (D) ve β -Hekzosaminidaz (E) enzim aktivite ölçümleri	13
Şekil 3.5: 6 aylık fare beyinlerinde Sialidaz (A), β -Galaktozidaz (B), β -Glukozidaz (C), α -L-Iduronidaz (D) ve β -Hekzosaminidaz (E) enzim aktivite ölçümleri	14
Şekil 3.6: 9 aylık fare beyinlerinde Sialidaz (A), β -Galaktozidaz (B), β -Glukozidaz (C), α -L-Iduronidaz (D) ve β -Hekzosaminidaz (E) enzim aktivite ölçümleri	15
Şekil 3.7: 3 ve 6 aylık fare beyinlerinden izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar ile yapılan β -aktin kontrol PCR ürünleri	16
Şekil 3.8: Sialidaz Neu1, Neu2, Neu3, Neu4 ve HexB genleri ile internal kontrol olan GAPDH geninin PCR ürünleri	17
Şekil 3.9: Real-time PCR ile çoğaltılan örneklerin erime eğrisi analizi sonucu	17
Şekil 3.10: 3 ve 6 fare beyinlerinde β -Hekzosaminidaz B, Sialidaz Neu1, Neu2, Neu3 ve Neu4 genlerinin ifadeleri	18
Tablo2.1: Aktiviteleri ölçülen enzimler ve kullanılan substratlar	5

Tablo2.2: Enzim aktivite ölçümü için hazırlanan reaksiyonların içerikleri **5**

Tablo2.3: Gen ifadesinde kullanılan primerler **8**

ÖZET

HEXOSAMİNİDASE A VE SİALİDAZ ENZİM EKSİKLİĞİ BULUNAN FARE BEYİNLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLER İLE ANALİZİ

Tay-Sachs hastalığı ölümcül bir lizozomal depo hastalığıdır. Bu hastalıkta gangliosid GM2 adlı glikosifingolipid β -Hekzosaminidaz A eksikliği sonucu yıkılamayarak lizozomlarda birikmekte ve özellikle sinir hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Tay-Sachs hastalığının fare modeli (*HexA^{-/-}*) uzun yıllar önce yaratılmış fakat farelerde bu hastalığın bulguları gözlenmemiştir. İnsan ile fare arasında gangliosidlerin yıkım yollarının farklı olduğu ve bu nedenle Tay-Sachs farelerinde β -Hekzosaminidaz A enzim eksikliği olmasına rağmen bir 'bypass' mekanizması ile gangliosid GM2'nin yıkıldığı düşünülmektedir (SANGO, 1995). Memelilerde tanımlanan 4 farklı sialidaz (Neu1, Neu2, Neu3 ve Neu4) enziminin ise bu 'bypass' ta rol alabileceği ileri sürülmektedir. Haziran 2012'de sonuçlandırılan hızlı destek projemizde bu hipotezi test etmek amacı ile β -Hekzosaminidaz A ve sialidaz Neu4 eksikliği olan farelerin (*HexA^{-/-}, Neu4^{-/-}*) yanı sıra β -Hekzosaminidaz A ile birlikte iki sialidaz (Neu1 ve Neu4) enzim eksikliği olan farelerin (*HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}*) beyin gangliosid düzeyleri ince tabaka kromatografisi çalışılmıştır ve 9 aylık farelerde beyin dokusunda gangliosid GM2 yanı sıra diğer gangliosid miktarlarında da farklılıklar görülmüştür. Bu projenin amacı ise 3,6 ve 9 aylık fare beyinlerinin immunohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler kullanarak analiz etmektir. Böylece sialidaz enzimlerinin farelerde gangliosid yıkım yolağındaki rolünü daha iyi anlamak mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Tay-Sachs, Fare Modeli, Sialidaz, Lizozom

ABSTRACT

IMMUNOHISTOCHEMICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL ANALYSIS OF MOUSE BRAIN TISSUES WITH THE DEFICIENCY OF B-HEXOSAMINIDASE A AND SIALIDASES

Tay-Sachs disease is one of the lethal lysosomal storage disorders. In Tay-Sachs disease β -hexosaminase A deficiency causes the accumulation of sphingolipid GM2 ganglioside and neural death. Tay-Sachs disease mouse model ($HexA^{-/-}$) was generated long time ago but disease phenotype was not observed. It has been speculated that in human and mouse gangliosid degradation pathways are different and there is metabolic bypass mechanisms where ganglioside GM2 is degraded although there is β -hexosaminase A deficiency in mouse (SANGO, 1995). It is suggested that mammalian sialidases (Neu1, Neu2, Neu3 and Neu4) are involved in that bypass mechanisms. To test this hypothesis we analyzed brain ganglioside levels from double knockout mouse model with combined β -hexosaminase A and Neu4 sialidase ($HexA^{-/-}, Neu4^{-/-}$) as well as triply knockout model with β -hexosaminase A, Neu4 sialidase and Neu1 sialidase ($HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}$) by thin layer chromatography in our previously supported project. We observed that not only gangliosid GM2 level but also other gangliosid levels elevated especially in 9 months old mice brain studied. The aim of our proposed project is to perform further immunohistochemical, biochemical and molecular biological analysis of brain tissues from 3, 6 and 9 months old mice with β -hexosaminase A and sialidases deficiencies and understand better the role of sialidases in ganglioside degradation pathway.

Key Words: Tay-Sachs, Mouse Model, Sialidase, Lysosome

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tay-Sachs hastalığı GM2 gangliosidosis olarak bilinen lizozomal depo hastalığıdır. Sandhoff hastalığı ise bir diğer GM2 gangliosidosis hastalığı olup klinik olarak Tay-Sachs hastalığı ile çok benzerdir. Sandhoff hastalığı daha şiddetli seyir eden bir hastalık olmasının yanı sıra her iki hastalıkta kas zayıflığı, körlük, nörodejenerasyon ve epilepsi krizleri görülür ve hastalar genellikle 2-4 yaş arasında ölmektedir. Bu iki GM2 gangliosidosis HEXA ve HEXB genlerindeki mutasyonların β -Hekzosaminidaz A enzimi eksikliğine bağlı olarak GM2 gangliosidinin yıkılmıyarak lizozomlarda birikmesi sonucu ortaya çıkar ve tedavisi henüz mümkün değildir. Özellikle sinir hücrelerinde bulunan lizozomlarda GM2 birikimi nöronların ölümüne neden olmaktadır. β -Hekzosaminidaz A ve B genlerini fare embriyonik kök hücrelerde hasara uğratarak fare modeli yapılmıştır. Sandhoff farelerinde ($HexB^{-/-}$) erken dönemde (3 aylık) şiddetli klinik bulgular gözlenirken Tay-Sachs farelerinde ($HexA^{-/-}$) nörolojik anomaliler 12. aya kadar gözlenmemiştir. Bu nedenle insan ile fare arasında glikolipidlerin yıkım yollarının farklı olduğu, $HexA^{-/-}$ farelerinde bir ya da daha fazla sialidaz enziminin yer aldığı bir bypass mekanizması ile GM2'nin yıkılarak çok yavaş biriktiği ve bu nedenle farede hastalık bulgularının çok ileri dönemde ortaya çıkabildiği ileri sürülmüştür (SANGO, 1995).

Sialidaz Neu4 lizozomda lokalize olmuş bir enzimdir ve *in vitro* şartlarda GM2 gibi gangliosidlere karşı aktivitesi olduğu gösterilmiştir (SEYRANTEPE, 2004). $Neu4^{-/-}$ farelerinin beyinlerinde ise anormal gangliosid içeriği (artan GD1a ve azalan GM1 gangliosid oranı) ince tabaka kromatografisi analizi ile daha önce gösterilmiştir (SEYRANTEPE, 2008). β -Hekzosaminidaz A ve sialidaz Neu4 genleri hasara uğratılmış fareler ($HexA^{-/-}Neu4^{-/-}$) yarılmış ve bu farelerin %40'unda GM2 birikimindeki artışla orantılı epilepsi krizleri gözlenmiştir. Sadece β -Hekzosaminidaz A ve sadece Neu4 eksikliği olan farelerde ise bu tür semptomlara rastlanmamıştır. Ayrıca $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}$ farelerin beyin korteks ve hipokampus nöronlarında GM2 gangliosit birikimi gözlenmiştir (SEYRANTEPE, 2010). Bu sonuçlar sialidaz Neu4'ün Tay-Sachs fare modelinde modülatör bir gen olduğu, metabolik bypass ile farelerdeki hastalık bulgularını azalttığını ileri sürülmüştür. $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}$ farelerinin sadece %40'unda hastalık bulgularının gözlenmesi sialidaz Neu4'un $HexA^{-/-}$ farede görülen metabolik bypassa rol alan tek sialidaz olmadığını diğer sialidazlarında rollerinin olabileceğini düşündürmüştür (SEYRANTEPE, 2010).

Daha önce yaratılan ve üçlü enzim eksikliği olan farelerin (HexA^{-/-} Neu4^{-/-} Neu1^{-/-}) beyin glikolipid profillerinin tekli (HexA^{-/-} ve Neu4^{-/-}) ve çiftli (HexA^{-/-} Neu4^{-/-}) enzim eksikliği olan farelerle karşılaştırılması 2012 yılında desteklenen 1002 projemiz kapsamında yapılmıştır (Proje No: 111S018). Bu üçlü fare modelinde sialidaz Neu4 ve β-Heksozamidaz A enzimlerinin aktiviteleri %0 iken, sialidaz Neu1'in yaklaşık %8-10 enzim aktivitesi vardır (SEYRANTEPE, 2010). Bu projedeki amacımız üçlü enzim eksikliği olan farelerin (HexA^{-/-} Neu4^{-/-} Neu1^{-/-}) beyinlerinin immunohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler kullanarak daha ayrıntılı analiz etmek ve sialidaz Neu4 ve Neu1'in birlikte yıkım yolağındaki rolünü anlamaktır.

