

**β - HEKZOSAMİNİDAZ A VE SİALİDAZ
ENZİM EKSİKLİĞİ OLAN FARELERDE
BEYİN LİPİD PROFİLİNİN ÇIKARILMASI**

Proje No: 111S018

Doç. Dr. Volkan Seyrantepe

Haziran 2012

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, farelerde bir ya da daha fazla sialidaz enziminin yer aldığı bir bypass mekanizmasının varlığı ileri sürülmüştür (Sango K et al. Nature Genetics 1995). Projemiz kapsamında, bu hipotezi test etmek amacı ile üç enzim (β -Hekzosaminidaz A, sialidaz Neu4 ve sialidaz Neu1) eksikliği olan farelerin (HexA^{-/-} Neu4^{-/-} Neu1^{-/-}) beyin lipid profilleri ince tabaka kromatografisi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Projemiz TÜBİTAK – 1002 hızlı destek programı tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

<u>Konu</u>	<u>Sayfa No</u>
Özet	6
Abstract	7
Bölüm 1. Giriş	8
Bölüm 2. Gereç ve Yöntem	10
Bölüm 3. Sonuçlar	12
Bölüm 4. Tartışma	21
Kaynakça	23

RESİM ve GRAFİK LİSTESİ

<u>Resim / Grafik</u>	<u>Sayfa No</u>
Resim 3.1: HexA ve Neu4 PCR ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı	12
Resim 3.2: Neu1 alelinin NdeI enzimi ile kesilmiş PCR ürünlerinin jel fotoğrafı	12
Resim 3.3: 1-3 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde asidik lipidlerin (gangliosid) ince tabaka kromatografisi ile analizi	13
Resim 3.4: 6 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde asidik lipidlerin (gangliosid) ince tabaka kromatografisi ile analizi	14
Resim 3.5: 6 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde nötral lipidlerin ince tabaka kromatografisi ile analizi (kloroform–metanol–amonyum–su (65:35:2:3) karışımında yürütme)	15
Resim 3.6: 6 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde nötral lipidlerin ince tabaka kromatografisi ile analizi (kloroform–metanol–su (65:35:8) karışımında yürütme)	16
Resim 3.7: 9 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde asidik lipidlerin (gangliosid) ince tabaka kromatografisi ile analizi	17

Resim 3.8: 9 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) fareler nötral lipidlerin ince tabaka kromatografisi ile analizi (kloroform–metanol–amonyum–su (65:35:2:3) karışımında yürütme)

18

Resim 3.9: 9 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde nötral lipidlerin ince tabaka kromatografisi ile analizi (kloroform–metanol–su (65:35:8) karışımında yürütme)

19

Grafik 3.1: 6 ve 9 aylık farelerde beyin GM2/GM1 oranları [K:kontrol, H: HexA enzim eksikliği olan, N: Neu4 enzim eksikliği olan, HN: HexA-Neu4 enzim eksikliği olan, T: HexA-Neu4-Neu1 enzim eksikliği olan

20

ÖZET

β -HEKZOSAMİNİDAZ A VE SİALİDAZ ENZİM EKSİKLİĞİ OLAN FARELERDE BEYİN LİPİD PROFİLİNİN ÇIKARILMASI

Tay-Sachs hastalığı GM2 gangliosidinden sialik asidi uzaklaştırarak GM3'e dönüştüren β -Hekzosaminidaz A enziminin α alt ünitesini kodlayan ve insan 15. Kromozomda bulunan HEXA genindeki mutasyonların sebep olduğu ölümcül bir lizozomal depo hastalığıdır. β -Hekzosaminidaz A eksikliği olan Tay-Sachs hastalığının fare modeli (HexA^{-/-}) yaratılmış, bu farelerde kısıtlı bir GM2 birikimi olmasına rağmen insandaki hastalık bulguları farede gözlenmemiştir. Bu nedenle insan ile fare arasında glikolipidlerin yıkım yollarının farklı olduğu, HexA^{-/-} farelerde bir ya da daha fazla sialidaz enziminin yer aldığı bir bypass mekanizması ile GM2'nin yıkılarak birikmediği ve bundan dolayı sinir dejenerasyonunun olmadığı ileri sürülmüştür (Sango et al. 1995). Bu hipotezi test etmek amacı ile yaratılan β -Hekzosaminidaz A ve sialidaz Neu 4 eksikliği olan farelerin (HexA^{-/-} Neu4^{-/-}) yaklaşık %40'da beyin dokusunda belirgin miktarda artan GM2 ile bağlantılı Tay-Sachs hastalığı bulgularından olan epileptik krizler gözlenmiştir (Seyrantepe et al. 2010). Krizler tüm farelerde gözlenmediği için Neu4 sialidazın bir modulatör gen ürünü olduğu ayrıca diğer sialidazların bu yolda yer alabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda bu hipotezi test etmek için üç enzim eksikliği olan farklı yaş grubundaki (β -Hekzosaminidaz A- (%0 aktif), sialidaz Neu4- (%0) aktif ve sialidaz Neu1- (%8-10 düzeyinde düşük sialidaz aktivitesi) farelerin beyin lipid profilleri karşılaştırılmıştır. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan analizlerde hem ikili (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}) hem de üçlü (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}) enzim eksikliği olan farelerde beyin gangliosid içeriklerinde sialidaz Neu1 eksikliğine bağlı olarak çok belirgin olmayan farklılıklar gözlenmiştir. Bu da sadece sialidaz Neu 1'in değil diğer sialidazlarında farelerde gangliosid yıkım yolağında rol alabileceğini düşündürmektedir.

ABSTRACT

BRAIN LIPID PROFILING OF MICE WITH THE DEFICIENCY OF β -HEXOSAMINIDASE A AND SIALIDASE ENZYMES

Tay-Sachs disease is a severe lysosomal storage disorder caused by mutations in the HEXA gene coding for α subunit of lysosomal β -hexosaminidase A enzyme, which converts GM2 to G_{M3} ganglioside. HexA^{-/-} mice, depleted of β -hexosaminidase A enzyme, remain asymptomatic to 1 year of age, so it was thought there is a difference between human and mice lipid degradation. Previously identified a novel ganglioside metabolizing sialidase, Neu4, is abundantly expressed in mouse brain neurons. It was demonstrated that mice with targeted disruption of both HexA and Neu4 genes (HexA^{-/-} Neu4^{-/-}) show accumulating GM2 ganglioside and epileptic seizures with 40% penetrance. Since all mice didn't show symptoms, it was suggested that Neu4 is not the only sialidase contributing to the metabolic bypass in HexA^{-/-} mice (Seyrantepe et al. 2010). Therefore, we studied the role of another sialidase Neu1 in glycolipid degradation. We profiled brain glycolipid content of triple deficient mouse model with the deficiency of β -Hexosaminidase A (0% activity), sialidase Neu4 (0% activity) and sialidase Neu 1 (8-10% reduced sialidase activity) by thin layer chromatography. Analysis of double (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}) and triple (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}) mice models showed that sialidase Neu 1 deficiency causes not significant difference in brain lipid profile and though also other sialidasases might have role in glycolipid degradation pathway in mice.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tay-Sachs hastalığı lizozomal depo hastalıklarının GM2 gangliosidosis adı verilen alt grubundandır. Sandhoff hastalığı ise bir diğer GM2 gangliosidosis hastalığı olup klinik olarak Tay-Sachs hastalığı ile benzerdir. Sandhoff hastalığı daha şiddetli seyir eden bir hastalık olmasının yanı sıra her iki hastalıkta kas zayıflığı, körlük, nörodejenerasyon ve epilepsi krizleri görülür. Bu iki gangliosidosis HEXA ve HEXB genlerindeki mutasyonların β -Hekzosaminidaz A enzimi eksikliğine bağlı olarak GM2 gangliosidinin lizozomlarda birikmesi sonucu ortaya çıkar ve tedavisi henüz mümkün değildir. Özellikle sinir hücrelerinde bulunan lizozomlarda biriken GM2 bu hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. β -Hekzosaminidaz A ve B genlerini fare embriyonik kök hücrelerde hasara uğratarak fare modeli yapılmıştır. Sandhoff farelerinde ($HexB^{-/-}$) şiddetli klinik bulgular gözlenirken Tay-Sachs farelerinde ($HexA^{-/-}$) nörolojik anomaliler 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 sialidazlar tarafından yıkıldığı ve hastalığa sebep olacak kadar birikmediği ileri sürülmüştür (Sango et al. 1995).