BÖLÜM 2

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, TÜBİTAK SBAG tarafından daha önce desteklenen “ β -hekzosaminidaz A ve sialidaz enzim eksikliği olan farelerde beyin lipid profilinin çıkarılması” adlı 111S018 numaralı 1002 hızlı destek projesi süresince çiftleştirilerek elde edilmiş farklı enzim eksiklikleri olan fareler kullanılmıştır. Bu fareler tekrar çiftleştirmeye konulmuş ve 3, 6 ve 9 aylık olduklarında çalışmaya alınmıştır. İmmünohistokimya analizleri için fiksasyon, enzim aktivite ölçümleri ve ekspresyon analizleri için taze beyin dokularının alınması işlemleri farelerin proje süresince barındırıldığı Ankara’da bulunan Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarında yapılmıştır. Fare ile ilgili ön işlemler Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarında tamamlandıktan sonra alınan dokulardan enzim aktivite ölçümleri, ekspresyon analizleri ve fiske edilen beyin dokularından kesitlerin alınması ile GM2 gangliosidi ile immunohistokimya çalışmaları Prof. Dr. Volkan Seyrantepe’nin İYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda her deneysel analiz için 3, 6 ve 9 aylık yaş grupları oluşturulmuş ve her fare grubundan 3’er adet analiz edilerek istatistiksel anlam elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızda kullanılan fare gruplarının genotipleri şu şekildedir;

1. Grup; Normal (Wildtype – WT)
2. Grup; HexA^{-/-}
3. Grup; Neu4^{-/-}
4. Grup; HexA^{-/-}Neu4^{-/-}
5. Grup; HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}

2.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER

İmmünohistokimyasal analizler için fareler paraformaldehit ile katılaştırılmıştır (fiksasyon). Bu amaçla kalpten perfüzyon metodu kullanılmış ve beyin örnekleri fiske edilmiştir. Öncelikle anestetik ile uyuşturulan farelerin göğüs kafesleri açılarak enjektör iğnesi yardımı ile %0,9 NaCl solüsyonunu kalp ve dolaşım sistemi aracılığı ile tüm dokulara ulaştırılmıştır. Tüm organlardan kan dokusu temizlenmesi sonrasında taze hazırlanan %4 paraformaldehit dolaşım sistemi aracılığı ile organların katılaştırılması için kalpten tatbik edilmiştir. Katılama işlemi sonucu beyin çıkartılmış, bir gece %4 paraformaldehitte bekletildikten sonra dokuda kalan suyun uzaklaştırılması için süroz gradientine tabi tutulmuştur. 2’şer saat %10 ve %20 sürozda bekletildikten sonra bir gece %30’luk sürozda tutulmuş ve sonrasında ince kesitler alabilmek amacı ile OCT içeren bloklar içine gömülmüş

ve -80°C'de saklanmıştır. Projemizde TUBITAK tarafından desteklenen “Lizozomal Katepsin A Enziminin Vazoaktif Peptid Biyolojisindeki Rolü” başlıklı 1001 projesi kapsamında makine-teçhizat kaleminden alınan Leica Cryostat (CM1850-UV) cihazı kullanılarak, organlar -20°C sıcaklıkta 10-12 mikron kalınlığında kesilmiş ve alınan kesitler poli-lizin kaplı lamalar (slayt) üzerine aktarılmıştır. Analiz yapılacağı zaman slaytlar -80°C'den çıkartılmış ve üzerinde OCT'nin erimesi için 54°C de 15 dakika ısıtılmıştır. %4 paraformaldehit ile oda sıcaklığında 15 dakika muamele edilerek fiksasyon işlemi tekrarlanmıştır. Daha sonra %3 H₂O₂: metanol içerisinde 15 dakika bekletilerek hücre içinden gelen peroksidad aktivitesi engellenmiştir. Sonrasında slaytlar 1X fosfatlı tuz solüsyonu (PBS) ile 5 dakika yıkanmıştır. Bloklama %0.3Triton-X-100-1X PBS içinde çözülmüş %5'lik keçi serumu ile oda sıcaklığında nemli sıcak ortamda 1 saat bekletilerek yapılmıştır. Sonrasında slaytlar %0.3Triton-X-100-1X PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. GM2 gangliosidi için birincil antikor (KM966) 1.5% keçi serumu içeren %0.3 Triton-X-100-1X PBS içinde 1:800 konsantrasyonunda çözülerek hazırlanmış ve slaytlar üzerine eklenerek 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra slaytlar 1X PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. İkincil antikor (DyLight 488 -Thermo) 1:800 konsantrasyonunda 1X PBS içinde hazırlanmış ve slaytlar üzerine eklenerek 1 saat inkübe edilmiş ve slaytlar 1X PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Suyun uzaklaştırılması için sırayla %70 etanol, %100 etanol ve ksilen içinde 30'ar saniye tutulmuş ve cytooseal (Thermo) eklenerek dokunun korunması amacıyla lamel ile kapatılmıştır. Slaytlar Floresan Mikroskop (Olympus BX53) ile analiz edilmiştir ve fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar IMAGE-J programı kullanılarak analiz edilmiş ve karşılaştırılmaları yapılmıştır (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3.).

2.2. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Enzim aktiviteleri 3, 6 ve 9 aylık farelere ait beyin örneklerinde her genotipten 3'er fare 2'şer reaksiyon hazırlanarak analiz edilmiştir. 5 farklı genotipteki farelerde sialidaz, β-Hekzosaminidaz, β-galaktozidaz, β-glukozidaz, α-L-iduronidaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu enzimlerin sentetik substratları (Tablo2.1) floresan olarak işaretlidir ve enzimlerin aktiviteleri ile yıkılan substratlardan çıkan floresan miktarı spektrofotometri ile uyarma dalga boyu 365nm, ışımaya dalga boyu 445nm olarak ayarlanmış ve konsantrasyonu bilinen floresan madde kullanılarak çizilen standart eğri kullanılarak tayin edilmiştir.

Tablo2.1: Aktiviteleri ölçülen enzimler ve kullanılan substratlar

Enzim	Substrat
Sialidaz	2'-(4-Methylumbelliferil)- α -D-N-asetilnöraminik asit
β -Hekzosaminidaz	4-Metilumbelliferil-2-asetamido-4,6-0-benziliden-2-deoksi- β -D-glukopiranosid
β -galaktozidaz	4-Metilumbelliferil β -D-galaktopiranosid
β -glukosidaz	4-Methylumbelliferil β -D-glukopiranosid
α -L-iduronidaz	4-Methylumbelliferil α -L-iduronid

Bu enzimlerin aktivite ölçümü için 50 mg beyin 200 μ l distile su içerisinde el homojenizatörü ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnek 800 μ l 0,5M sodyum asetat (pH4.5) eklenerek 1:5 oranında seyreltilmiş ve 20 saniye süre ile 60V' ta sonikasyon yapılmış ve tüm hücrelerin bu şekilde parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen bu beyin homojenatı enzim aktivite ölçümlerinde protein/enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Her enzim için olan substratlar önerildikleri çözümler içinde çözülerek hazırlanmıştır ve çalışmada kullanılmışlardır. Reaksiyonlar ise aşağıdaki tabloda verildikleri şekilleriyle kurulmuşlardır.

Tablo2.2: Enzim aktivite ölçümü için hazırlanan reaksiyonların içerikleri

SİALİDAZ ENZİMİ	
Blank için	Örnek için
50 μ l substrat	50 μ l substrat
40 μ l 0.5M sodyum asetat tamponu (pH4.5)	40 μ l 0.5M sodyum asetat tamponu (pH4.5)
10 μ l H ₂ O	10 μ l örnek
30 dakika 37°C'de inkübasyon 3.9ml 0.2M glisin tamponu (pH10.8) ile reaksiyonun durdurulması	
β-GALAKTOZİDAZ ENZİMİ	
Blank için	Örnek için
50 μ l substrat	50 μ l substrat
100 μ l 0.1M NaCl	100 μ l 0.1M NaCl
50 μ l H ₂ O	50 μ l örnek
10 dakika 37°C'de inkübasyon 3.8ml 0.2M glisin tamponu (pH10.8) ile reaksiyonun durdurulması	

β-GLUKOZİDAZ ENZİMİ	
Blank için	Örnek için
50µl substrat	50µl substrat
40µl 0.5M sodyum asetat tamponu (pH4.5)	40µl 0.5M sodyum asetat tamponu (pH4.5)
10µl H ₂ O	10µl örnek
30 dakika 37°C'de inkübasyon 3.9ml 0.2M glisin tamponu (pH10.8) ile reaksiyonun durdurulması	
α-L-İDURONİDAZ ENZİMİ	
Blank için	Örnek için
50µl substrat	50µl substrat
40µl 0.5M sodyum asetat tamponu (pH4.5)	40µl 0.5M sodyum asetat tamponu (pH4.5)
10µl H ₂ O	10µl örnek
30 dakika 37°C'de inkübasyon 3.9ml 0.2M glisin tamponu (pH10.8) ile reaksiyonun durdurulması	
β-HEKZOSAMİNİDAZ ENZİMİ	
Blank için	Örnek için
150µl substrat	150µl substrat
50µl H ₂ O	50µl örnek
30 dakika 37°C'de inkübasyon 7.8ml 0.2M glisin tamponu (pH10.8) ile reaksiyonun durdurulması	

Florosan işaretli substratlardan ölçülen floresan miktarları enzim spesifik aktivitesini hesaplamak için aşağıdaki formülde kullanılmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi} = \frac{\text{ortama konsantrasyon} \times \text{son hacim}}{\text{Örneğin hacmi}} \times \frac{1}{\text{zaman(saat)}} = (\text{nmol/saat/ml})$$

Spesifik aktivite = enzim aktivitesi (nmol/saat/ml) ÷ protein konsantrasyonu (mg/ml) = nmol/mg protein/saat olarak hesaplanmış ve sonuçlar grafiğe dökülmüştür (Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6)

BRADFORD METODU İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Protein miktarı tayini Bradford Reagent (Sigma B6916) ile yapılmıştır. Standart eğrinin çizilmesi için BSA (Bovine serum albumin) proteini kullanılmıştır ve önerildiği gibi 1.4mg/ml stok BSA'dan seri seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda örnekler hazırlanmıştır. Protein miktarları bilinen bu örneklerden 5µl alınarak 96 well-plate içinde 250µl Bradfod ajanı

ile karıştırılmış, 10 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmiş ve 595nm dalga boyunda ölçüm alınarak standart eğri elde edilmiştir. Daha sonra enzim aktivitesinde kullanılan beyin homojenatları bradford ajanı ile aynı şekilde muamale edilerek okumaları alınmış ve çizilen standart eğriden yararlanılarak her bir homojenatın protein miktarı hesaplanmıştır.

2.3. MOLEKÜLER BİYOLOJİK ANALİZLER (GEN İFADE ANALİZLERİ)

3 ve 6 aylık 3'er adet 5 farklı genotipteki farelerden beyin dokusu alınarak sıvı nitrojene atılmış ve şok dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elimizde 9 aylık yaş grubunda yeterli fare olmaması nedeni ile çalışmanın bu bölümü sadece 3 ve 6 aylık fareler ile gerçekleştirilebilmiştir. Beyin dokusunda Neu1, Neu2, Neu3 ve Neu4 sialidaz genlerinin yanı sıra HexB geninin ifade düzeyleri de çalışılmıştır. Örneklerimiz Trizol (Invitrogen) ile homojenize edilmiş ve total RNA izolasyonu önerilen şekilde izole edilmiştir. 100mg beyin dokusu 1ml trizol içinde mini el homojenizatörü ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen örnek üzerine 200µl kloroform eklenmiş ve 15 saniye boyunca çalkalanmıştır. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra örnekler 4°C'de 12.000g hızda 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda oluşan fazlardan üst sulu faz RNA izolasyonu için yeni bir ependorfa alınmıştır. Bu fazdaki RNA'yı çöktürmek için üzerine 500µl %100 izopropanol eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 4°C'de 12.000g hızda 10 dakika santrifüj yapılmış ve RNA'yı yıkama aşamasına geçilmiştir. Santrifüj sonucu oluşan pelet 1ml %75 etanol ile yıkanmış, 4°C'de 7500g hızda 5 dakika tekrar santrifüj yapıldıktan sonra etanol uzaklaştırılmış ve pelet kurumaya bırakılmıştır. Etanol tamamen uçuktan sonra pelet üzerine 50µl RNaz içermeyen su eklenmiş ve 50°C su banyosunda RNA'nın çözünmesi için 10 dakika bekletilmiştir. Son olarak RNA'ların konsantrasyonları ölçülmüş ve daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye saklanmıştır.

Toplam RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra her bir örnekten 1µg RNA alınmış, Protoscript M-MuLv Taq RT PCR kiti (NEB) kullanılarak gen ifadesi analizi için mRNA'ların çoklu Adenin kuyruğuna bağlanan çoklu Timin primeri ile cDNA'ya çevrilmiştir. Tüm örneklerde mRNA'ların cDNA'ya dönüştüğünü kontrol etmek amacı ile cDNA'lardan β-aktin primerleri kullanılarak 2.5mM dNTP, 2.5mM MgCl₂, 40ng cDNA, 0.25pmol primer son konsantrasyonlu 25µl reaksiyon karışımı ile 95°C'de 2 dakika, 95°C'de 20 saniye, 53°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye – 30 döngü – ve 72°C 5 dakika son uzama koşullarında PCR yapılmıştır (Şekil 3.7). cDNA'lar gen ifadesi analizi için kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Gen ifadesi analizinde kullanılacak olan primerlerin dizileri Shiozaki ve arkadaşlarının yaptığı 2009 yılı yayınından alınarak sentezletirilmiştir. Tüm örneklerde real-time PCR ile sialidaz gen ifadeleri çalışılmadan önce bu genlerin çoğaltılabileceği en uygun koşulu bulmak amacı ile PCR optimizasyonu yapılmıştır (Şekil 3.8). Daha sonra aynı genotipten 3 ve 6 aylık yaş grubundan 3'şer örnek PCR'da birbirinin kontrolü olması amacıyla 2 aynı reaksiyon olarak 96 kuyucuklu PCR tüplerine yüklenmiştir. Sialidaz Neu1, Neu2, Neu3, Neu4'ün yanı sıra internal kontrol olarak kullanılan GAPDH geni ifadesi Roche Real-Time SYBR Green Master Mix kullanılarak 20µl hacimde 40ng cDNA ve 0,4pmol primer çifti ile analiz edilmiştir. Aynı koşullarda her gen için ayrıca cDNA içermeyen başka birer reaksiyon da kurulmuş ve böylece ölçülen ışımının sadece hedef bölgeden geldiğinin kontrolü de yapılmıştır. Analizde kullanılan primerler tabloda (Tablo2.3) verilmiş olup reaksiyon; 95°C'de 10dakika, 95°C'de 20 saniye, 61°C'de 15 saniye, 72°C'de 22 saniye – 45 döngü ve her döngü sonunda ışımaya ölçülmesi ardından, 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 10 saniye ve 99°C'ye kadar sürekli okuma şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık yükseltılarak yapılan sürekli okuma, erime eğrisi analizidir ve bu analiz reaksiyonda hedef bölge harici başka ürünlerin çoğaltılıp çoğaltılmadığını görmek amacı ile yapılmıştır (Şekil 3.9). Real-time PCR ile elde edilen sonuçlar internal kontrole göre normalize edilmiş ve normal (WT) fare örneğine göre oranlanarak sonuç elde edilmiştir (Şekil 3.10).

Tablo2.3: Gen ifadesinde kullanılan primerler

Gen	Primer dizisi	PCR ürünü boyutu
Neu1	5'- TCATCGCCATGAGGAGGTCCA-3' 5'- AAAGGGAATGCCGCTCACTCCA-3'	431 bp
Neu2	5'- CGCAGAGTTGATTGTCCTGA-3' 5'- TTCTGAGCAGGGTGCAGTTTCC-3'	429 bp
Neu3	5'- CTCAGTCAGAGATGAGGATGCT-3' 5'- GTGAGACATAGTAGGCATAGGC-3'	416 bp
Neu4	5'- AGGAGAACGGTGCTCTTCCAGA-3' 5'- GTTCTTGCCAGTGGCGATTTGC-3'	339 bp
HexB	5'-AGTGCGAGTCCTTCCCTAGT-3' 5'-ATCCGGACATCGTTTGGTGT-3'	412bp
GAPDH	5'- CCCCTTCATTGACCTCAACTAC-3' 5'- ATGCATTGCTGACAATCTTGAG-3'	347bp

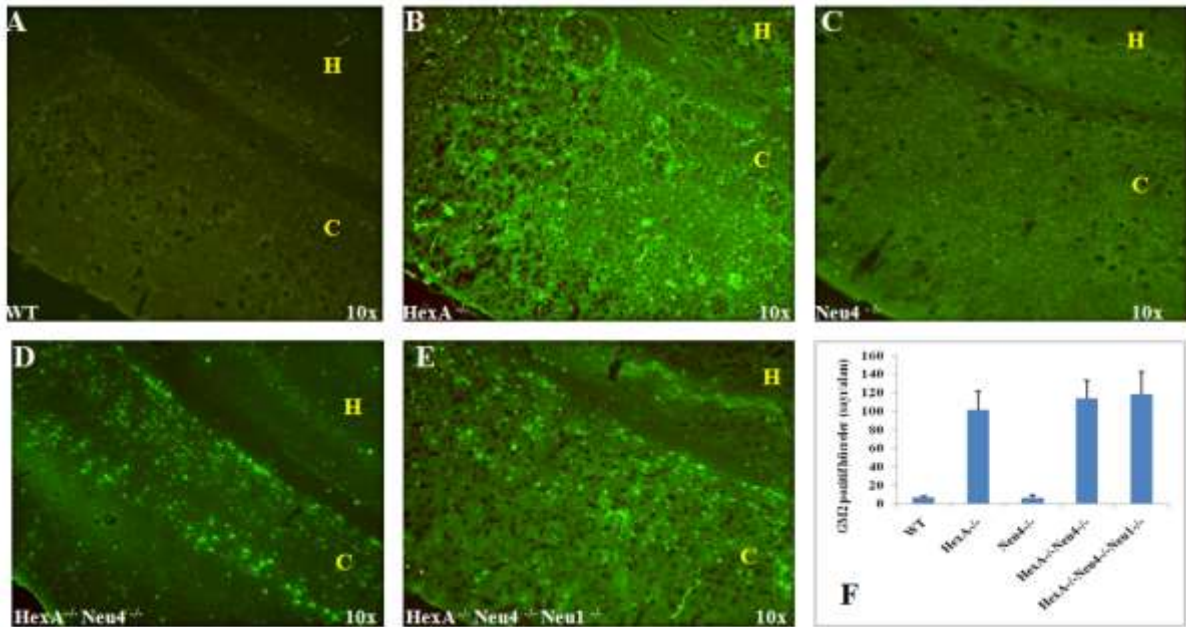
β-Aktin	5'- CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' 5'- TTGAAGGTCTCAAACATGA-3'	209bp
---------------------------------	---	--------------

Tüm sonuçların istatistiksel analizi için ANOVA testi kullanılmıştır.