Sialidaz Neu4 yeni tanımlanmış bir lizozomal enzimdir ve GM2 gibi gangliosidlere karşı aktivitesi olduğu in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (Seyrantepe et al. 2004). $Neu4^{-/-}$ farelerinin beyinlerinde ise anormal gangliosid içeriği (artan GD1a ve azalan GM1 gangliosid oranı) ince tabaka kromatografisi analizi ile tesbit edilmiştir (Seyrantepe et al. 2008). β -Hekzosaminidaz A ve sialidaz Neu4 genleri hasara uğratılmış fareler ($HexA^{-/-}Neu4^{-/-}$) oluşturulmuş ve bu farelerin %40'unda GM2 birikimindeki artışla bağlantılı epilepsi krizler gözlenmiştir. Sadece β -Hekzosaminidaz A ve sadece Neu4 eksikliği olan farelerde ise bu tür klinik bulgulara rastlanmamıştır. Ayrıca $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}$ farelerin beyin korteks ve hipokampus nöronlarında belirgin GM2 gangliosit artışı tesbit edilmiştir (Seyrantepe et al. 2010). Bu sonuçlar sialidaz Neu4'ün Tay-Sachs fare modelinde modülatör bir gen olduğu, metabolik bypass ile hastalığın şiddetini azalttığını göstermiştir. Sialidaz Neu4 eksikliğinde ise Tay-Sachs hastalarındaki gibi epileptik krizlere neden olmaktadır. $HexA^{-/-}Neu4^{-/-}$ farelerinin

sadece %40'ında hastalık bulgularının gözlenmesi sialidaz Neu4'un HexA^{-/-} farede görülen metabolik bypassta rol alan tek sialidaz olmadığını düşündürmüştür (Seyrantepe et al. 2010).

Projemizin amacı daha önce yaratılan ve üçlü enzim eksikliği olan farelerin (HexA^{-/-} Neu4^{-/-} Neu1^{-/-}) beyin glikolipid profillerinin tek (HexA^{-/-} ve Neu4^{-/-}) ve çift (HexA^{-/-} Neu4^{-/-}) enzim eksikliği olan fareler ile karşılaştırmaktır. Üçlü fare modelinde sialidaz Neu4 ve β -Heksozamidaz A enzimlerinin aktiviteleri % 0 iken, sialidaz Neu1'in yaklaşık % 8-10 enzim aktivitesi vardır (Seyrantepe et al. 2010).

BÖLÜM 2

GEREÇ ve YÖNTEM

Doç. Dr. Volkan Seyrantepe'nin doktora sonrası araştırma projesi kapsamında Kanada'da yarattığı ve Türkiye'ye getirdiği β -Hekzosaminidaz A, sialidaz Neu4 ve sialidaz Neu1 enzim eksikliği olan fareler ($\text{HexA}^{-/-}\text{Neu4}^{-/-}\text{Neu1}^{-/-}$) öncelikle C57B/6 normal fareler ile çiftleştirilmiştir. Burada amaç tek, çift ve üçlü enzim eksikliği olan farelerle birlikte kontrol gruplarının oluşturulmasıdır. İlk çiftleştirme ile F1 neslinde dişi ve erkek heterozigot ($\text{HexA}^{+/-}\text{Neu4}^{+/-}\text{Neu1}^{+/-}$) fareler elde edilmiştir. Daha sonra bu fareler kendi aralarında çiftleştirilmiş ve yavrularından kontrol grubu; $\text{HexA}^{+/+}\text{Neu4}^{+/+}\text{Neu1}^{+/+}$, tek HexA enzim eksikliği olan; **HexA^{-/-}** $\text{Neu4}^{+/+}\text{Neu1}^{+/+}$, tek Neu4 enzim eksikliği olan; $\text{HexA}^{+/+}$ **Neu4^{-/-}** $\text{Neu1}^{+/+}$, çift enzim eksikliği olan; **HexA^{-/-}Neu4^{-/-}** $\text{Neu1}^{+/+}$ ve üçlü enzim eksikliği olan **HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}** elde edilmiştir. İstenilen özellikteki fareler için toplam 34 farklı çiftleştirme kurulmuş ve 274 fare 3 gen için ayrı ayrı genotiplendirilmiştir. Fareler 1-3, 6 ve 9 aylık oldukları zaman ötenazi ile öldürülerek çıkarılan beyinleri -80°C 'de saklanmıştır. Örnek alınan fareler aşağıdaki gibi gruplanmıştır;

1. Grup; $\text{HexA}^{+/+}\text{Neu4}^{+/+}\text{Neu1}^{+/+}$ (kontrol)
2. Grup; **HexA^{-/-}** $\text{Neu4}^{+/+}\text{Neu1}^{+/+}$ (tek HexA enzim eksikliği olan)
3. Grup; $\text{HexA}^{+/+}$ **Neu4^{-/-}** $\text{Neu1}^{+/+}$ (tek Neu4 enzim eksikliği olan)
4. Grup; **HexA^{-/-}Neu4^{-/-}** $\text{Neu1}^{+/+}$ (çift enzim eksikliği olan)
5. Grup; **HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}** (üçlü enzim eksikliği olan)

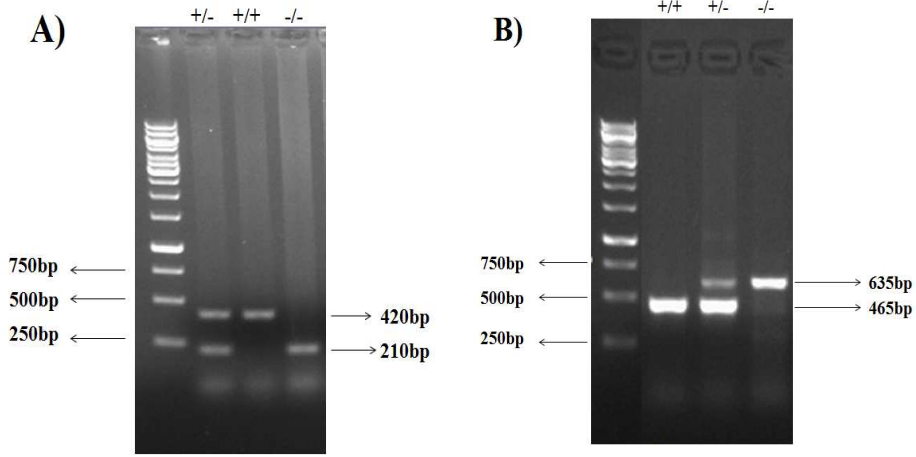
Uygun yaş grubundaki farelerin çiftleştirme ile elde edilmesinin yanı sıra beyin örneklerinden yapılacak olan lipid, gangliosid ve nötral lipid saflaştırılması, ince tabaka kromatografisi ve orsinol boyama metodu laboratuvarlarımız koşullarında öncelikle optimize edilmiştir.