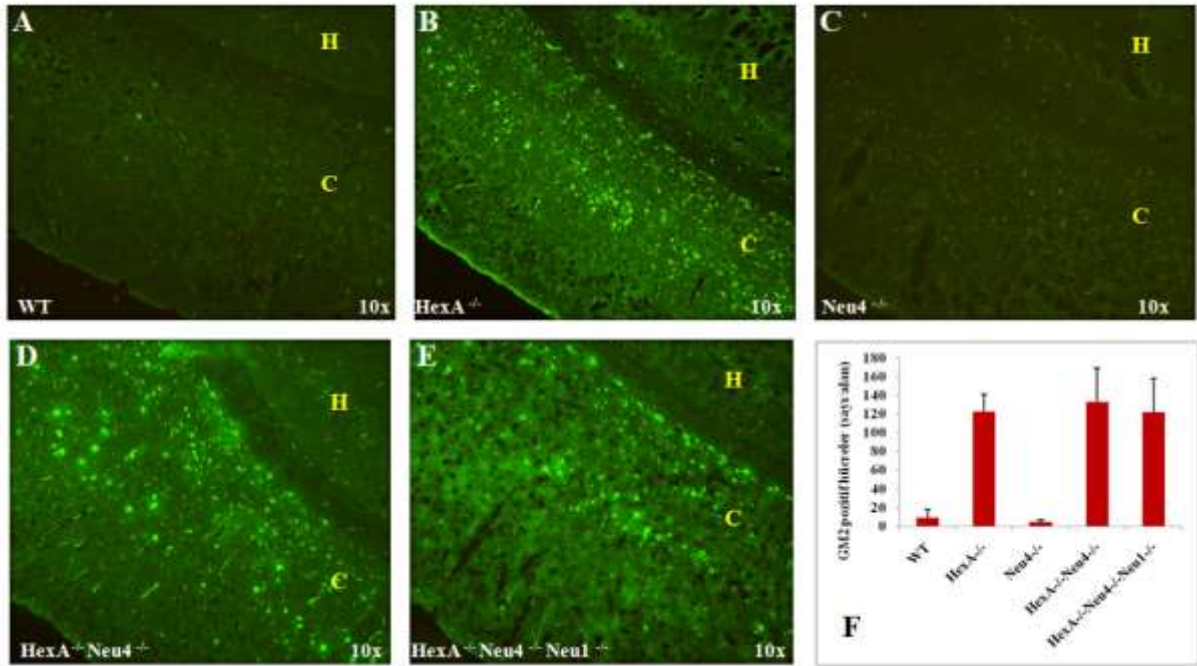
BÖLÜM 3 SONUÇLAR

3.1. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER

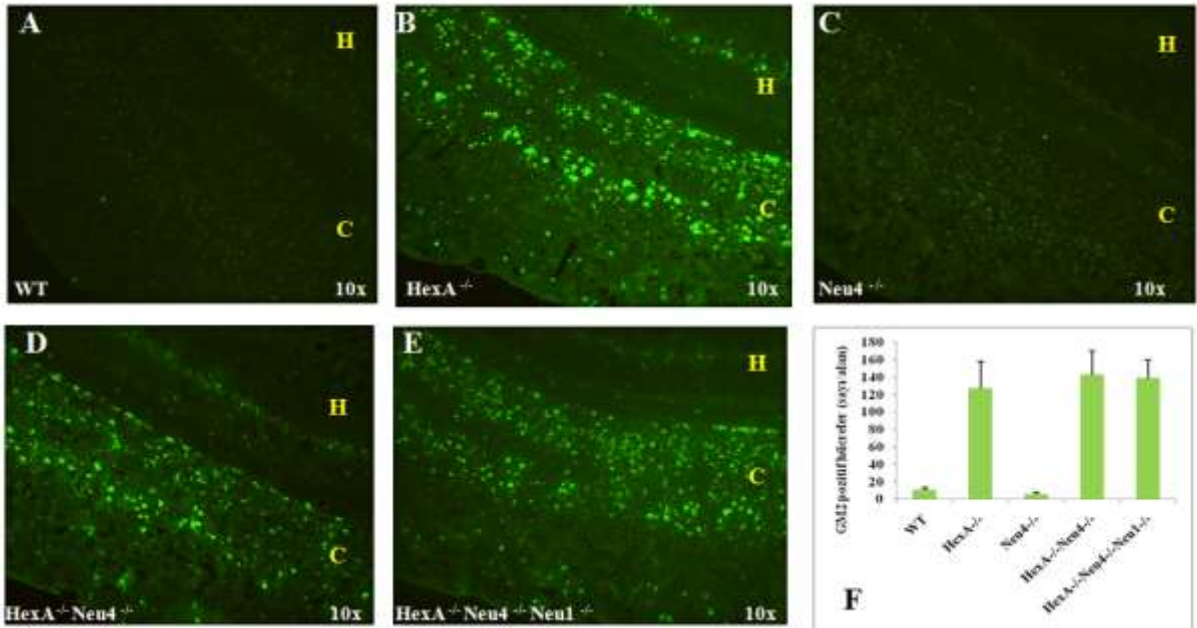
Paraformaldehit ile fiksasyonu yapılan 3, 6 ve 9 ay yaş gruplarındaki farelerin beyinlerden cryostat cihazı ile kesitler alınmış, bu kesitler GM2 gangliosidine özgü birincil antikor ve floresan işaretli ikincil antikor kullanılmıştır. Yapılan immunohistokimyasal analiz sonrasında kesitler floresan mikroskobu ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilerek beynin hangi bölgelerinde birikim olduğu tespit edilmiştir. 3, 6 ve 9 aylık Normal (WT) ve Neu4^{-/-} farelerinin beyinlerinin korteks ve hipokampus bölgelerinde GM2 gangliosidi birikimi gözlenmezken HexA^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinin beyinlerinde hipokampus oranla korteks kısmında çok daha dikkate değer miktarda GM2 gangliosidinin biriktiği görülmüştür (Şekil 3.1, 3.2, 3.3). HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerindeki GM2 gangliosid birikiminin HexA^{-/-} faresinden yaklaşık %10 fazla olduğu gözlenirken farklı yaş gruplarında bu birikimin belirgin bir şekilde artmadığı görülmüştür.



Şekil 3.1: 3 aylık normal (WT) (A) ve Neu4^{-/-} (C) faresi hem korteks (resimde sarı C ile belirtilmiş) hem de hipokampüste (resimde sarı H belirtilmiş) GM2 birikimi gözlenmemiştir. HexA^{-/-} (B) HexA^{-/-}Neu4^{-/-} (D) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} fare beyinlerinde GM2 gangliosidinin artan bir birikim vardır (F) Grafik GM2 pozitif hücrelerin IMAGEJ görüntüleme yazılımı kullanılarak yapılan yarı-kantitatif analizini göstermektedir. p<0,05



Şekil 3.2: 6 aylık normal (WT) (A) ve Neu4^{-/-} (C) faresi hem kortekste (resimde sarı C ile belirtilmiş) hem de hipokampüste (resimde sarı H belirtilmiş) GM2 birikimi gözlenmezken HexA^{-/-} (B) HexA^{-/-}Neu4^{-/-} (D) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} fare beyinlerinde GM2 gangliosidinin birikimi tesbit edilmiştir. (F) Grafik GM2 pozitif hücrelerin IMAGEJ görüntüleme yazılımı kullanılarak yapılan yarı-kantitatif analizini göstermektedir. p<0,05

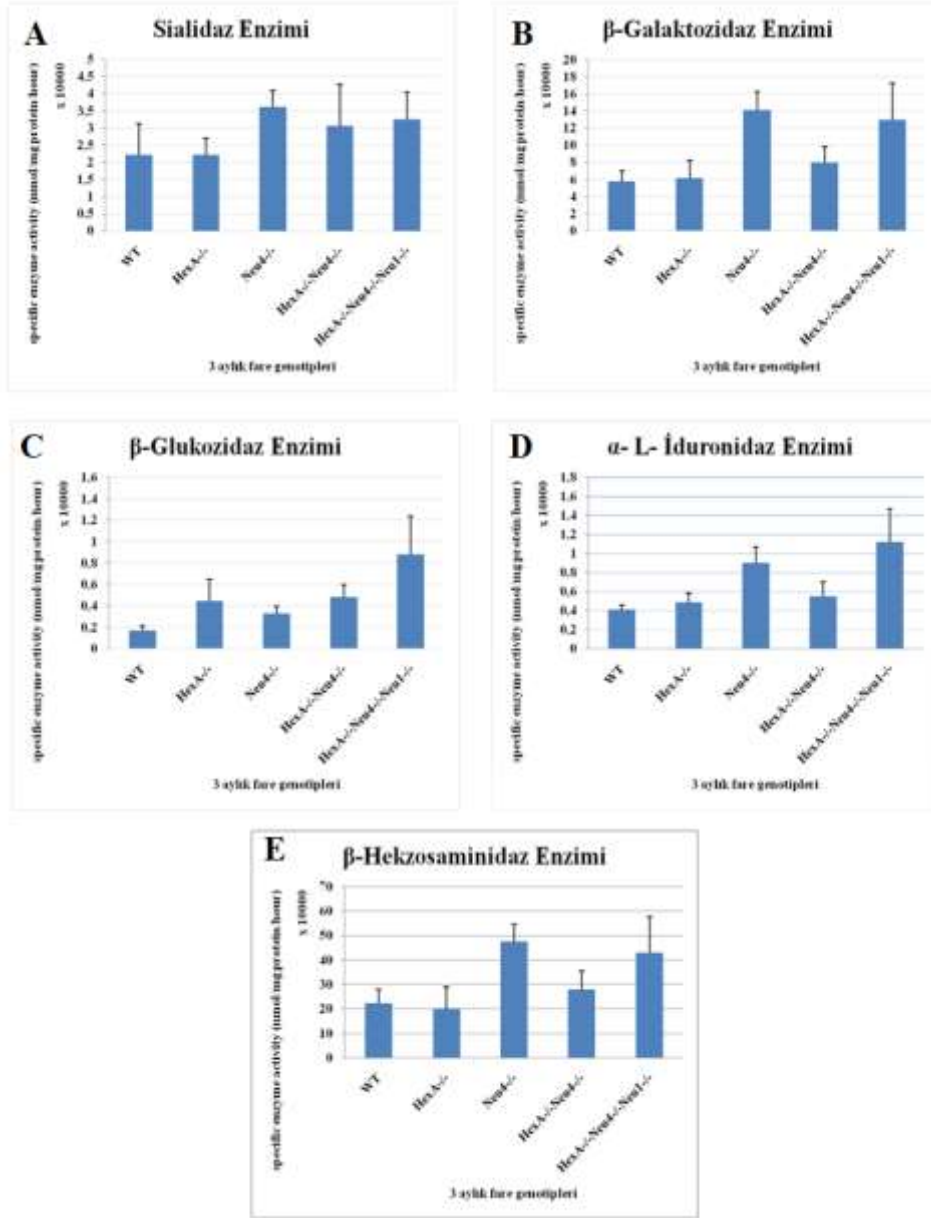


Şekil 3.3: 9 aylık normal (WT) (A) ve Neu4^{-/-} (C) faresi hem kortekste (resimde sarı C ile belirtilmiş) hem de hipokampüste (resimde sarı H belirtilmiş) GM2 birikimi göstermemektedir. HexA^{-/-} (B) HexA^{-/-}Neu4^{-/-} (D) ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} fare beyinlerinde GM2 gangliosidinin

birikim tesbit edilmiştir. (F) Grafik GM2 pozitif hücrelerin IMAGEJ görüntüleme yazılımı kullanılarak yapılan yarı-kantitatif analizini göstermektedir. $p < 0,05$

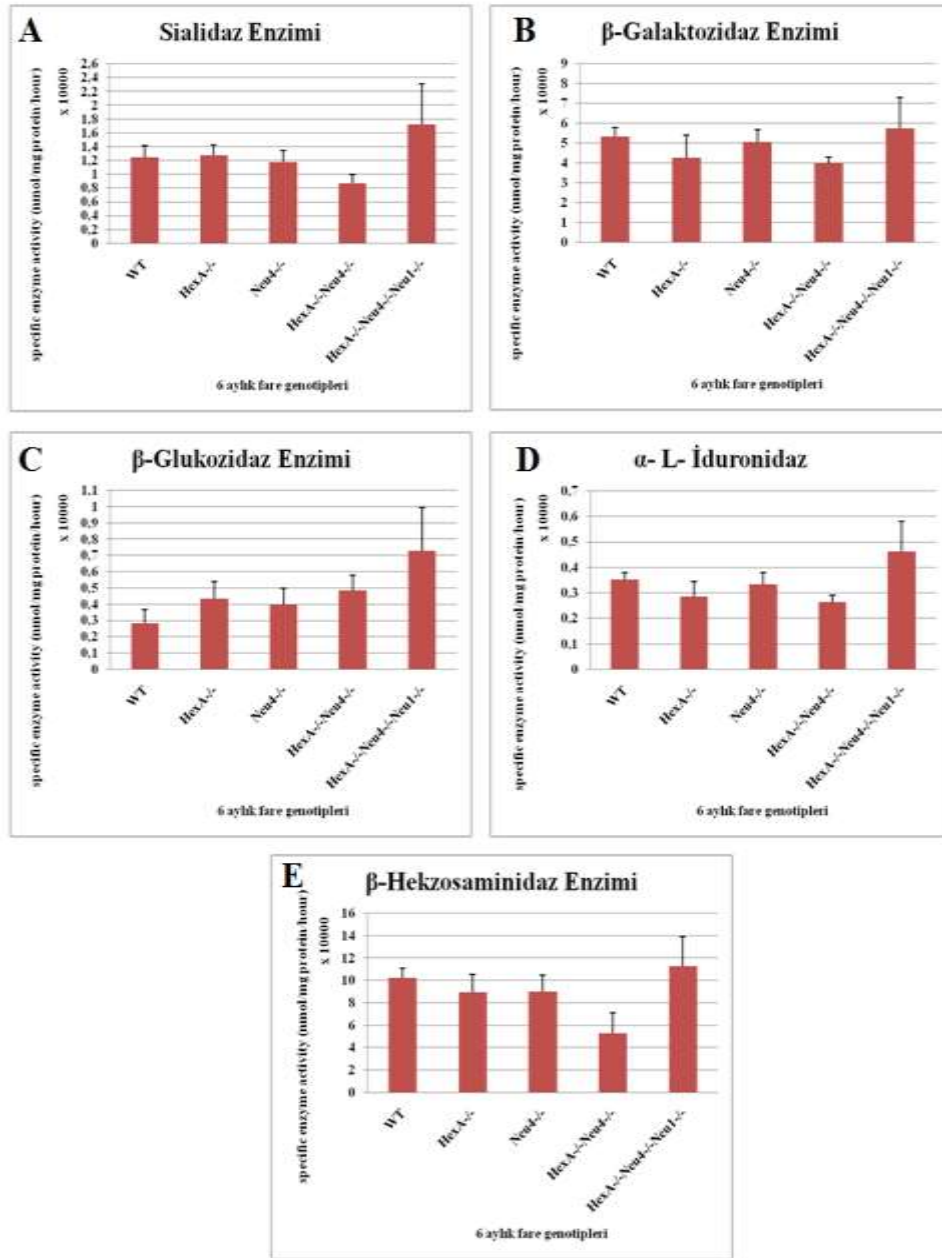
3.2. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3 aylık farelerde sialidaz enzim aktivitesi normal ve HexA^{-/-} fare beyinlerinde birbirine yakın bir değer gösterirken Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde yaklaşık 2 katlık bir artış göstermişlerdir. Benzer şekilde β -Galaktozidaz enzim aktivitesi normal ve HexA^{-/-} faresinde aynıdır fakat Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde sırasıyla 2.5, 1.5 ve 2 katlık bir artış göstermişlerdir. β -Glukozidaz enzim aktivitesi ise HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde belirgin bir şekilde artmış ve kontrole göre yaklaşık 5 kat fazla aktivite ölçülmüştür. α -L-Iduronidaz enzimi aktivitesi ise Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde normal fareye göre 2-3 katlık artmıştır. β -Hekzosaminidaz enzimi (HexA ve HexB olmak üzere iki izoenzimler) aktivitesi en fazla Neu4^{-/-} faresinde görülmüştür (Şekil 3.4).



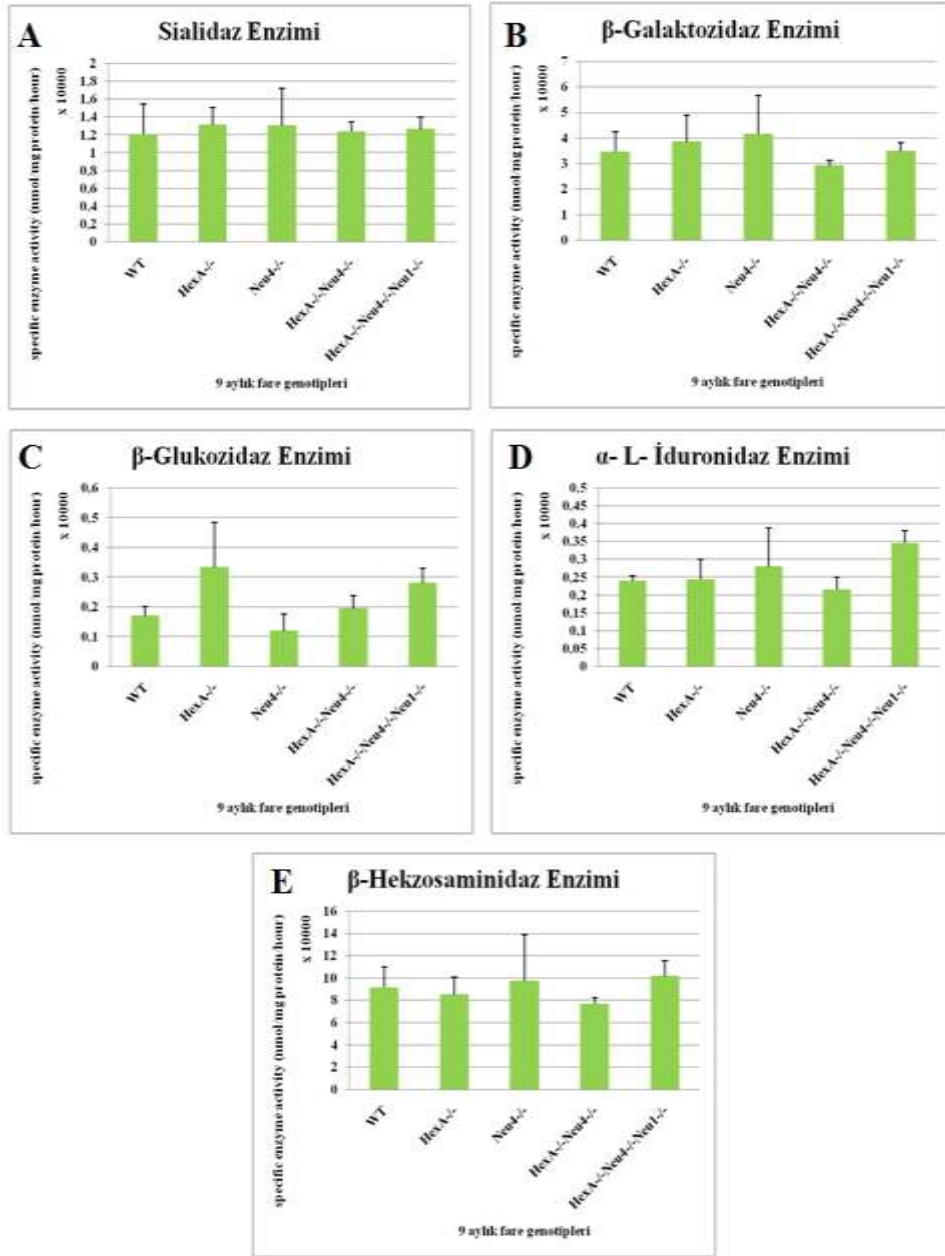
Şekil 3.4: 3 aylık Normal (WT), HexA^{-/-}, Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} fare beyinlerinde Sialidaz (A*), β-Galaktozidaz (B**), β-Glukozidaz (C**), α-L-İduronidaz (D**) ve β-Hekzosaminidaz (E**) enzim aktivite ölçümleri. *p<0,05, **p<0,01

6 aylık farelerde fare grupları arasındaki farklılıklar biraz azalmıştır. En belirgin fark olarak HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde β-Glukozidaz enziminin aktivitesi göze çarpmaktadır. 3 aylık yaş grubunda normal fareye göre 5 kat olan enzim aktivitesi 6 aylık farede yaklaşık 3 kata artmıştır (Şekil 3.5). Sialidaz, β-Galaktozidaz, α-L-İduronidaz ve β-Hekzosaminidaz aktiveleri belirgin bir şekilde HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde artmıştır.