Farelerin beyinlerinin aynı bölgesinden alınan 100mg'lık beyin dokusundan lipid saflaştırılması yapılmıştır. Beyin doku örneği 1 ml metanol içinde Politron homojenizatör ile homojenize edilmiş, üzerine 2.5 ml klorofom ve 1.5 ml metanol eklenerek bir gece 4 derecede saklanmış ve daha sonra 2500 rpm de sentrifuj edilmiştir (Folch et al 1957). Daha sonra üst faz Supelclean LC-18 kolonlardan geçirilmiş ile asidik olan gangliosid gibi lipidler saflaştırılmıştır. Gangliosidler silika ince tabaka kromatografisi plaklarına yüklenerek klorofom-metanol -% 0.22 CaCl₂ (55:45:10 hacim-oranında) çözücü eşliğinde kromatografi tankında yürütülmüşleridir. Gangliosidlerin yanı sıra nötral lipidler asit-baz kullanılarak kromatografide yürümeyen ağır lipidlerden ayrılarak izole edilmiş, yine silika ince tabaka kromatografisi plaklarına yüklenerek bu kez klorofom-metanol-amonyum-su (65:35:2:3 hacim-oranında) ve kloroform-metanol-su (60:35:8 hacim-oranında) çözücü içerisinde yürütülmüşleridir. Tüm plaklar orsinol (0.1 %) ve püskürtme ile yöntemi ile boyanmış ve daha sonra 120 ° C fırında 10 dk bekletilmiştir. Gangliosidler kullanılan gangliosid standartları ile karakterize edilmiş ve VersaDoc™ Görüntüleme Sistemi kullanılarak bantların yoğunluğu ve oranları karşılaştırılmıştır.

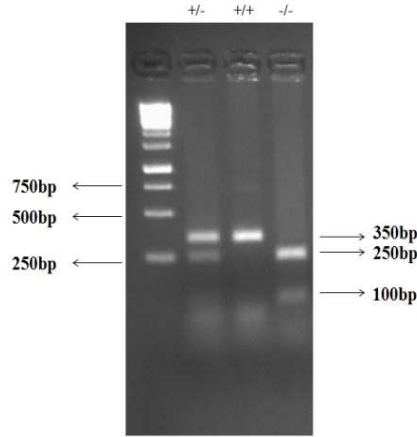
BÖLÜM 3

SONUÇLAR

Öncelikle farelerin yeterli miktarda çiftleşmesi ve üremesi sağlanmıştır. Doğan yavrular kuyruklarından örnek alınarak izole edilen DNA'larından yapılan PCR ile genotiplendirilmiştir. Genotiplendirme üç gen için farklı primerlerle yapılmış, jeldeki bant büyüklüklerinden mutant aleli taşıyıp taşımadıkları belirlenmiştir (Resim 3.1A ve 3.1B, Resim 3.2.). Kullanılan primer dizileri ve PCR şartları daha önce yapılan çalışmada yayınlanmıştır (Seyrantepe ve ark, 2010).

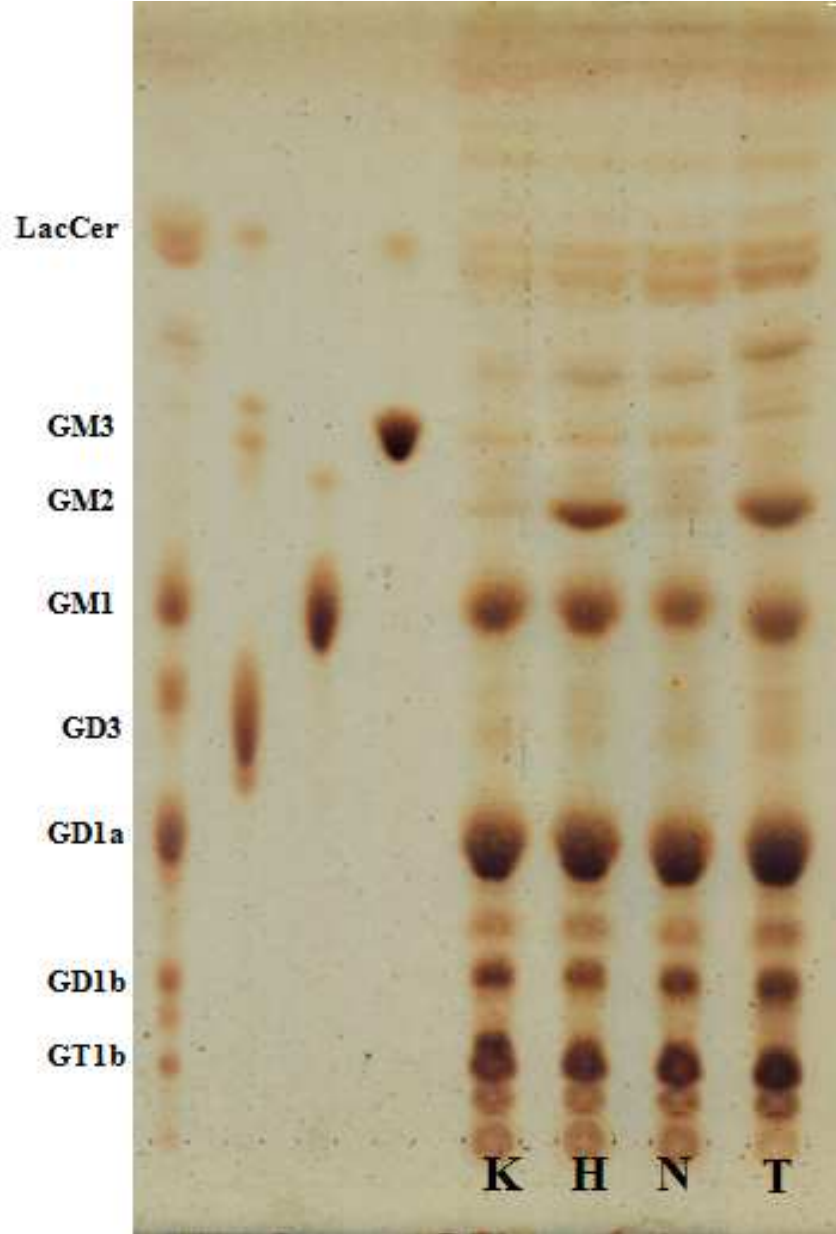


Resim 3.1: A: HexA ve B: Neu4 PCR ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı

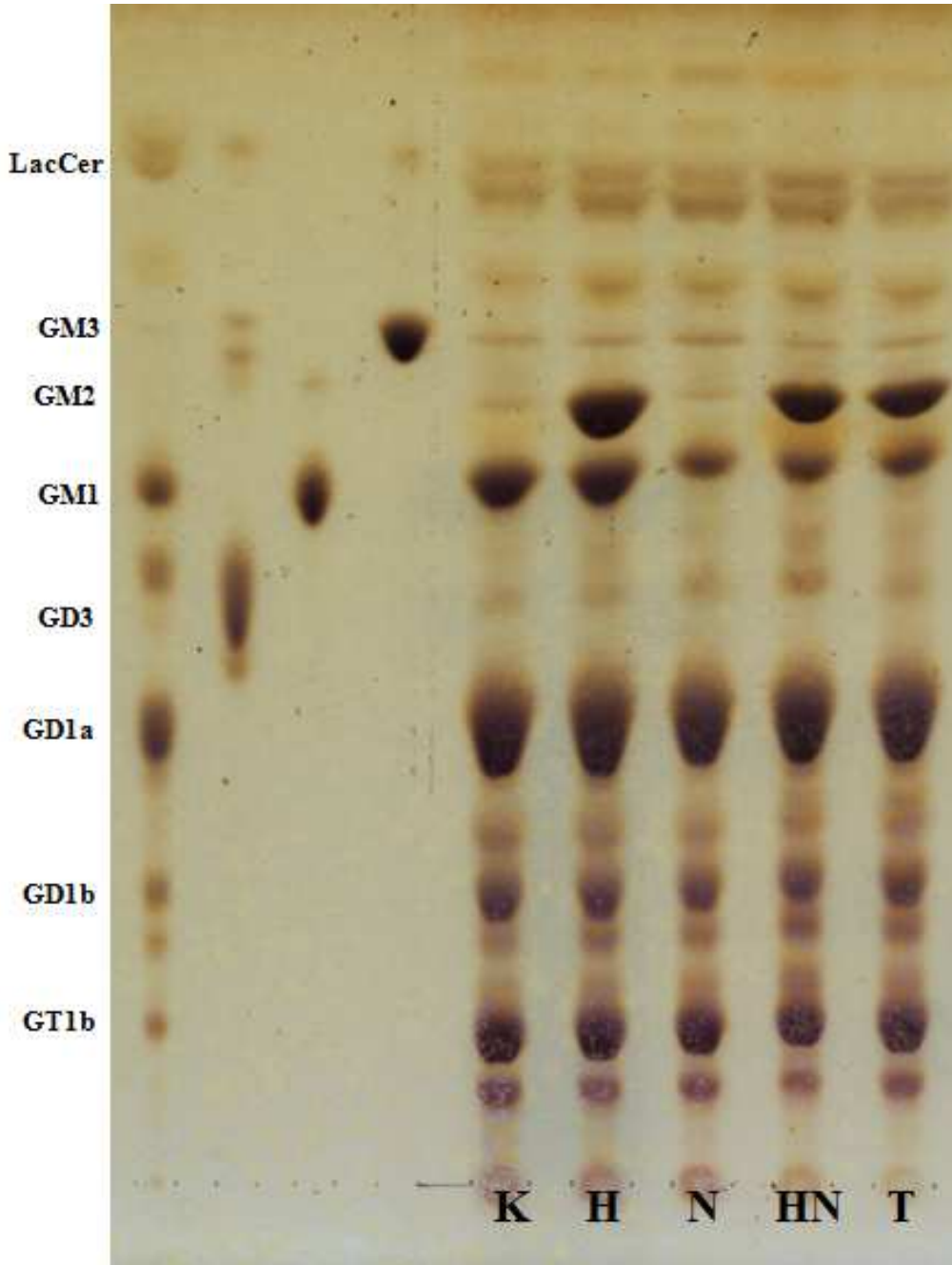


Resim 3.2: Neu1 alelinin NdeI enzimi ile kesilmiş PCR ürünlerinin jel fotoğrafı

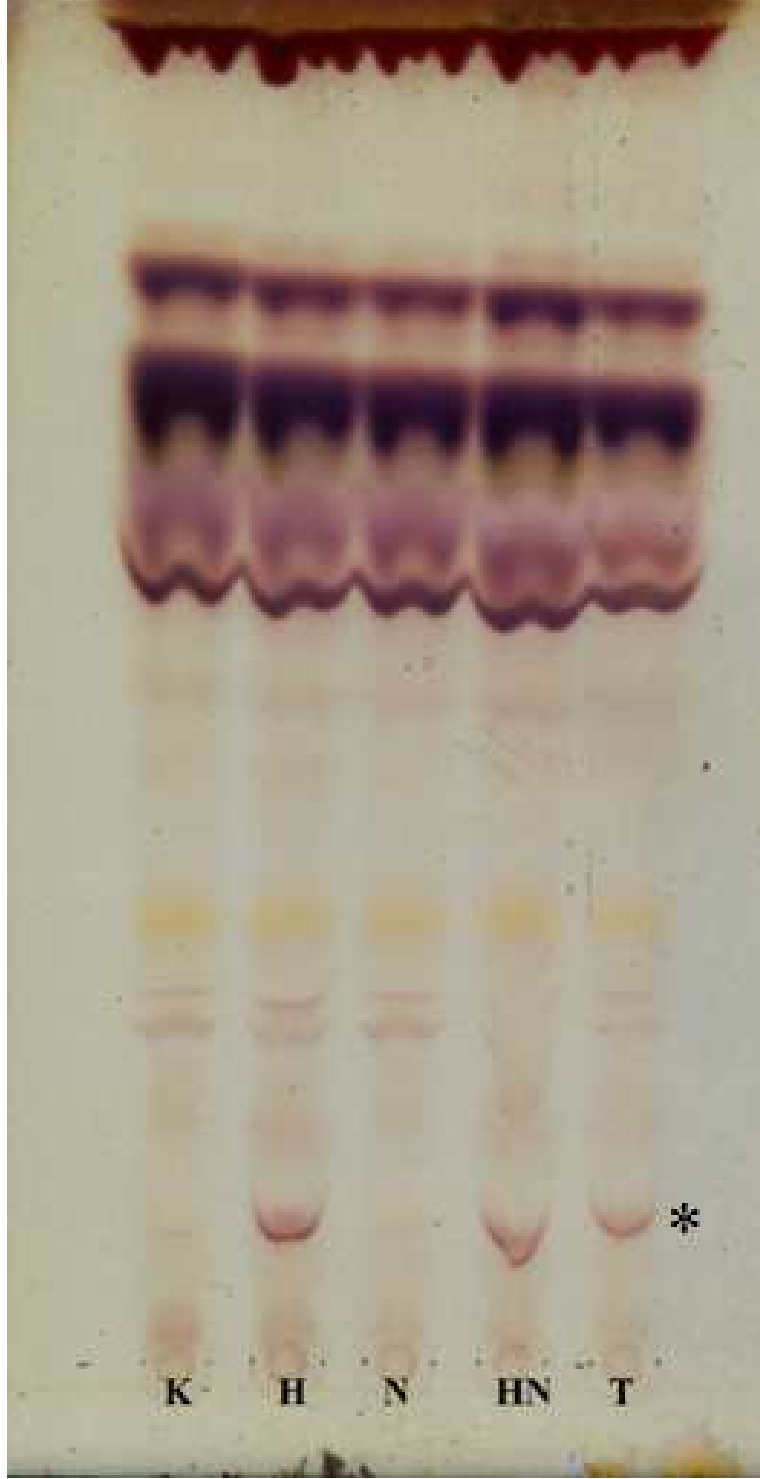
1-3, 6 ve 9 aylık farelerden alınan beyin örneklerinden asidik (gangliosid) ve nötral lipid izolasyonu yapılmış, ince tabaka kromatografisi ile yürütülen örnekler orsinol ile boyanarak analiz edilmiştir (Resim 3.3, Resim 3.4, Resim 3.5, Resim 3.6, Resim 3.7, Resim 3.8, Resim 3.9)