Şekil 3.5: 6 aylık Normal (WT), HexA^{-/-}, Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} fare beyinlerinde Sialidaz (A**), β-Galaktozidaz (B*), β-Glukozidaz (C**), α-L-İduronidaz (D**) ve β-Hekzosaminidaz (E**) enzim aktivite ölçümleri. *p<0,05, **p<0,01

9 aylık farelerde Sialidaz, β-Galaktozidaz), α-L-İduronidaz ve β-Hekzosaminidaz enzim aktiviteleri fare grupları arasında belirgin farklılık göstermemiştir. Ancak β-Glukozidaz 3 ve 6 aylık farelerde olduğu gibi bu grupta da farklılık göstermiştir. HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} faresinin normale göre olan fazla β-Glukozidaz aktivitesi azalırken HexA^{-/-} faresindeki aktivitesinde belirgin bir artış tesbit edilmiştir (Şekil 3.6).

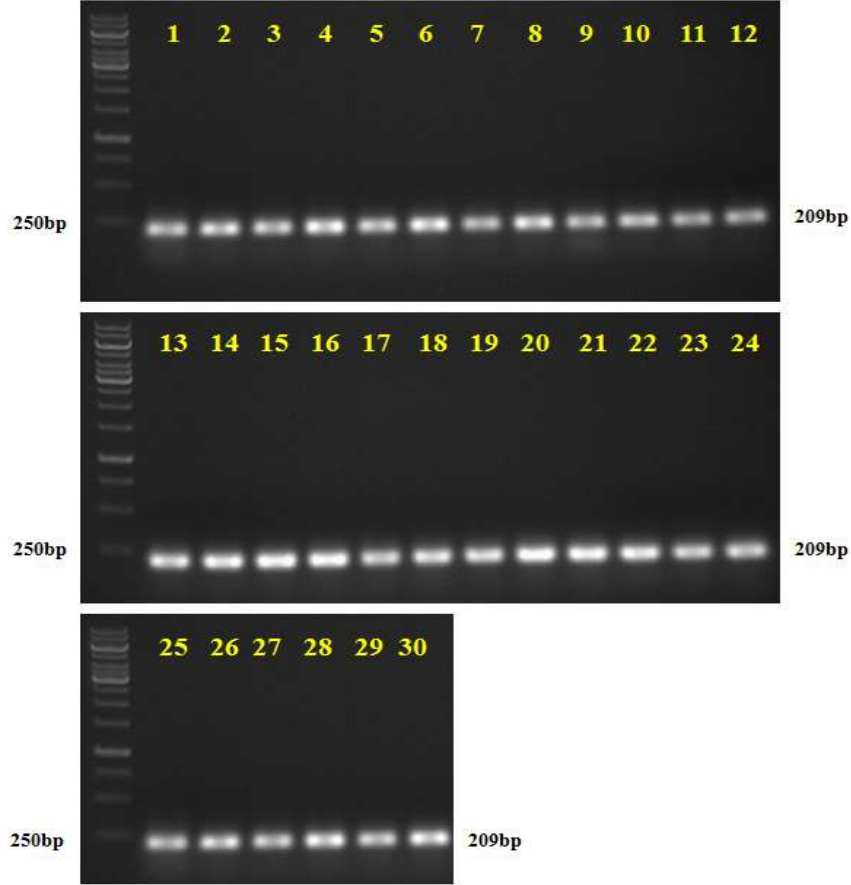


Şekil 3.6: 9 aylık Normal (WT), HexA^{-/-}, Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} fare beyinlerinde Sialidaz (A*), β-Galaktozidaz (B*), β-Glukozidaz (C**), α-L-İduronidaz (D**) ve β-Hekzosaminidaz (E*) enzim aktivite ölçümleri. *p<0,05, **p<0,01

3.3. MOLEKÜLER BİYOLOJİK ANALİZLER (GEN İFADE ANALİZLERİ)

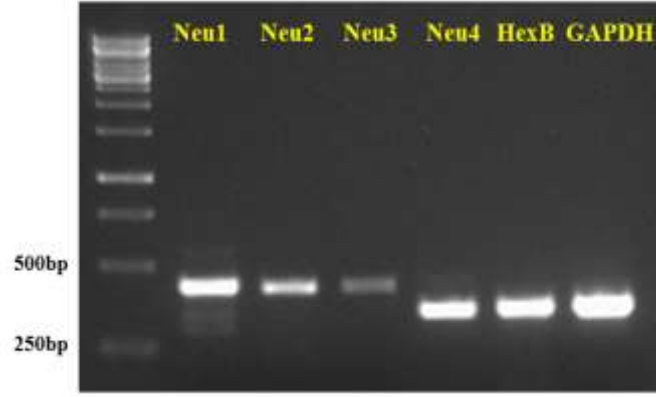
3 ve 6 aylık farelerde sialidazlar (Neu1-4) ve β-Hexosaminidaz B enziminin gen ifadelerinin nasıl etkilendiğini bulmak için real-time PCR yapılmıştır. Bunun için 3 ve 6 aylık 5 farklı gruptan 3'er fare, toplamda 30 örnekten RNA izole edilmiş ve cDNA'ye çevrilmiştir. Bu

cDNA'lardan β -aktin primerleri ile PCR yapılmış ve cDNA'lar bu şekilde kontrol edilmiştir (Şekil 3.7).



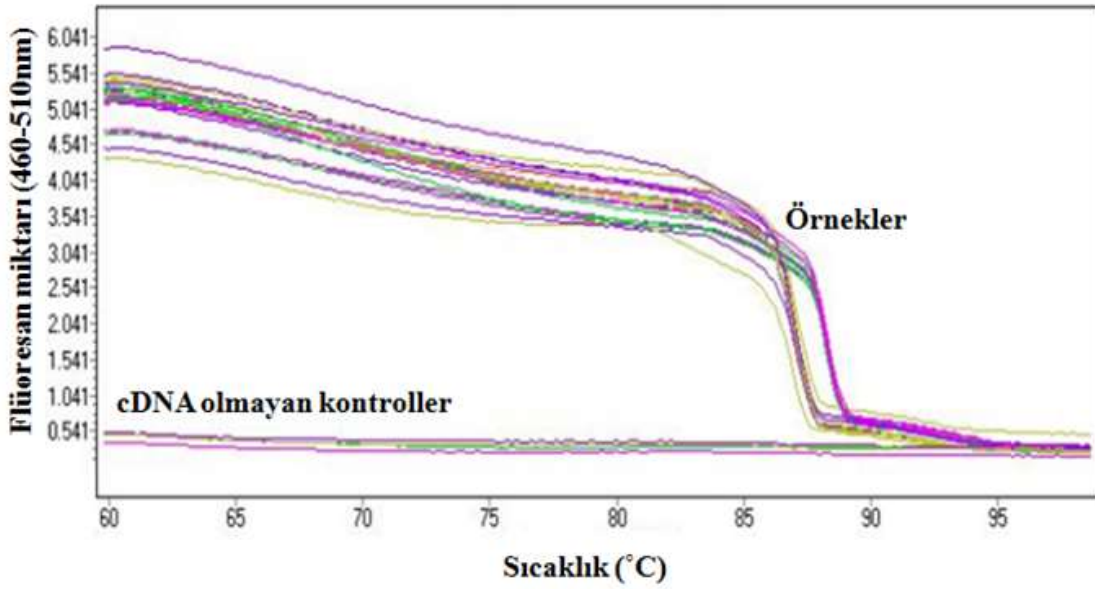
Şekil 3.7: 3 ve 6 aylık Normal (WT), $HexA^{-/-}$, $Neu4^{-/-}$, $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}$ ve $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}$ fare beyinlerinden izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar ile yapılan β -aktin kontrol PCR ürünleri (%1 agarozda yürütülerek elde edilmiştir)

Tüm örneklerde real-time PCR ile sialidazların gen ifadelerine bakılmadan önce tüm bu genlerin çoğaltılabileceği en uygun koşulu bulmak amacı ile PCR optimizasyonu yapılmıştır ve real-time PCR bu koşulda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8).



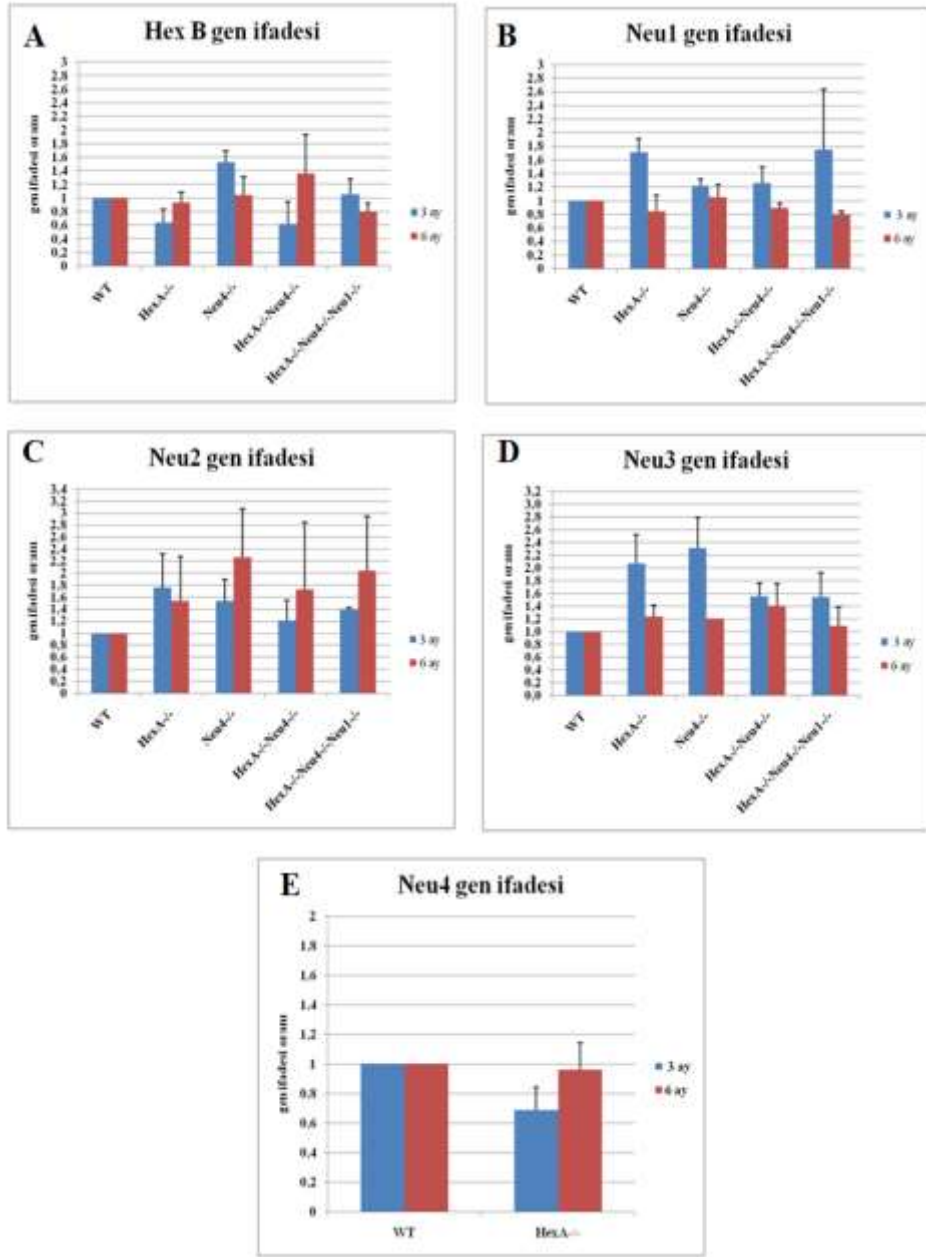
Şekil 3.8: Sialidaz Neu1, Neu2, Neu3, Neu4 ve HexB genleri ile internal kontrol olan GAPDH geninin PCR ürünleri (%1 agarozda yürütülerek elde edilmiştir)

Real-time PCR ile örneklerden istenilen genler çoğaltıldıktan sonra yapılan erime eğrisi analizinde tek bir pik görülmesi sadece istenilen bölgenin çoğaltıldığını, primer dimer veya ikincil bir PCR ürününün olmadığını, Syber Green'den alınan ışımının sadece bizim gen ürünümüzden geldiğini göstermektedir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Real-time PCR ile çoğaltılan örneklerin erime eğrisi analizi sonucu

Tüm reaksiyonlar tamamlandıktan sonra hesaplamalar yapılmış ve gen ifadeleri karşılaştırılmıştır. Yapılan analizler sonucu sialidaz Neu2 ve Neu3 enzimlerinin gen ifadelerinin farklı fare gruplarında hem 3 ve hem de 6 aylık yaş gruplarında dikkate değer bir şekilde arttığı görülmüştür (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: 3 ve 6 aylık Normal (WT), HexA^{-/-}, Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} fare beyinlerinde β-Hekzosaminidaz B, Sialidaz Neu1, Neu2, Neu3 ve Neu4 genlerinin ifadeleri

BÖLÜM 4

TARTIŞMA

Tay-Sachs (β -Hekzosaminidaz A eksikliği) ve Sandhoff (β -Hekzosaminidaz B eksikliği) hastalıkları otozomal resesif olarak kalıtılan ve klinik olarak benzerlik gösteren nörodejeneratif hastalıklardır. Tay-Sachs hastalığında HexA genindeki mutasyonlar kodlanan β -Hekzosaminidaz izoenziminin α alt ünitesi eksikliğine, Sandhoff hastalığında ise HexB geni tarafından kodlanan β -Hekzosaminidaz izoenziminin β alt ünitesinin eksikliğine neden olmaktadır. Tay-Sachs ve Sandhoff hastalıkları GM2 gangliosidosis olarak da adlandırılmaktadır. Tedavisi bulunmayan bu iki hastalıkta hastalar genellikle 3-4 yaşlarında ölmektedir. Hastalıkların moleküler patolojisini daha anlamak ve tedavi yöntemleri geliştirmek amacı ile fare β -Hekzosaminidaz A ve B genleri embriyonik kök hücrelerde hasara uğratılarak Tay-Sachs ve Sandhoff hastalıklarının fare modeli yaratılmıştır. Sandhoff farelerinde β -Hekzosaminidaz B eksikliği sonucu ağır klinik tablo ile seyreden nörolojik bulgular doğumdan sonraki ilk 3 ayda tespit edilirken Tay-Sachs farelerinin ilk 12 ay (ortalama fare ömrü 2 yıldır) normal bir fenotipe sahip olduğu gözlenmiştir (MIKLYAEVA, 2004). Tay-Sachs farelerinin normal fenotipe sahip olması ve hastalık bulgularının görülmemesi fare ve insanda gangliosid yıkım yollarının farklı olduğunu öyle ki farelerde insanda bulunmayan bir metabolik bypass mekanizmasının bulunduğunu düşündürmüştür (PHANEUF, 2004). Bu bypass mekanizmasına göre HexA^{-/-} farelerde β -Hekzosaminidaz A geni knock-out edilmesine rağmen ganglioside GM2'den sialik asit (NANA) sialidaz yada sialidazlar tarafından uzaklaştırılmakta ve ganglioside GA2 dönüştürülmektedir. Daha sonra β -Hekzosaminidaz B enzimi tarafından GA2 yıkılarak laktosilseramide (Gal-Glc-Cer) yıkılmaktadır ve ganglioside GM2 birikimi engellenmektedir.

Sialidaz enzimlerinin Tay-Sachs hastalığı fare modelinde β -Hekzosaminidaz A eksikliği sonucu biriken ve sialik asit içeren gangliosid GM2 sfingolipidini yıktığı ve bunun sonucunda ise farelerin hastalanmadığı düşünülmektedir. Bu hipotezi test etmek amacı ile yaratılan ilk fare modelinde olan ve β -Hekzosaminidaz A ve sialidaz Neu4 genleri hasara uğratılmış farelerin (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}) %40'unda epilepsi gibi Tay-sachs hastalığı bulguları gözlenmiştir. Ayrıca HexA^{-/-}Neu4^{-/-} farelerinin beyin korteks ve hipokampus nöronlarında belirgin bir gangliosid GM2 artışı tespit edilmiştir. Sadece β -Hekzosaminidaz A (HexA^{-/-}) ve sadece sialidaz Neu4 (Neu4^{-/-}) eksikliği olan farelerde ise bu tür bulgulara rastlanmamıştır. Bu sonuçlar sialidaz Neu4 enziminin Tay-Sachs fare modelinde metabolik bypass'tan sorumlu bir enzim olduğunu göstermektedir (SEYRANTEPE, 2008, 2010). Ancak ikili enzim

eksikliği olan (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}) farelerin tümünde hastalık belirtilerinin olmaması, gangliosid GM2 yıkımında sialidaz Neu4 enziminin tek başına yeterli olmadığını göstermiştir. Ayrıca Neu4 sialidazın modifiye edici bir enzim olduğunu ve Neu1 veya Neu3 gibi diğer sialidaz enzimlerinin de bu yıkım yolağında rol alabileceğini düşündürmüştür. Sango ve arkadaşları Tay-sachs ve Sandhoff hastalık fare modellerini çiftleştirerek hem β -Hekzosaminidaz A hem de β -Hekzosaminidaz B eksikliği olan bir başka fare modeli yaratmıştır. Bu farelerde beklenen GM2 gangliosidosis bulgularının yanı sıra tamamen başka bir lizozomal depo hastalık grubu olan mukopolisakkaridosislerin biyokimyasal ve patolojik bulguları gözlenmiştir. Bir mukopolisakkaridosis olan MPSI (Hurler) sendromunda α -L-idorunidazenzim eksikliğinden dolayı heparan ve dermatan sülfat gibi glikoaminoglikanlar lizozomlarda birikirken, MPSIIIC (Sanfilippo IIIC) sendromunda ise Acetyl-CoA:alpha-glukosaminidasetiltransferaz eksikliğinden dolayı heparan sülfat birikmektedir. Tay-Sachs ve Sandhoff hastalarında ne biyokimyasal ne de fenotipik olarak mukopolisakkaridosis bulguları bulunmamaktadır. Buna karşılık yaratılan β -Hekzosaminidaz A ve β -Hekzosaminidaz B eksikliği olan farelerdeki patolojik bulgular β -Hekzosaminidaz'ların glikoaminoglikanlarında yıkımında rol aldığı bir göstergesidir (SANGO, 1996). Ayrıca β -Hekzosaminidaz A ile birlikte sialidaz enzim eksikliklerinin bu yıkım yolağındaki biyokimyasal ve patolojik etkisi bilinmemektedir. Sialidaz Neu1 ve Neu4'ün birlikte gangliosid yıkım yolağında rolünü araştırmak için daha önce yaratılan HexA^{-/-}Neu4^{-/-} farelerin bir başka araştırma için yaratılan Neu1^{-/-} farelerin çiftleştirilmesi ile üçlü enzim eksikliği olan fareler (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}) elde edilmiştir. Neu1^{-/-} farelerde sialidaz Neu1 enzim aktivitesi normale göre %8-10 düzeyindedir. Neu1^{-/-} farelerde sialidaz Neu1 geninde değil Kathepsin A adlı gende mutasyon bulunmaktadır. Bu mutasyon sonucu Neu1 enzimi aktif olmak için ihtiyaç duyduğu Kathepsin A enzimi ile kompleks oluşturamaz ve sonuçta Neu1 enzim aktivitesini düşmektedir (SEYRANTEPE, 2010; DRIDI, 2013).