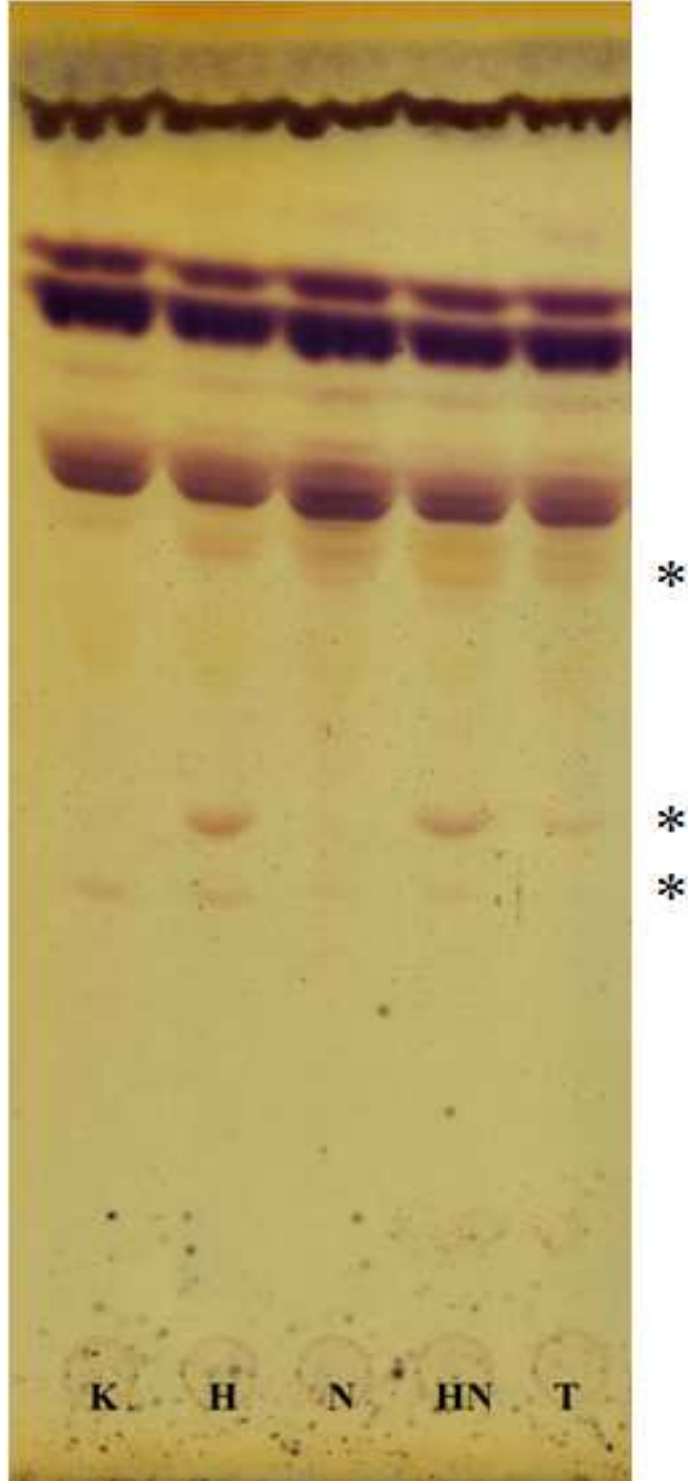
Resim 3.3: 1-3 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerinde asidik lipidlerin (gangliosid) ince tabaka kromatografisi ile analizi (LacCer: Laktozil seramid)



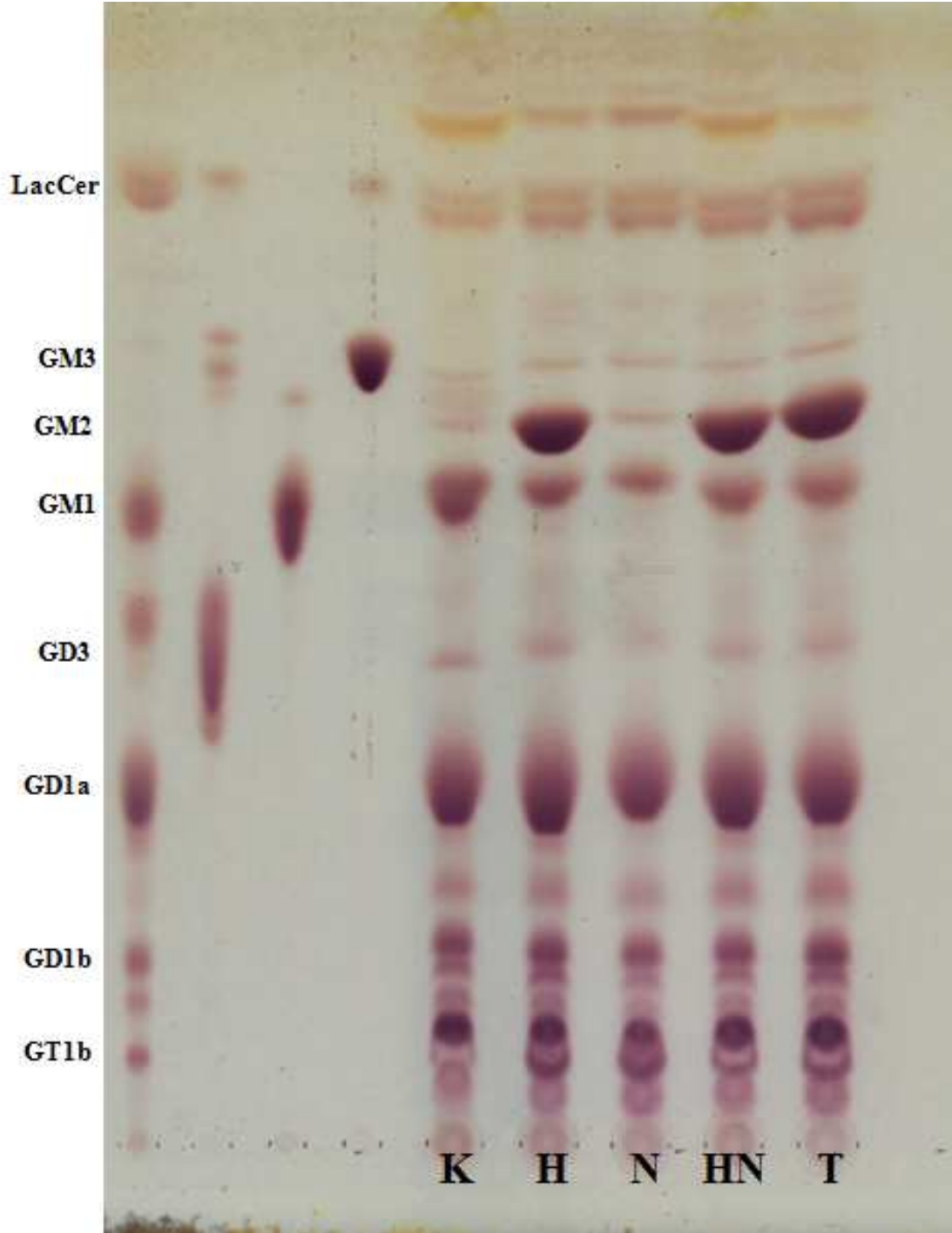
Resim 3.4: 6 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde asidik lipidlerin (gangliosid) ince tabaka kromatografisi ile analizi (LacCer: Laktozil seramid)



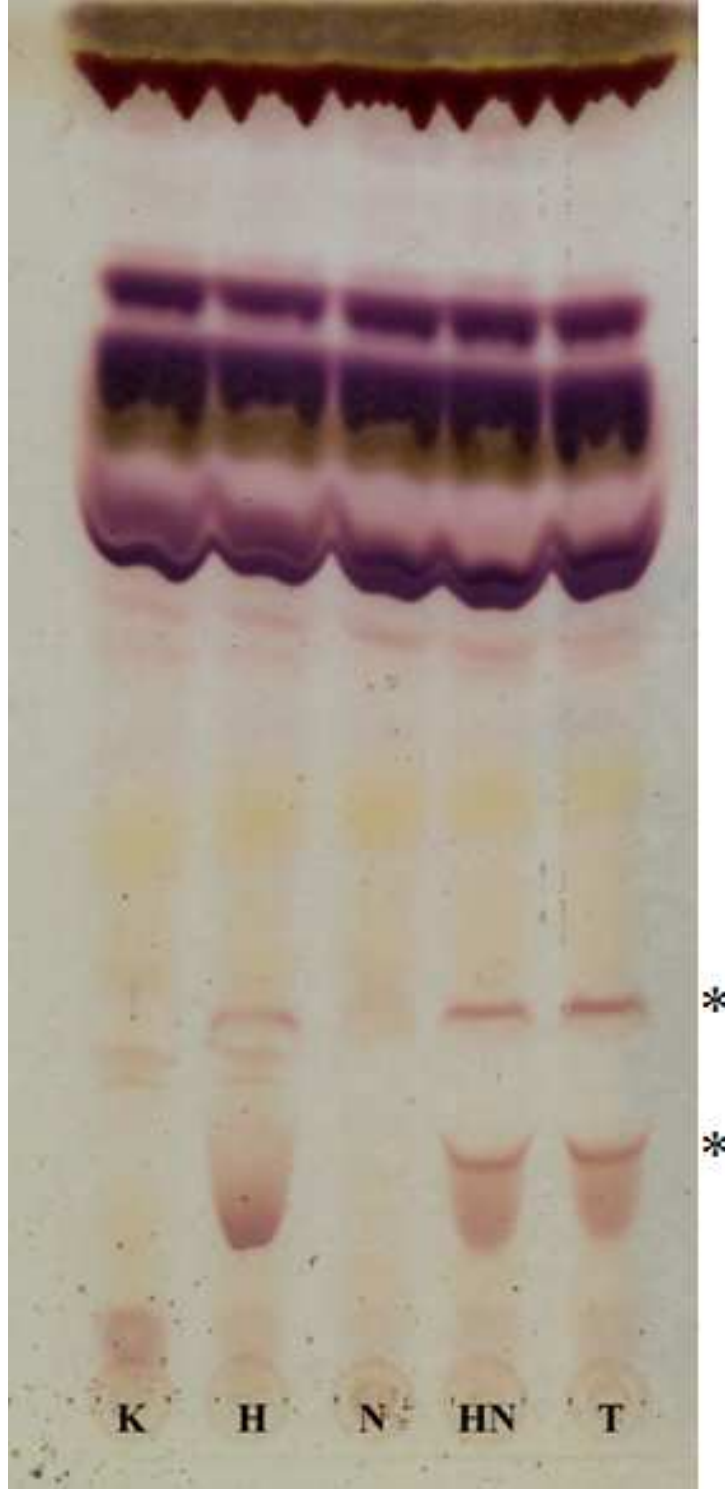
Resim 3.5: 6 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde nötral lipidlerin ince tabaka kromatografisi ile analizi (kloroform–metanol–amonyum–su (65:35:2:3) karışımında yürütme) (*farklılık gösteren bant)



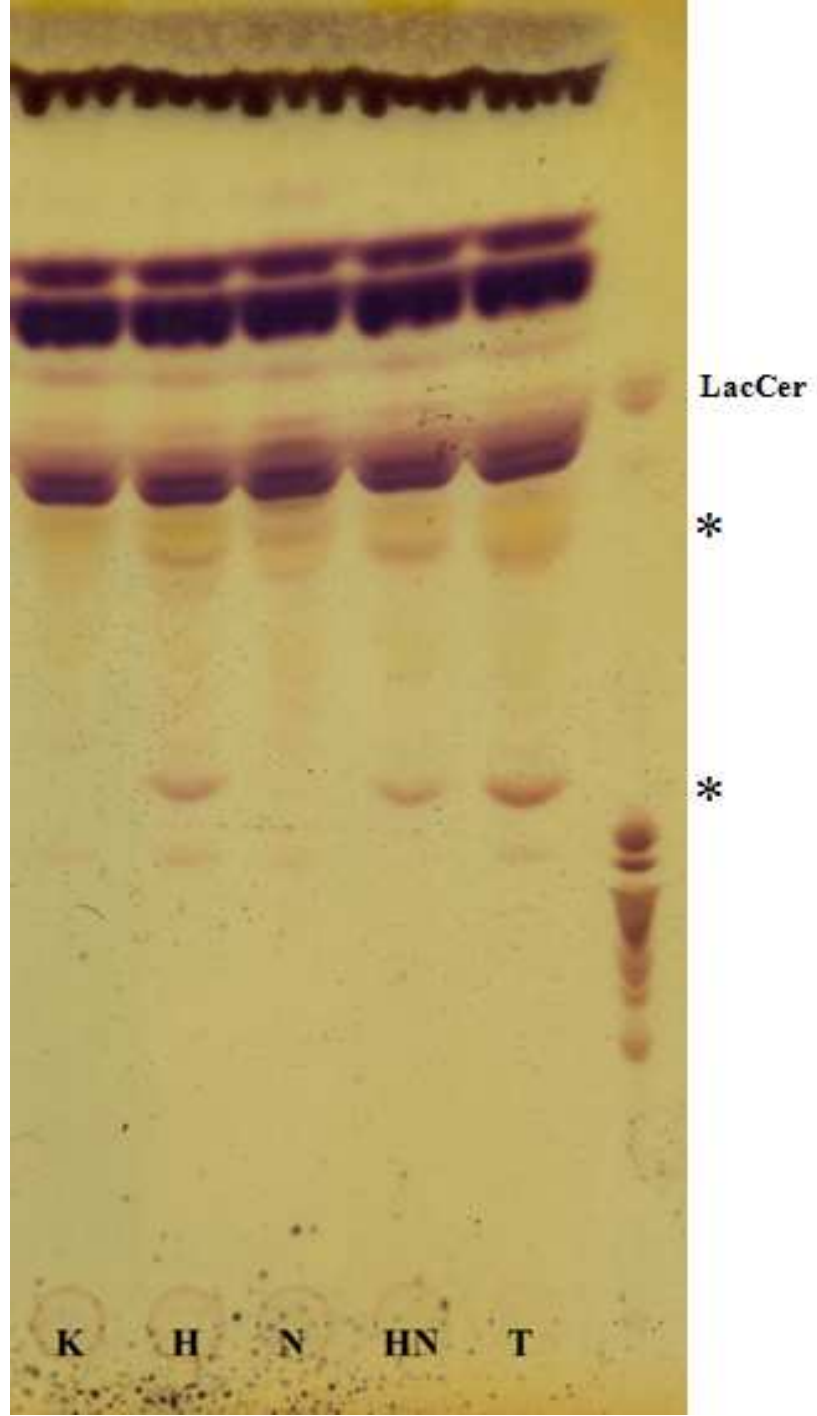
Resim 3.6: 6 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde nötral lipidlerin ince tabaka kromatografisi ile analizi (kloroform–metanol–su (65:35:8) karışımında yürütme) (*farklılık gösteren bant)



Resim 3.7: 9 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerinde asidik lipidlerin (gangliosid) ince tabaka kromatografisi ile analizi (LacCer: Laktozil seramid)

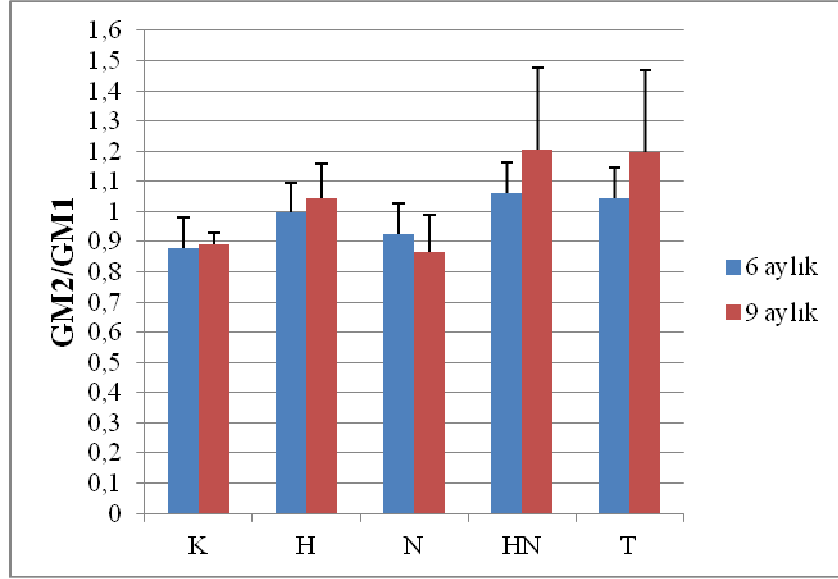


Resim 3.8: 9 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde nötral lipidlerin ince tabaka kromatografisi ile analizi (kloroform–metanol–amonyum–su (65:35:2:3) karışımında yürütme) (*farklılık gösteren bant)



Resim 3.9: 9 aylık kontrol (K), HexA (H), Neu4 (N), HexA-Neu4 (HN) ve HexA-Neu4-Neu1 (T) farelerde nötral lipidlerin ince tabaka kromatografisi ile analizi (kloroform–metanol–su (65:35:8) karışımında yürütme) (*farklılık gösteren bant. LacCer: Laktozil seramid)

İnce tabaka kromatografisi yapıldıktan sonra orsinol boyaması ile ortaya çıkan gangliosid bandlarının yoğunlukları İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde VersaDoc™ Görüntüleme Sistemi ile analiz edilmiş, iki farklı yaş grubunda (6 ve 9 aylık) ve farklı enzim eksikliği olan farelerin gangliosid GM2 ve GM1 oranları tesbit edilmiştir.



Grafik 3.1: 6 ve 9 aylık farelerin gangliosid GM2/GM1 oranları (K:kontrol, H: HexA enzim eksikliği olan, N: Neu4 enzim eksikliği olan, HN: HexA-Neu4 enzim eksikliği olan, T: HexA-Neu4-Neu1 enzim eksikliği olan)

Bölüm 4

TARTIŞMA

Yapılan ince tabaka kromatografisi analizlerinde tek HexA enzim eksikliği olan farede daha önce de yayınlandığı gibi GM2 gangliosidinde bir birikim gözlenmiştir (Yamanaka et al. 1994; Cohen-Tannoudji et al. 1995; Phaneuf et al. 1996). Sialidaz Neu4 enzim eksikliği olan fareler (Neu4^{-/-}) ile birlikte ikili (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}) ve üçlü (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}) enzim eksikliği olan farelerde GM1 gangliosid düzeyinde bir azalış görülmektedir. Daha önce yayınlanan çalışmada sialidaz Neu4'ün gangliosid GD1a'yı yıkarak gangliosid GM1'a dönüştürdüğü gösterilmiştir (Seyrantepe et al. 2008). Bu farelerde Neu4 sialidaz eksikliğinden dolayı zamanla GD1a seviyesinde artış ve GM1 seviyesinde düşüş görülür. İkili enzim eksikliği olan HexA^{-/-}Neu4^{-/-} farelerinde görülen ve kontrol ile HexA^{-/-} faresinden fazla olan gangliosid GM2'de yine daha önce yayınlanan bulgularla örtüşmektedir (Seyrantepe et al. 2010). Araştırmamızda 6 ve 9 aylık üçlü enzim eksikliği olan farelerin gangliosid (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}Neu1^{-/-}) içeriklerinin kontrol ve HexA enzim eksikliği olan fare modelinden farklı olmasına karşın ikili enzim eksikliği olan (HexA^{-/-}Neu4^{-/-}) fareden çok az farkı olduğu tesbit edilmiştir. GM2/GM1 oranlarının HexA enzim eksikliği, HexA-Neu4 ikili enzim eksikliği ve HexA-Neu4-Neu1 üçlü enzim eksikliği olan farelerde kontrole göre yüksek olması HexA eksikliğine bağlı GM2 birikiminden kaynaklanmaktadır. 9 aylık farelerde bu oranın daha fazla olması ise birikimin zamana bağlı olarak arttığını göstermektedir (Grafik 3.1). 1-3 ve 6 aylık fareler çiftleştirme sonucu elde edilmiştir. 6 aylık farelerin analizi sonucu HexA-Neu4-Neu1 üçlü enzim eksikliği olan ile HexA-Neu4 ikili enzim eksikliği olan farelerin gangliosid içeriklerinde belirgin farklılık görülmeyince fareler daha fazla yaşlandırılmamış, 9 aylık beyin dokusundan elde edilen ve lizofilize edilerek daha önce saklanan lipid örnekleri Kanada'da bulunan Dr. Pshezhetsky'nin laboratuvarından getirtilerek çalışılmıştır. Gangliosid GM2 ve GM1 yanında GD1a, GT1a, GD3 gibi daha karmaşık gangliosidlerde ve laktozil seramid ve seramid gibi daha basit lipidlerde de farklılıklar ince tabaka kromatografi plaklarında görülmektedir (Resim 3.3, 3.4, 3.7). Projemiz kapsamında enzim eksikliğine bağlı olarak daha önce hiç çalışılmamış olan diğer lipidlerin miktarlarında olabilecek değişimleri gözlemek için HexA, Neu4, HexA-Neu4 ve HexA-Neu4-Neu1 enzim eksiklikleri olan farelerden özellikle nötral lipidler izole edilmiş ve ince tabaka kromatografi ile analiz

edilmiştir. Ancak kromatografi sonuçlarında da görüldüğü gibi nötral lipidler asidik lipidlerin aksine net olarak ayrıştırılamamıştır (Resim 3.5, 3.8). İki farklı yürütme çözeltisi kullanılmıştır ve amonyum içermeyen çözelti ile koşturulan örneklerden (Roche et al. 2001) bantlar daha net elde edilmiştir. HexA, Neu4, HexA-Neu4 ve HexA-Neu4-Neu1 enzim eksikliği içeren örneklerin nötral lipid içeriklerinin kontrol grubundan farklı olduğu ilk defa çalışmalarımızda gösterilmiştir (Resim 3.6, Resim 3.9). Özellikle HexA-Neu4 ikili enzim eksikliği olan fareler ile HexA-Neu4-Neu1 üçlü enzim eksikliği olan fareler arasında nötral lipid bakımından bazı farklar gözlenmemiştir. Nötral lipidlerin MS/MS kullanılarak analizi ve yeni bantların tanımlanması planlanmaktadır. Ayrıca lizizomal depo hastalıklarında genel olarak lizizomlardaki birikim yaşa bağlı olduğu için ileri yaştaki farelerin analiz edilmesi Neu1'in lipid yıkım yolağındaki rolü hakkında daha net sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır. Araştırmamızda kullanılan en yaşlı fareler 9 aylıktır.

Çalışmamızda sialidaz Neu1 eksikliğinin farelerdeki gangliosid yıkım yolağı üzerine az bir etkisi olduğu görülmüştür. Ancak sadece bu araştırmamıza dayanarak sialidaz Neu1'in gangliosid metabolizmasındaki rolü hakkında kesin bir sonuca varmak mümkün değildir. Öyle ki çalışmada kullanılan üçlü enzim eksikliği olan farelerde sialidaz Neu1'in % 8-10'luk bir aktivitesi bulunmaktadır. Bu aktivitenin GM2'yi yıkacak güçlü bir aktivite olup birikmesini engellediği düşünülmüştür. Lizozomal enzimlerin genel olarak kritik eşik değerinin olduğu bilinmektedir. Lizozomal depo hastalıklarında enzim aktivitesinin ancak 0-5 % olan değerlerinde lizizomlarda birikimin görüldüğü ve ağır seyreden bir klinik tablo ortaya çıktığı bilinmektedir. 5-7% olan değerlerde ise lizozomal birikim daha uzun sürmekte ve hastalarda daha hafif bir klinik bulgular bulunmaktadır (Conzelmann ve Sandhoff 1983).

Araştırmamızda oluşturulan tekli, ikili ve üçlü enzim eksikliği olan farelerin daha ayrıntılı bir şekilde analiz edilmesi kütle spektrofotometrisi kullanılarak mümkün olabilir. Aynı zamanda %0 sialidaz Neu1 enzim aktivitesi olan fare yaratılarak HexA^{-/-} fare ile çiftleştirilmek sureti ile çift enzim eksikliği olan fareler yaratılabilir. Bu farelerde gangliosidlerdeki farklılıklar yine ince tabaka kromatografi ve anti-GM2 antikollarının kullanıldığı immünohistokimyasal teknikler ile analiz edilebilir. Böylece sialidaz Neu1'in yıkım yolağındaki rolü daha kesin bir şekilde aydınlatılabilir. Ayrıca Neu2 ve Neu3 gibi sialidazların rolünü test etmek amacıyla bu sialidazlarında eksikliği olan fareler yaratılabilir ve bu fareler HexA^{-/-} ile çiftleştirilerek beyindeki gangliosid profilleri analiz edilebilir.

Öyleki henüz yayınlanmayan bir başka çalışma sonuçları sialidaz Neu1'in faredeki gangliosid yıkım yolağında rol oynayan tek sialidaz olmadığı ve Neu3 sialidazında bu yıkımda görev yapabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKÇA

- Cohen-Tannoudji, M., Marchand, P., Akli, S., Sheardown, S. A., Puech, J. P., Kress, C., Gressens, P., et al. Disruption of murine Hexa gene leads to enzymatic deficiency and to neuronal lysosomal storage, similar to that observed in Tay-Sachs disease. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 6(12), 844-9. (1995)
- Conzelmann, E., & Sandhoff, K. Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Developmental neuroscience*, 6(1), 58-71. (1983)
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 226(1), 497-509. (1957)
- Phaneuf, D., Wakamatsu, N., Huang, J. Q., Borowski, A., Peterson, A. C., Fortunato, S. R., Ritter, G., et al. Dramatically different phenotypes in mouse models of human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Human molecular genetics*, 5(1), 1-14. (1996)
- Roche, N., Larsson, T., Angström J., and Teneberg, S. Helicobacter pylori-binding gangliosides of human gastric adenocarcinoma. *Glycobiology*. Vol 11, no 11, pp 935-944 (2001)
- Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M. P., et al. Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nature genetics*, 11(2), 170-6. (1995)

- Seyrantepe, V., Landry, K., Trudel, S., Hassan, J. A., Morales, C. R., & Pshezhetsky, A. V. Neu4, a novel human lysosomal lumen sialidase, confers normal phenotype to sialidosis and galactosialidosis cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(35), 37021-9. (2004)
- Seyrantepe, V., Canuel, M., Carpentier, S., Landry, K., Durand, S., Liang, F., Zeng, J., et al. Mice deficient in Neu4 sialidase exhibit abnormal ganglioside catabolism and lysosomal storage. *Human molecular genetics*, 17(11), 1556-68. (2008)
- Seyrantepe, V., Lema, P., Caqueret, A., Dridi, L., Bel Hadj, S., Carpentier, S., Boucher, F., et al. Mice doubly-deficient in lysosomal hexosaminidase A and neuraminidase 4 show epileptic crises and rapid neuronal loss. *PLoS genetics*, 6(9). (2010)
- Yamanaka, S., Johnson, M. D., Grinberg, A., Westphal, H., Crawley, J. N., Taniike, M., Suzuki, K., et al. Targeted disruption of the Hexa gene results in mice with biochemical and pathologic features of Tay-Sachs disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9975-9. (1994)

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 111S018
Proje Başlığı: β -Hekzosaminidaz A ve sialidaz enzim eksikliği olan farelerde beyin lipid profilinin çıkarılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç. Dr. Volkan Seyrantepe Süleyman Can Öztürk Zehra Kevser Timur (Pekmezci) Murat Delman
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Gülbahçe Köyü Urla/ İzmir
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Tunus Caddesi No:80 06100 Kavaklıdere / Ankara
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.06.2011 – 01.06.2012
Öz (en çok 70 kelime) <p>Tay-Sachs hastalığının patolojisini daha iyi anlamak ve uygun ilaç tedavi yöntemleri geliştirmek amacı geliştirilen olan fare modeli insandaki lizozomal depo hastalığı bulgularını göstermediğinden fare glikolipid yıkım yolağında bir ya da daha fazla sialidaz enziminin yer aldığı bir bypass mekanizmasının varlığı öne sürülmüştür (Sango K et al. 1995). Bu hipotezi test etmek amacı ile üç enzim (β-Hekzosaminidaz A, sialidaz Neu4 ve sialidaz Neu1) eksikliği olan farelerin beyin lipid profili karşılaştırılmış ve sialidaz Neu1 enziminin bu yolak üzerine sınırlı düzeyde bir etkisinin olduğu gözlenmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler: Tay-Sachs, fare modeli, sialidaz,
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

Proje ekibinde bulunan burslu Yüksek Lisans öğrencisi Süleyman Can Öztürk'ün tez çalışması halen devam etmektedir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar Gordon Conference Series kapsamında Nisan 2012'de İtalya Luca'da düzenlenen "Glycolipid & Sphingolipid Biology" konferansında ve Haziran 2012'de EMBO kapsamında İstanbul Yeditepe Üniversitesinde yapılan "EMBO Young Scientists' Forum 2012" adlı öğrenci forumunda "Lysosomal Sialidase Neu1 Contributes to Metabolic Bypass in Tay-Sachs Disease Mouse Model" başlıklı poster ile sunulmuştur.

Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.

Proje Adı	Proje Yürütücüsü:
<p align="center">(PROJE ŞEKİL/GRAFIK/ FOTOĞRAF)</p> <p><i>(En fazla 4 tane – jpg formatında, 35 x 35 cm (300 dpi)):</i> İsimleriyle ve şekil altı açıklamalarıyla birlikte sıralanmış olarak formda belirtilmesi ve 300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyaları halinde formun ekleri olarak gönderilmesi gerekmektedir.</p>	Proje No:
	Destek Miktarı (TL):
	Proje Başlama-Bitiş Tarihi:
	Yürütücü Kuruluş:
	<p align="center">(PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ FOTOĞRAF)</p> <p><i>300 dpi çözünürlükte ayrı jpeg dosyası olarak forma eklenmelidir.</i></p>
Projenin Amacı ve Önemi <i>(En fazla 150 kelime)</i> (Maddeler halinde sıralayınız)	
Proje ile Elde Edilen veya Beklenen Bilimsel, Teknolojik, Ekonomik ve Sosyal Kazanımlar <i>(En fazla 200 kelime)</i>	
Proje için TÜBİTAK Desteğinin Önemi <i>(En fazla 150 kelime)</i>	

ARDEB BAŞARI ÖYKÜSÜ

1. Proje yürütücüsü iletişim bilgileri:

Adı – Soyadı : Volkan Seyrantepe

Unvanı : Doç. Dr.

Telefon : 05309334657

E-posta adresi : volkanseyrantepe@iyte.edu.tr