Desteklenen projemiz kapsamında β -hexosaminidase A ve sialidaz Neu4 yanı sıra sialidaz Neu1 eksikliğine bağlı olarak beyindeki gangliosid GM2 miktarındaki artış HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde ilk kez immünohistokimyasal çalışmalar ile gösterilmiştir. HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde GM2 gangliosid birikimi HexA^{-/-}Neu4^{-/-} farelerinde olduğu gibi korteks kısmında ağırlıklı olmakla birlikte hipokampus bölgesinde de gözlenmiştir.

Biyokimyasal enzim analizleri ile 5 farklı enzimin tek, ikili ve üçlü eksikliği sonucu ganglioside yıkım yolağındaki β -Galaktozidaz, sialidaz ve β -Hekzosaminidaz B gibi diğer lizozomal enzim aktivitelerini nasıl etkilediği ve bu enzimlerin spesifik aktivitelerinde herhangi bir artış olup olmadığı belirlenmiştir. Gangliosid yıkım yolağında rol alan Sialidaz, β -Galaktozidaz ve β -Hekzosaminidaz aktiviteleri 3 aylık yaş grubunda Neu4^{-/-}, HexA^{-/-}Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde belirgin artışlar göstermiştir. Enzim aktivitelerindeki bu

artışlar biriken glikolipidlerin lizozomlardan temizlenmesini sağlamak amacı ile olabilir. Bunun yanı sıra Sialidaz Neu1 ve Neu4 sialidaz enzim eksikliklerinin buradan tamamen farklı bir yolda etkilerinin olup olmadığını göstermek amacı ile heparan sülfat yıkım yolağında rol alan α -L-iduronidaz enzimi analiz edilmiştir. Özellikle 3 aylık yaş grubunda Neu4^{-/-} ve HexA^{-/-} Neu4^{-/-}Neu1^{-/-} farelerinde gözlenen 2-3 katlık artış lizozomda bulunan gangliosid yıkım yolağı haricindeki yolların da sialidaz enzim eksikliğinden etkilenebileceğini göstermektedir.

Sialidaz Neu1, Neu2, Neu3 ve Neu4 genlerinin ifade analizleri öncelikle β -Hekzosaminidaz A eksikliği olan HexA^{-/-} farelerinde ilk kez gösterilmiştir. Hekzosaminidaz B aktivitesi HexA^{-/-} farelerinde düşerken Neu4^{-/-} farelerinde artış göstermiştir. Ayrıca analiz edilen sialidazlarda Neu2 ve Neu3'ün gen ifadelerinin artmış olması sadece Neu4 ya da Neu1'in değil birden fazla sialidaz enziminin farede görülen gangliosid yıkım yolağındaki bypass mekanizmasında rol alabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKÇA

DRIDI L, Seyrantepe V, Fougerat A, Pan X, Bonneil E, Thibault P, Moreau A, Mitchell GA, Heveker N, Cairo CW, Issad T, Hinek A, Pshezhetsky AV. Positive Regulation of Insulin Signaling by Neuraminidase 1. *Diabetes*. **2013** Jul;62(7):2338-46.

MIKLYAEVA EI, Dong W, Bureau A, Fattahie R, Xu Y, Su M, Fick GH, Huang JQ, Igdoura S, Hanai N, Gravel RA. Lateonset Tay-Sachs disease in mice with targeted disruption of the Hexa gene: behavioral changes and pathology of the central nervous system. *Brain Res*. **2004** Mar 19;1001(1-2):37-50.

PHANEUF D, Wakamatsu N, Huang JQ, Borowski A, Peterson AC, Fortunato SR, Ritter G, Igdoura SA, Morales CR, Benoit G, Akerman BR, Leclerc D, Hanai N, Marth JD, Trasler JM, Gravel RA. Dramatically different phenotypes in mouse models of human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum Mol Genet*. **1996** Jan;5(1):1-14.

SANGO K, Yamanaka S, Hoffmann A, Okuda Y, Grinberg A, Westphal H, McDonald MP, Crawley JN, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat Genet* **1995** 11(2): 170–6.

SANGO K, McDonald MP, Crawley JN, Mack ML, Tifft CJ, Skop E, Starr CM, Hoffmann A, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. *Nat Genet*. **1996** Nov;14(3):348-52. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis.

SEYRANTEPE V, Landry K, Trudel S, Hassan JA, Morales CR, Pshezhetsky AV. Neu4, a novel human lysosomal lumen sialidase, confers normal phenotype to sialidosis and galactosialidosis cells. *J Biol Chem*. **2004** Aug 27;279(35):37021-9

SEYRANTEPE V, Canuel M, Carpentier S, Landry K, Durand S, Liang F, Zeng J, Caqueret A, Gravel RA, Marchesini S, Zwingmann C, Michaud J, Morales CR, Levade T and Pshezhetsky VA; Mice deficient in Neu4 sialidase exhibit abnormal ganglioside catabolism and lysosomal storage. *Hum Mol Genet*, **2008**, Vol. 17, No. 11 1556–1568.

SEYRANTEPE V, Lema P, Caqueret A, Dridi L, Bel Hadj S, Carpentier S, Boucher F, Levade T, Carmant L, Gravel RA, Hamel E, Vachon P, Di Cristo G, Michaud J, Morales C, Pshezhetsky AV.; Mice doubly-deficient in lysosomal hexosaminidase A and neuraminidase 4 show epileptic crises and rapid neuronal loss. *PLoS Genet.* **2010** Sep 16;6(9).

SEYRANTEPE V, Iannello A, Liang F, Kanshin E, Jayanth P, Samarani S, Szewczuk MR, Ahmad A, Pshezhetsky AV. Regulation of phagocytosis in macrophages by neuraminidase 1. *J Biol Chem.* **2010** Jan 1;285(1):206-15.

SHIOZAKI K, Koseki K, Yamaguchi K, Shiozaki M, Narimatsu H, Miyagi T. Developmental change of sialidase neu4 expression in murine brain and its involvement in the regulation of neuronal cell differentiation. *J Biol Chem.* **2009** Aug 7;284(32):21157-64

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. VOLKAN SEYRANTEPE
Proje No:	113S489
Proje Başlığı:	Hexosaminidase A Ve Sialidaz Enzim Eksikliği Bulunan Fare Beyinlerinin Immünohistokimyasal, Biyokimyasal Ve Moleküler Biyolojik Yöntemler İle Analizi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/12/2013 - 01/12/2014
Onaylanan Bütçe:	29950.0
Harcanan Bütçe:	29948.99
Öz:	<p>Tay-Sachs hastalığı ölümcül bir lizozomal depo hastalığıdır. Bu hastalıkta gangliosid GM2 adlı glikosifingolipid ?-Hekzosaminidaz A eksikliği sonucu yıkılamayarak lizozomlarda birikmekte ve özellikle sinir hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Tay-Sachs hastalığının fare modeli (HexA-/-) uzun yıllar önce yaratılmış fakat farelerde bu hastalığın bulguları gözlenmemiştir. İnsan ile fare arasında gangliosidlerin yıkım yollarının farklı olduğu ve bu nedenle Tay-Sachs farelerinde ?-Hekzosaminidaz A enzim eksikliği olmasına rağmen bir ?bypass? mekanizması ile gangliosid GM2'nin yıkıldığı düşünülmektedir (Sango K ve ark. Nature Genetics 1995). Memelilerde tanımlanan 4 farklı sialidaz (Neu1, Neu2, Neu3 ve Neu4) enziminin ise bu ?bypass? ta rol alabileceği ileri sürülmektedir. Haziran 2012'de sonuçlandırılan hızlı destek projemizde bu hipotezi test etmek amacı ile ?-Hekzosaminidaz A ve sialidaz Neu4 eksikliği olan farelerin (HexA-/- , Neu4-/-) yanı sıra ?-Hekzosaminidaz A ile birlikte iki sialidaz (Neu1 ve Neu4) enzim eksikliği olan farelerin (HexA-/-Neu4-/-Neu1-/-) beyin gangliosid düzeyleri ince tabaka kromatografisi çalışılmıştır ve 9 aylık farelerde beyin dokusunda gangliosid GM2 yanı sıra diğer gangliosid miktarlarında da farklılıklar görülmüştür. Bu projede 3,6 ve 9 aylık fare beyinlerinin immunohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler kullanarak analiz edilmiştir. Böylece sialidaz enzimlerinin farelerde gangliosid yıkım yolağındaki rolünü daha iyi anlamak mümkün olacaktır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Anahtar Kelimeler: Tay-Sachs, Fare Modeli, Sialidaz, Lizozom
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır