



T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOPAMİNERJİK VE SERATONERJİK SİNİR HÜCRELERİNDE
OLUŞTURULAN SİTOKROM C OKSİDAZ EKSİKLİĞİNİN ETKİLERİNİN
DROSOPHİLA MELANOGASTER ÜZERİNDE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. BURAK OYMAK

DANIŞMAN

Prof. Dr. VURAL KÜÇÜKATAY

DENİZLİ-2019

T.C.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOPAMİNERJİK VE SERATONERJİK SİNİR HÜCRELERİNDE
OLUŞTURULAN SİTOKROM C OKSİDAZ EKSİKLİĞİNİN ETKİLERİNİN
DROSOPHILA MELANOGASTER ÜZERİNDE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. BURAK OYMAK

DANIŞMAN

Prof. Dr. VURAL KÜÇÜKATAY

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 14-08-2018 tarih ve 18 nolu kararı ile desteklenmiştir (2018TIPF034).

DENİZLİ-2019

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY danışmanlığında Dr. Burak OYMAK tarafından yapılan “**Dopaminerjik ve Seratonerjik Sinir Hücrelerinde Oluşturulan Sitokrom C Oksidaz Eksikliğinin Etkilerinin *Drosophila melanogaster* Üzerinde Araştırılması**” başlıklı tez çalışması 25/06/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalında TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN

ÜYE: Prof. Dr. Bayram YILMAZ

ÜYE: Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Osman Çiftçi

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, değerli tez danışmanım Prof. Dr. Vural Küçükata'y'a

Tezimin her aşamasında çok büyük emeği geçen, bilimin öncü kuruluşlarından birinde önemli tecrübeler edinmeme ön ayak olan, bana ikinci tez danışmanlığı yapan, Helsinki Üniversitesi öğretim üyesi Dr. Çağrı Yalçın'a;

Sayılsız kere bilgilerine ve tecrübesine danıştığım değerli hocam Prof. Dr. Melek Bor-Küçükata'y ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Saadettin Çalışkan başta olmak üzere, Fizyoloji Anabilim Dalında görevli öğretim üyelerine;

Çalışmalarım süresince yardımlarını ve laboratuvarını benden esirgemeyen Tampere Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Howard T. Jacobs ve Helsinki Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Ville Hietakangas'a;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, beni tez yazma sürecinde destekleyen değerli asistan arkadaşlarıma ve asistanlığım süresince bilgi alışverişinde bulunduğumuz Pamukkale Üniversitesinin değerli genç araştırmacılarına;

Son olarak beni olduğum kişi haline getiren, yaşamımın en değerlileri, koşulsuz sevgi kaynaklarım, canım aileme ve dedeme teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Burak Oymak

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR	1
İÇİNDEKİLER	2
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	5
ŞEKİLLER DİZİNİ	8
TABLolar DİZİNİ	9
ÖZET.....	10
SUMMARY	11
GİRİŞ	12
GENEL BİLGİLER.....	14
2.1. MİTOKONDİRİ	14
2.1.1. Mitokondri Tarihi	14
2.1.2. Mitokondri Yapısı	14
2.1.3. Mitokondri Metabolik Fonksiyonları.....	16
2.2. MİTOKONDİRİYAL HASTALIKLAR	22
2.2.1. Primer Mitokondriyal Hastalıklar	22
2.2.2. Sekonder Mitokondriyal Bozukluklar	24
2.3. BİR MODEL OLARAK <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	25
2.3.1. Yaşam Döngüsü.....	25
2.3.2. Cinsiyet Tayini.....	27

2.3.3.	Korunmuş moleküler mekanizmalar	28
2.3.4.	<i>Drosophila</i> Nöroanatomisi	29
2.3.5.	<i>Drosophila</i> Genetik Özellikleri.....	30
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....		34
3.1.	KULLANILAN <i>DROSOPHILA</i> HATLARI	34
3.2.	KULLANILAN KİMYASALLAR	35
3.3.	HAZIRLANAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER.....	36
3.3.1.	PBS -Triton X Çözeltisi (PBSTx):	36
3.3.2.	Bloklama Çözeltisi:	36
3.3.3.	Hemolymph-like saline 3.1 (HL3.1):.....	36
3.3.4.	%4 Formaldehit Solüsyonu:	36
3.4.	MALT AGAR BESİ ORTAMI	37
3.4.1.	Besi Ortamı Hazırlanması.....	37
3.5.	KULLANILAN ANTİKORLAR	38
3.6.	SİNEK KÜLTÜRÜ.....	38
3.6.1.	Sineklerin Cinsiyet Ayrımı	39
3.6.2.	Bakire Sineklerin Toplanması	39
3.6.3.	Anestezi İşlemi.....	40
3.6.4.	Çaprazların Kurulması	42
3.6.5.	Sineklerin Teminasyonu	42
3.7.	MOTOR FONKSİYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ	42
3.7.1.	Tırmanma Testi İçin Grupların Oluşturulması	42
3.7.2.	Tırmanma Deneyi	46
3.8.	ÖMÜR UZUNLUKLARININ BELİRLENMESİ	47
3.8.1.	Grupların Oluşturulması	47
3.8.2.	Ömür Deneyi	48

3.9. PUPAL ÖLÜM ORANLARININ BELİRLENMESİ	49
3.9.1. Grupların Oluşturulması	49
3.9.2. Pupa Ölüm Deneyi	50
3.10. İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER	50
3.10.1. Grupların Oluşturulması.....	51
3.10.2. Beyin Diseksiyonu.....	51
3.10.3. Çıkarılan Beyinlerin Fiksasyonu	52
3.10.4. Boyama işlemi	52
3.10.5. Dokuların Lama Yüklenmesi	53
3.10.6. Görüntü Analizi ve Hücre Sayımı.....	53
3.11. İSTATİSTİK YÖNTEMLER.....	53
BULGULAR.....	55
4.1. HAREKET BOZUKLUKLARININ BELİRLENMESİ.....	55
4.2. ÖMÜR UZUNLUKLARININ BELİRLENMESİ	55
4.3. PUPAL ÖLÜM ORANLARININ BELİRLENMESİ	57
4.4. İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI.....	58
4.4.1. Kolokalizasyon Oranlarının Değerlendirilmesi	60
TARTIŞMA	62
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR	73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BSA	: Sığır serum albümini
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum klorür
COX	: Sitokrom c oksidaz
DA	: Dopamin
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dsRNA	: Double stranded RNA
EGFP	: Enhanced GFP, GFP-1c9
ETZ	: Elektron transport zinciri
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FADH	: İndirgenmiş flavin adenin dinükleotid
g	: Gram
GDP	: Guanozin difosfat
GFP	: Yeşil floresan protein
GTP	: Guanozin trifosfat
HCl	: Hidroklorik asit
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazinetansülfonik asit
HL	: Hemolymph-like saline
KCl	: Potasyum klorür
M	: Mol

MELAS	: Mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz, stroke benzeri epizodlar
mg	: Miligram
MgCl₂.6H₂O	: Magnezyum klorür
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mRNA	: Mesajcı RNA
mtDNA	: Mitokondriyal deoksiribo nükleik asit
mtRNA	: Mitokondriyal ribo nükleik asit
NaCl	: Sodyum klorür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit
PBS	: Fosfatlı tampon çözeltisi
PBSTx	: Pbs -triton x solüsyonu
Pi	: İnorganik fosfat
PMH	: Primer mitokondriyal hastalıklar
Q	: Ubikinon, coenzim Q
QH₂	: Ubiquinol
RING	: Rapid iterative negative geotaxis
RISC	: RNA induced silencing complex
RNA	: Ribo nükleik asit
RNAi	: RNA interferans
SDH	: Süksinat dehidrogenaz

siRNA : Small interfering RNA

SMB : Sekonder mitokondiyal bozukluklar

SSS : Santral sinir sistemi

UAS : Upstream activation sequence

µg : Mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

ŞEKİL 1. TCA DÖNGÜSÜ.	17
ŞEKİL 2. ETZ ŞEMATİK GÖSTERİMİ.	19
ŞEKİL 3. COX ENZİMİ YAPISI.	21
ŞEKİL 4. YAŞAM DÖNGÜSÜ.	27
ŞEKİL 5. DOPAMİN VE SEROTONİN SENTEZ YOLAĞI.	30
ŞEKİL 6. GAL4-UAS İKİLİ SİSTEMİ.	32
ŞEKİL 7. CİNSİYET AYRIMINI SAĞLAYAN ANATOMİK YAPILAR.	39
ŞEKİL 8. BAKİRE SİNEK GÖRÜNTÜSÜ.	40
ŞEKİL 9. KULLANILAN ANESTEZİ YÖNTEMLERİ.	41
ŞEKİL 10. PAN-NÖRONAL COX KNOCKDOWN GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.....	43
ŞEKİL 11. TH KNOCKDOWN GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.	43
ŞEKİL 12. TH KONTROL GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.	44
ŞEKİL 13. DDC KNOCKDOWN GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.	44
ŞEKİL 14. DDC KONTROL GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.	45
ŞEKİL 15. TRH KNOCKDOWN GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.....	45
ŞEKİL 16. TRH KONTROL GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.....	46
ŞEKİL 17. TIRMANMA DENEYİ İÇİN KULLANDIĞIMIZ PLATFORM.....	47
ŞEKİL 18. BEYİN DİSEKSİYONU AŞAMALARI VE BEYİN DOKUSU.	52
ŞEKİL 19. GRUPLARIN HAREKET KABİLİYETLERİNİN TIRMANMA DENEYİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ.	55
ŞEKİL 20. GRUPLARDAKİ CANLI ORANININ ZAMANA BAĞLI DEĞİŞİMİNİN KAPLAN- MEIER EĞRİLERİ İLE GÖSTERİLMESİ.....	56
ŞEKİL 21. GRUPLARIN HAYATTA KALIM ORANLARI.....	58
ŞEKİL 22. TH>STİNGER SİNEKLERDE FLORESAN GÖRÜNTÜLEME.	59
ŞEKİL 23. DDC>STİNGER SİNEKLERDE FLORESAN GÖRÜNTÜLEME.	59
ŞEKİL 24. TRH>STİNGER SİNEKLERDE FLORESAN GÖRÜNTÜLEME.	60
ŞEKİL 25. GRUPLARIN ANTI-TH ANTİKORU İLE KOLOKALİZASYON ORANLARI (%).	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

TABLO 1. SİNEK HATLARI, EKSPRESYON ÖZELLİKLERİ VE KAYNAKLARI.	35
TABLO 2. BESİ ORTAMI İÇİNDEKİLER LİSTESİ VE MİKTARLARI	37
TABLO 3. PRİMER ANTİKORLARIN MARKA VE KATALOG NUMARALARI.	38
TABLO 4. SEKONDER ANTİKORLARIN MARKA VE KATALOG NUMARALARI.	38
TABLO 5. ÖMÜR UZUNLUKLARININ ORTALAMA, ORTANCA DEĞERLERİ, STANDART HATALARI VE GÜVEN ARALIĞI DEĞERLERİ	57

ÖZET

Dopaminerjik ve serotonerjik sinir hücrelerinde oluşturulan sitokrom c oksidaz eksikliğinin etkilerinin *Drosophila melanogaster* üzerinde araştırılması

Dr. Burak Oymak

Mitokondriyal hastalıklar, en sık görülen kalıtsal metabolik bozukluklar arasındadır. Sitokrom c oksidaz (COX) mutasyonları mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının en sık sebeplerinden biridir. Pan-nöronal COX eksikliğinin, *Drosophila melanogaster*'de lokomasyonu bozduğunu gösterilmiştir. Dopaminerjik nöronların hareket bozukluğu ile seyreden hastalıklarda rol oynadığı bilinmektedir. Hipotezimiz Pan-nöronal COX eksikliğinde oluşan hareket bozukluğunun patofizyolojisinde rol alan temel nöron grubunun dopaminerjik nöronlar olabileceğiydi. Bu amaçla çalışmamızda dopaminerjik nöronlarda oluşturulan COX eksikliğinin harekete olan etkilerini araştırmayı ve oluşturulan eksikliğin pupa gelişimine, ömür uzunluğuna etkilerini incelemeyi amaçladık. Gal4/UAS ikili sistemini kullanılarak sadece dopaminerjik (THKD), dopaminerjik ve serotonerjik (DDCKD), sadece serotonerjik (TRHKD) ve pan-nöronal (PKD) COX enzimi susturulmuş gruplar oluşturuldu. Gruplar tırmanma deneyine tabi tutuldu. PKD grubunda hareket bozukluğu olduğu görülürken diğer gruplarda anlamlı bir fark bulunamadı. Bunun yanında grupların ömür uzunluklarının ve pupal letalite oranlarının farkı değerlendirildi. PKD grubu diğerlerine göre anlamlı şekilde kısa ömre sahip olup, THKD grubu kontrole göre kısa ömürlü olduğu gözlemlendi. Grupların pupal ölüm oranları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Kullandığımız sinek hatlarının teyidi için Gal4 hatlarının nükleer GFP ifade etmeleri sağlandı ve anti-TH antikoru ile ikili immun boyaması yapılarak kolokalizasyonlar değerlendirildi. Sonuç olarak nöronlarda COX eksikliği sonucu oluşan bozukluğun dopaminerjik ve serotonerjik nöronlardan kaynaklanmadığı ve PKD ve THKD grubunda yaşam süresinin kısaldığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sitokrom c oksidaz, Mitokondriyal hastalıklar, Nörodejenerasyon

SUMMARY

Investigating the effects of cytochrome c oxidase deficiency in dopaminergic and serotonergic neurons in *Drosophila melanogaster*.

Dr. Burak Oymak

Mitochondrial diseases are among the most common inherited metabolic disorders. Cytochrome c oxidase (COX) mutations are some of the most common causes of mitochondrial disorders. Previous studies have shown that pan-neuronal COX deficiency impairs locomotion in *Drosophila melanogaster*. Dopaminergic neurons play a significant role in locomotion disorders such as Parkinson's disease. In this study, our hypothesis was that dopaminergic neurons play a significant role in the underlying mechanism of locomotion deficit related to COX deficiency. Consequently, we aimed to investigate the effects of COX deficiency in dopaminergic neurons on mobility and on pupal development and fly longevity. Only dopaminergic (THKD), dopaminergic and serotonergic (DDCKD), serotonergic (TRHKD), and pan-neuronal (PKD) COX deficiency groups were formed by using the *Drosophila* Gal4 / UAS binary expression system. The groups were subjected to climbing assay, lifespan assay, and pupal lethality assay. THKD, TRHKD, or DDCKD groups did not show locomotion disorders. Pan-neuronal COX deficiency lead to impaired locomotion as expected but no significant difference was found in other groups. The PKD group had a significantly shorter lifespan than the others and, the THKD group had a shorter lifespan than the control group. Pupal lethality assay showed no significant difference between COX knockdown groups and control group. Additionally, nuclear GFP-expressing Gal4 fly lines co-immunostained using anti-TH antibody to evaluate colocalizations which is a proof of dopaminergic expression. As a result, it is shown that dopaminergic and serotonergic neurons are not likely to be responsible for the locomotion disorder caused by COX deficiency in neurons and that the life span in PKD and THKD group is shortened.

Keywords: Cytochrome c oxidase, Mitochondrial diseases, Neurodegeneration

GİRİŞ

Mitokondri hücre içinde başta ATP üretimi olmak üzere pek çok metabolik sürece ev sahipliği yapan, çift membranlı bir organeldir. ATP üretimi mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zinciri (ETZ) enzim komplekslerinin üzerinden elektronlar akarken oluşturdukları proton gradiyentinden yararlanılarak ATP sentaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Elektronlar, sitokrom c oksidaz (COX) üzerinden son durakları olan moleküler oksijene aktarılarak su oluşumuna sebep olur.

Mitokondriyal kompleks IV olarak da adlandırılan COX, ETZ'nin son enzimidir. İndirgenmiş sitokrom c molekülündeki elektronların moleküler oksijene transferini katalizler ve bu esnada membranlar arası boşluğa proton taşır. COX 13 farklı altbirimden oluşmuş oldukça kompleks yapılı bir enzimdir. Bu altbirimlerin ve bunlara ek birleşme faktörlerinin bir araya gelmesi oldukça iyi düzenlenmiş komplike bir süreçtir (1). Bu birleşme faktörlerinden olan SURF1 mutasyonu ağır hareket bozuklukları ve nekrotik beyin lezyonları ile seyreden Leigh Sendromunun en sık sebeplerindendir (2).

Mitokondriyal enzim komplekslerini etkileyen mutasyonlar ve kimyasal inhibitörler ETZ üzerindeki elektron akışını bozar. Bu durum proton gradiyentinin oluşmasını sekteye uğratarak ATP oluşumunu azaltır. Bu durum aynı zamanda elektronlar doğru bir biçimde moleküler oksijene aktarılamadığı için reaktif oksijen radikallerinin oluşmasına ve artmış oksidatif stressin protein, lipid ve mitokondriyal DNA üzerinde hasarlayıcı etkiler oluşturmasına sebep olabilir.

Mitokondriyal hastalıklar, ETZ enzimlerini etkileyen işlev bozukluklarında ortaya çıkar ve en sık görülen kalıtsal metabolik bozukluklar arasındadır. Mitokondriyal hastalıklar her yaşta ve her organda bulgu verebilirler fakat ATP ihtiyacının yüksek olduğu santral sinir sistemi (SSS), böbrekler, karaciğer, iskelet ve kalp kası gibi dokular ETZ enzim eksikliklerinde en fazla etkilenen dokulardır. Bunun yanında günümüze kadar olan çalışmalar mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının Alzheimer, Otizm, Parkinson gibi sık görülen hastalıklarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (3–5).

Sitokrom c oksidaz (COX) enzimi mutasyonları mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının en sık sebeplerinden biridir. Mutasyonları prostat kanseri, miyoglobinüri, idiyopatik sideroblastik anemi, rabdomiyoliz, glokom, astenozoospermi, myopati, Leigh Hastalığı, MELAS (mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz, stroke benzeri epizodlar), ensefalomyopati, egzersiz intoleransı, epilepsi ve motor nöron hastalığı benzeri çok çeşitli fenotiplerle ilişkilendirilmiştir (6,7). Alzheimer Hastalığı ile ilişkili olabileceği de düşünülmektedir. (8,9).

Önceki çalışmalar, tüm nöronlarda oluşturulan COX enzim eksikliğinin, *Drosophila melanogaster*'de hareket yeteneğini ciddi şekilde bozduğu ve bazı COX altbirim eksikliklerinin yaşam sürelerini kısalttığını göstermiştir (10–12).

Memelilerdeki gibi sineklerde de dopaminerjik sistem pek çok önemli davranışta görev almaktadır. İnsanda dopaminerjik sistem bozuklukları pek çok hastalık ile ilişkilendirilmiştir. En iyi bilinenlerinden biri dopaminerjik nöron kaybı ile seyreden Parkinson hastalığıdır.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı; pan-nöronal COX eksikliğinde oluşan hareket bozukluğunun dopaminerjik nöronlarla olan ilişkisinin araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda Gal4-UAS ikili sistemi aracılığı ile dopaminerjik nöronlarda COX eksikliği oluşturulmuş bunun yanında DDC-Gal4 aracılı gen ifadesinin serotonerjik nöronlarda da gerçekleşmesi sebebi ile çalışma serotonerjik nöronları da kapsayacak şekilde genişletilmiştir. COX eksikliği oluşturulmuş gruplar, lokomotor aktivite, pupal ölüm oranları ve ömür uzunlukları açısından araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. MİTOKONDRI

2.1.1. Mitokondri Tarihi

1840'lı yıllarda ışık mikroskobu ile yapılan çalışmalar hücre içinde bakteri benzeri yapıların fark edilmesine yol açmıştır (13). Richard Altmann 1890 yılında bu yapıların bir organel olduğunu bildirmiş ve bioblasts adını vermiştir. Bu organel daha sonra Carl Bende tarafından mitokondrion (çoğulu mitokondria) olarak adlandırılmıştır. İpliksi granül anlamına gelen mitokondrion Grekçe mitos (iplik) ve chondos (granül) kelimelerinden türetilmiştir.

Benjamin F. Kingsbury, yaptığı morfolojik gözlemlerle 1912 yılında mitokondriyi solunum ile ilişkilendiren ilk araştırmacı olmuştur (14). 1925 yılında David Keilin'in sitokromları keşfine (15) kadar mitokondrinin solunumla olan ilişkisi netleşmemiştir. 1941'de adenzin trifosfat (ATP) molekülünün fosfat bağlarının bir hücresel enerji kaynağı olduğu Fritz Albert Lipmann tarafından ortaya atılmıştır (15). Takip eden yıllarda hücresel solunumun anlaşılması için çalışmalar devam etmişti fakat mitokondri ile ilişkisi bilinmiyordu. Albert Claude, hücre fraksiyonasyon yöntemi sayesinde mitokondri hücrenin diğer bileşenlerinden ayrılabilir hale gelmiş. Bu sayede sitokrom oksidaz ve oksidatif fosforilasyondan sorumlu diğer enzimlerin mitokondride yer aldıkları anlaşılmıştır (13). Bunu takip eden yıllarda mitokondri yapısı daha detaylı görüntülenerek çift membranlı yapısı anlaşılmış, mitokondriyal ribozomlar keşfedilmiş, mitokondriyal DNA keşfedilerek gen haritası çıkarılmış ve mitokondriyal hastalıkların genetik temelleri üzerine çalışılmıştır.

2.1.2. Mitokondri Yapısı

Mitokondri fosfolipid tabaka ve proteinlerden oluşmuş 2 membrana sahiptir (16). Bu membranlar mitokondriyi her biri spesifik işlevlerde görev alan dört bölüme ayırır.

- a) Dış mitokondriyal membran, sitozol ile membranlar arası boşluğu birbirinden ayırarak seçici geçirgen bir bariyer oluşturur. Bu membran üzerinde bulunan porin isimli kanallar yardımı ile 5000 dalton ve altında olan moleküller serbest şekilde difüze olurlar. İyonlar, gıda molekülleri ve nükleotidler kolayca dış membrandan geçebilir (17,18). Daha büyük moleküllerin taşınmasında aktif transport görev alır. Bunun yanında dış mitokondriyal membran sitozol ve hücre iskeleti ile etkileşimi sağlayarak mitokondrilerin hücre içi hareketi ve dağılımında görev yapar.
- b) Membranlar arası boşluk, oksidatif fosforilasyonda elektron transport zincirinin (ETZ) protonlarını pompaladığı alandır. Oluşan proton gradiyenti ATP sentezi için kullanılır.
- c) İç mitokondriyal membran, matriks ile membranlar arası boşluğu birbirinden ayırır. Proteinden zengindir. Mitokondride bulunan proteinlerin beşte biri iç mitokondriyal membranda bulunur (16). Üzerindeki crista adı verilen katlantılar yüzey alanını arttırmayı sağlar. ETZ komponentlerinden olan enzim kompleksleri, ATP sentezinden sorumlu ATP sentaz enzimi ve ATP ADP (Adenozin difosfat) değişiminden sorumlu adenin nükleotid translokaz enzimi bu membran üzerindedir. İç membran H^+ , Na^+ ve K^+ da dahil olmak üzere çoğu iyon; ATP, ADP ve piruvat gibi pek çok küçük metabolite geçirgen değildir. Bu sebeple özelleşmiş taşıyıcılar iyon ve moleküllerin transportunda görev alır.
- d) Matriks, iç mitokondriyal membran ile çevrelenmiştir. Bu alan mitokondriyal ribozom, mitokondriyal RNA (mtRNA) ve DNA'yı (mtDNA) içinde barındırır. Oksidatif fosforilasyonda görevli proteinlerin bazılarının transkripsiyonunu ve translasyonunu matrikste gerçekleştirdiği için gerekli enzimlerden zengindir. Bunun yanında mitokondride gerçekleşen piruvat ve yağ asidi oksidasyonu, üre döngüsü, trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, hem sentezi gibi metabolik yollar ile ilgili enzimler de matrikste yer alır.

2.1.3. Mitokondri Metabolik Fonksiyonları

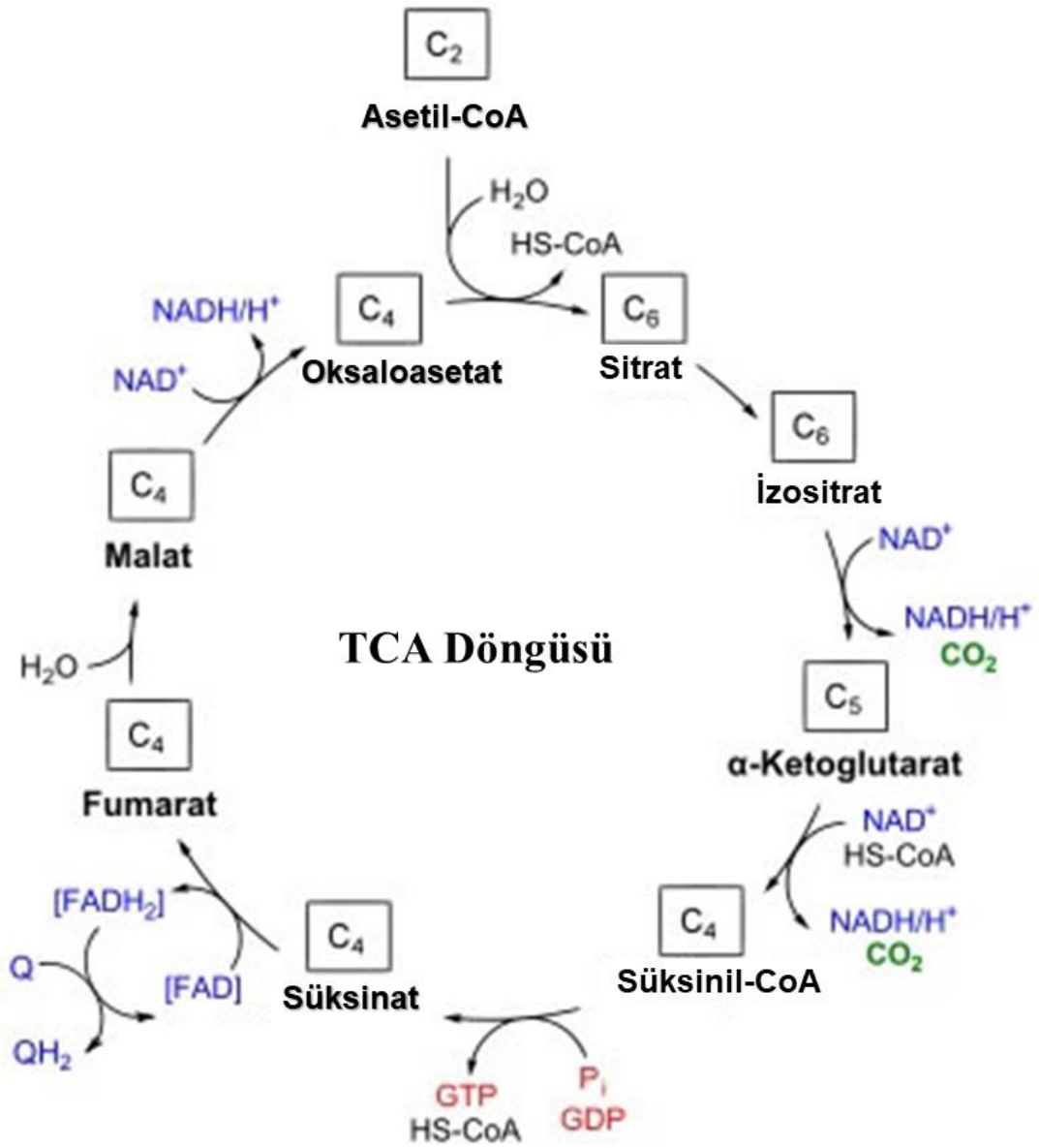
Mitokondri pek çok metabolik faaliyette yer alır. Üre siklusu, Hem biyosentezi, steroid hormonların biyosentezi (19,20), kalsiyum homeostazisi ve depolanması (20), apoptoz (21) ve ısı üretimi (22) mitokondrinin görevleri arasındadır.

Mitokondrinin bir diğer fonksiyonu da yağ asidi oksidasyonudur. Yağ asidi oksidasyonu primer olarak mitokondri matriksinde gerçekleşir. Yağ asitlerinin uzun karbon zincirleri 2 karbonlu asetil-CoA moleküllerine çevrilir. Ortaya çıkan elektron taşıyıcı moleküller ETZ'ye aktarılırken ve asetil-CoA molekülleri TCA döngüsüne katılır (23).

Glikolizden elde edilen piruvat da mitokondri membranını geçerek matrikse gelir, burada asetil-CoA moleküllerine okside edilir. Yağ asitlerinin beta-karboksilasyonu ile elde edilen asetil-CoA molekülleri ile beraber TCA döngüsüne katılır.

Mitokondri içinde, sitrat sentaz enziminin yardımı ile asetil-CoA, oksaloasetat ile birleşerek sitrat ve ardından izositratı oluşturur. Devamında dehidratasyon ve dekarboksilasyon basamakları ile sırası ile alfa-ketoglutarat ve Süksinil-CoA oluşur. Süksinil-CoA'nın Süksinat'a hidrolizi esnasında açığa çıkan enerji ile guanozin difosfat (GDP) ve inorganik fosfat (Pi) birleştirilerek guanozin trifosfat (GTP) sentezlenir. Sırasıyla gelen dehidrojenasyon, hidratasyon, ve ikinci bir dehidrojenasyon basamağı ile oksaloasetat oluşur ve döngü tamamlanır. Ortaya çıkan elektron taşıyıcılar (NADH ve FADH₂) iç mitokondriyal membranda bulunan ETZ'ye katılarak ATP üretimini sağlarlar.

Özet olarak her bir glikoz molekülünden iki asetil-CoA molekülü olduğu için toplamda iki Krebs döngüsü ile 2 ubiquinol (QH₂), 2GTP (guanozin trifosfat), 6 NADH, 2 FADH₂ ve 4 CO₂ elde edilir.



Şekil 1. TCA döngüsü.

2.1.3.1. Oksidatif Fosforilasyon

Glikoz ve yağ gibi enerjiden zengin moleküller bir dizi reaksiyon ile CO₂ ve suya dönüşene kadar indirgenir. Bu süreç esnasında, bazı metabolik ara ürünlerden gelen elektronlar NAD⁺ ve FAD⁺ gibi spesifik koenzimlere aktarılarak NADH ve FADH₂ gibi yüksek enerjili formları elde edilir. Bu indirgenmiş koenzimlerin her biri ETZ'ye bir çift elektron aktarabilir. Elektronlar elektron transport zinciri üzerindeki komplekslerde akarlariken enerjilerinin bir kısmını kaybederler. Bu enerji ile membranlar arası boşluğa pompalanan protonlar bir elektrokimyasal gradiyent

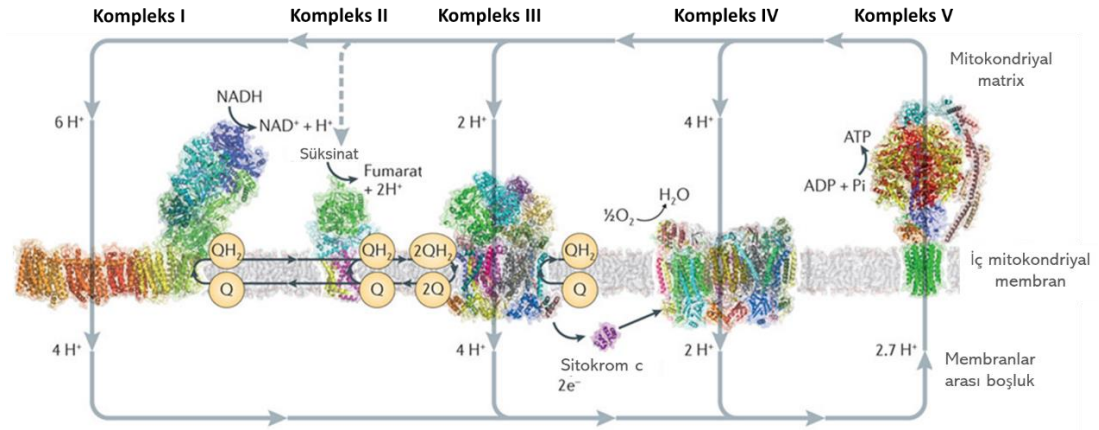
oluşturur. Membranlar arası boşluk ile matriks arasında oluşturulmuş bu potansiyel enerji ATP sentazın (kompleks 5) rotor benzeri yapısını harekete geçirir (24). Bu hareket ADP ile inorganik fosfattan ATP sentezlenmesini sağlar. Bu işlem **oksidatif fosforilasyon** olarak adlandırılır.

Oksidatif fosforilasyon hücre metabolizması için hayati olmak ile beraber süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunda merkezi bir rol aldığı unutulmamalıdır.

2.1.3.2. Elektron Transport Zinciri

Elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon aracılı ATP sentezi mitokondrisi bulunan tüm hücrelerde durmaksızın devam eder. Oksidatif fosforilasyon sırasında gerçekleşen redoks reaksiyonları i mitokondriyal membran üzerindeki bir seri protein kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Bu birbiri ile ilişkili protein grupları elektron transport zinciri (ETZ) olarak adlandırılır. ETZ tüm yakıtlardan elde edilen elektronların oksijen molekülüne aktığı son ortak yolaktır. Elektron transport zinciri beş enzim kompleksine ayrılabilir.

1. Kompleks I, NADH dehidrogenaz, NADH:ubiquinon oksidoredüktaz (EC 1.6.5.3)
2. Kompleks II, süksinat dehidrogenaz (SDH) (EC 1.3.5.1)
3. Kompleks III, Sitokrom bc₁ kompleks, ubiquinol sitokrom c redüktaz (EC 1.10.2.2.)
4. Kompleks IV, Sitokrom C Oksidaz (COX) (EC 1.9.3.1)
5. Kompleks V, ATP sentaz, F₁F₀ ATPase (EC 3.6.3.14)



Şekil 2. ETZ şematik gösterimi.
(25) numaralı referanstan modifiye edilerek kullanılmıştır.

2.1.3.3. Kompleks I (NADH Dehidrogenaz)

45 altbirim bir araya gelmiş ETZ'nin en büyük ve en komplike enzim kompleksidir. Bunların 7'si mtDNA, 38'i nükleer DNA tarafından kodlanır. Üç boyutlu elektron mikroskopi çalışmaları yapısının "L harfine benzer şekilde birbirine dik iki koldan oluştuğunu göstermiştir. Hidrofobik kol iç mitokondriyal membran gömülü olarak bulunurken hidrofilik kol matrikse doğru uzanmış halde bulunmaktadır (26).

Elektronların ETZ'ye giriş yaptıkları ilk yerdir. TCA döngüsü sırasında üretilmiş NADH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid) üzerinden iki elektron alarak yağda çözünen taşıyıcı ubiquinon'a ($Q = \text{coenzim } Q$) aktarır (27). İndirgenmiş ubiquinol (QH_2) membran içinde serbest şekilde difüze olurken Kompleks I, 4 protonu matriksten membranlar arası boşluğa taşıyarak proton gradiyenti oluşmasına katkı sağlar. Bu önemli katkısı yanında reaktif oksijen türlerinin oluşmasında önemli bir kaynak noktadır (28).

2.1.3.4. Kompleks II (Süksinat Dehidrogenaz)

Süksinat dehidrogenaz (SDH) iki hidrofilik iki hidrofobik altbirimden oluşan heterotetramerik bir integral membran proteinidir. İç membranda fakat matriks ile ilişki halinde bulunur. Elektron transport zinciri ve TCA döngüsünün ortak enzimidir.

TCA döngüsü enzimleri içinde membran üzerinde bulunan tek enzim olma özelliğini gösterir.

SDH süksinatın fumarata oksidasyonu katalize ederken oluşan elektronları flavin adenin dinükleotid (FAD) aracılığı ile ubikinon'a aktarır. Kompleks II, Kompleks I'e paralel bir elektron transport yoludur fakat NADH dehidrogenazın aksine membranlar arası boşluğa proton pompalanmaz. Bu sebeple kompleks II, aracılı yol toplamda daha az enerji üretimi sağlar.

2.1.3.5. Kompleks III (Ubiquinol Sitokrom C Redüktaz)

Kompleks III hem mitokondriyal hem de nükleer DNA tarafından kodlanmış toplamda 11 altbirimden oluşan bir transmembran proteinidir. İki elektron taşıyan indirgenmiş coenzim Q'dan, tek elektron kabul eden Sitokrom c'ye elektron transportunu gerçekleştirir. Bu transfer Q döngüsü olarak adlandırılan aşamalı bir süreç ile gerçekleşir. Bir molekül Coenzim Q'nun oksidasyonu sırasında membranlar arası boşluğa 4 proton aktarılır.

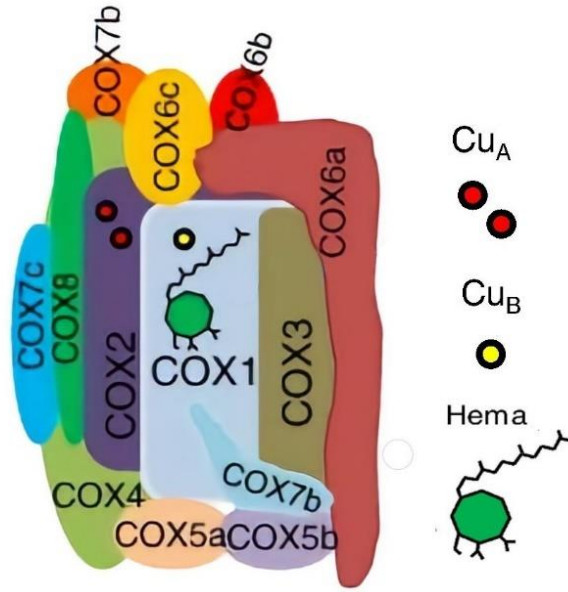
2.1.3.6. Kompleks IV (Sitokrom C Oksidaz)

COX ETZ'nin son enzimidir. İndirgenmiş Sitokrom C molekülündeki elektronların moleküler oksijene transferini katalize eder ve bu esnada membranlar arası boşluğa proton taşır.

Memeli Sitokrom C Oksidaz'ı (COX) 13 farklı altbirimden oluşmuş heteromerik yapılu bir komplekstir (29). Memeli COX enzimi altbirimlerinin numaraları elektroforezdeki migrasyon sıralarına göre verilmiştir (30). Tüm hem ve metal prostetik gruplarını içeren katalitik merkezi oluşturan 3 altbirim (COX1, COX2, COX3) mtDNA tarafından kodlanır. COX1 hem a ve hem a₃ prostetik gruplarına sahiptir. COX2 Cu_A merkezini içerir. COX3'ün proton pompalanmasında görev aldığı düşünülmektedir. Diğer 10 altbirim (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C ve COX8) ise nükleer DNA tarafından kodlanır ve sitozolik ribozomlarda pre-protein olarak sentezlenir. Sitozolden TIM ve TOM transport kompleksleri yardımı ile mitokondri içine alınır. Bu altbirimler direk olarak

katalizde görev almazlar fakat kompleksin stabilite ve düzenlenmesinde görev aldıkları düşünülmektedir (1).

COX enzimi altbirimlerinin bir araya gelmesi enzimin son şeklinde yer almayan yirmiden fazla birleşme faktörü içeren aşamalı, oldukça kompleks ve iyi düzenlenmiş bir süreçtir (1,27).



Şekil 3. COX enzimi yapısı.
(31) numaralı referanstan modifiye edilerek kullanılmıştır.

2.1.3.7. Kompleks V (ATP Sentaz)

Memeli ATP sentaz enzimi, hidrofilik, matrikse bakan F₁ ve hidrofobik, membrana gömülü F₀ olmak üzere iki fonksiyonel kısımdan oluşur. F₁ ve F₀ fiziksel olarak birbirlerine iki protein uzantı ile bağlı bulunur. F₁ parçası 5 farklı altbirim içerir (3 α , 3 β , γ , δ , ve ϵ) ve ATP sentezinin gerçekleştirildiği bölümdür. F₀ parçası 8 farklı altbirim içerir (a, b, c, d, e, f, g, ve A6L) (1). ATP sentaz, membranlar arası boşluğa biriken protonların oluşturduğu elektrokimyasal gradiyentten yararlanır. Protonlar matrikse geri dönerken enzimin F₀ kısmı dönerek F₁'de yapısal değişiklikler oluşturur böylece ADP ve inorganik fosfattan ATP üretilir (24,32).

2.2. MİTOKONDRIYAL HASTALIKLAR

Mitokondriyal hastalıklar, genel olarak ETZ enzimlerini etkileyen işlev bozukluklarında kullanılan bir isimdir. Mitokondriyal hastalıklar her organda ve her yaşta bulgu verebilirler. ATP ihtiyacının yüksek olduğu santral sinir sistemi (SSS), böbrekler, karaciğer, iskelet ve kalp kası gibi dokular ETZ enzim eksikliklerinde en fazla etkilenen dokulardır.

Yıllar içinde mitokondriyal işlev bozukluklarının sanılandan daha kompleks olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sebeple mitokondriyal patofizyoloji anlatılırken primer mitokondriyal hastalıklar (PMH) ve sekonder mitokondriyal bozukluklar (SMB) isimleri kullanılmaya başlamıştır (33).

2.2.1. Primer Mitokondriyal Hastalıklar

PMH, genetik kökenli metabolizma bozuklukları arasında en sık görülenlerdendir ve toplam prevalansının en az 5000 kişide 1 olduğu düşünülmektedir (18,34). PMH, ETZ enzim komplekslerini veya bu komplekslerin bir araya gelmesinde görev alan birleşme faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak oluşur. Mutasyonun hangi kompleksi etkilediğine göre klinik bulgular farklılık gösterebilmektedir.

2.2.1.1. Kompleks I Eksikliği

Kompleks I eksikliği erişkinde ve çocukta görülen mitokondri hastalıklarının en sık sebebidir. Tüm ETZ kaynaklı hastalıkların üçte biri kompleks I eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Klinik bulgular oldukça heterojendir. Leigh Sendromu, fatal infantil laktik asidoz, neonatal kardiyomiopati, lökoensefalopati, Leber's hereditary optic neuropathy, kompleks I eksikliğinde görülen hastalıklardır (18,35–37). Patojenik mutasyonlar vakaların yaklaşık %20-40'ında tespit edilebilmektedir fakat çoğu kompleks I eksikliği, enzim yapısının karmaşıklığı ve nükleer proteinlerin çoğunun tanımlanamamış olması sebebi ile tanı alamamaktadır (1).

2.2.1.2. Kompleks II Eksikliği

Kompleks 2 tüm altbirimleri nDNA tarafından kodlanır. SDH-A altbirimi mutasyonlarında Leigh Sendromu görülür. Diğer altbirim mutasyonları tümör oluşumu (özellikle paraganglioma) ile ilişkili bulunmuştur (18).

2.2.1.3. Kompleks III Eksikliği

Kompleks 3 yetmezliği ile ilişkili bozukluklar da klinik olarak oldukça heterojen ve diğer ETZ enzim eksikliklerine göre daha nadirdir. Çoğu vaka mtDNA tarafından kodlanan sitokrom b altbirimi mutasyonları sebebi ile oluşur (18,38,39).

2.2.1.4. Kompleks IV Eksikliği

COX enzimi (kompleks IV) eksikliği, insanda ETZ fonksiyon bozukluğu oluşturan en sık sebeplerden biridir. COX1, COX2 ve COX3 mutasyonları prostat kanseri, miyoglobüri, idiyopatik sideroblastik anemi, rabdomiyoliz, glokom, astenozoospermi, myopati, Leigh Hastalığı, MELAS (mitokondriyal ensefalopati, laktik asidoz, stroke benzeri epizodlar), ensefalomyopati, egzersiz intoleransı, epilepsi ve motor nöron hastalığı benzeri çok çeşitli fenotiplerle ilişkilendirilmiştir (6,7). Bunun yanında COX3 mutasyonunu Alzheimer Hastalığı ile ilişkili bulunmuş fakat altta yatan sebebin COX eksikliğinden ziyade aşırı süperoksit üretimi olabileceği ileri sürülmüştür (8,9).

Memelilerde kompleks IV'ün kompleks I ve III ile etkileşim içinde olduğu ve beraber süperkompleks olarak da adlandırılan respirazomları oluşturduğu gösterilmiştir. Bu organizasyon, elektron taşıyıcılarını belli bir bölgede izole ederek daha hızlı ve etkin bir biçimde elektronların akışının gerçekleşmesini sağlar. Bu bağlamda, COX enziminin yokluğu respirazomların organizasyonunu etkileyerek mitokondriyal hastalıkların patolojisine katkı sunuyor olabilir.

Nükleer DNA tarafından kodlanan COX altbirimlerinin mutasyonları daha nadir olarak bildirilmiştir. COX6B1 mutasyonu şiddetli infantil ensefalopati ile COX6A1 mutasyonu Charcot-Marie-Tooth hastalığı ile, COX7B mutasyonu mikroftalmi ve cilt lezyonları ile ilişkili bulunmuştur (40–42).

COX enzim eksikliklerinde en sık görülen genetik bozukluk enzim kompleksinin birleşmesinde yardımcı rol oynayan birleşme faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlardır. Tanımlanan ilk nDNA kaynaklı COX enzim eksikliği, fatal, progresif erken başlangıçlı nörodejenerasyon, distoni ve nekrotik beyin lezyonları ile seyreden Leigh Sendromudur (43,44). Leigh Sendromunun en sık sebebi COX birleşme faktörlerinden olan SURF1 geni mutasyonlarıdır. Bunun yanında COX10, COX15, TACO1 ve LRPPRC birleşme faktörlerindeki mutasyonlar da bu sendrom ile ilişkili bulunmuştur (45). Birleşme faktörlerindeki mutasyonlar ayrıca hipertrofik kardiyomyopati, hepatopati ve ensefalopati gibi hastalıklarla ilişkili bulunmuştur (46–48).

2.2.1.5. Kompleks V Eksikliği

ATP sentaz (Kompleks V) eksikliği ETZ enzim eksikliğine göre nadirdir ve mutasyonlar temel olarak F₀ altbirimini kodlayan mtDNA ATP6 geni ile ilişkilidir (49).

2.2.2. Sekonder Mitokondriyal Bozukluklar

SMB, ETZ enzim eksiklikleri ile ilişkili olmayan mitokondri fonksiyon bozukluklarını tanımlayan hastalıkların bütünü olarak tarif edilebilir (33). Mitokondrinin lipid metabolizması, apoptoz, kalsiyum metabolizması, reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi rollerinde görev alan genlerin doğuştan veya kazanılmış işlev bozuklukları sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Alzheimer, Otizm, Parkinson hastalıkları ve Rett sendromu mitokondri disfonksiyonu ile ilişkili bulunmuş hastalıklardandır (3–5,50).

Mitokondriyal hastalıklarda farklı dokularda ve farklı şiddette ortaya çıkan bulgular heteroplazmi (mutant ve sağlıklı mtDNA'ların farklı oranlarda beraber bulunması) kavramı ile açıklanılmaya çalışılsa da tek başına yeterli değildir. Bu açıklama nDNA mutasyonlarına bağlı gelişen klinik çeşitliliği açıklayamamaktadır. Buradaki muhtemel açıklama bazı COX altbirimlerinin doku spesifik olarak farklı izoformlarının ifade edilmesi olabilir. İnsanlarda COX4, COX6A, COX6B ve COX7A altbirimlerinin doku spesifik izoformları vardır (31). COX6B1 ve COX6A1 yaygın

biçimde dokularda bulunurken COX6B2 ve COX6A2 temel olarak kas dokusu ve testislerde bulunur. COX4 de akciğer spesifik bir izoforma sahiptir. Bu isoformların varlığı fenotipik çeşitliliği açıklamaya yardımcı olabilir (1,7). Bunun yanında organ ve dokuların enerji ve mitokondriye olan ihtiyaçlarının farklı olması ve dokuların mitokondriyal işlev bozuklukları ile baş etme becerilerinin farklı olması diğer sebeplerdendir (7).

2.3. BİR MODEL OLARAK *DROSOPHILA MELANOGASTER*

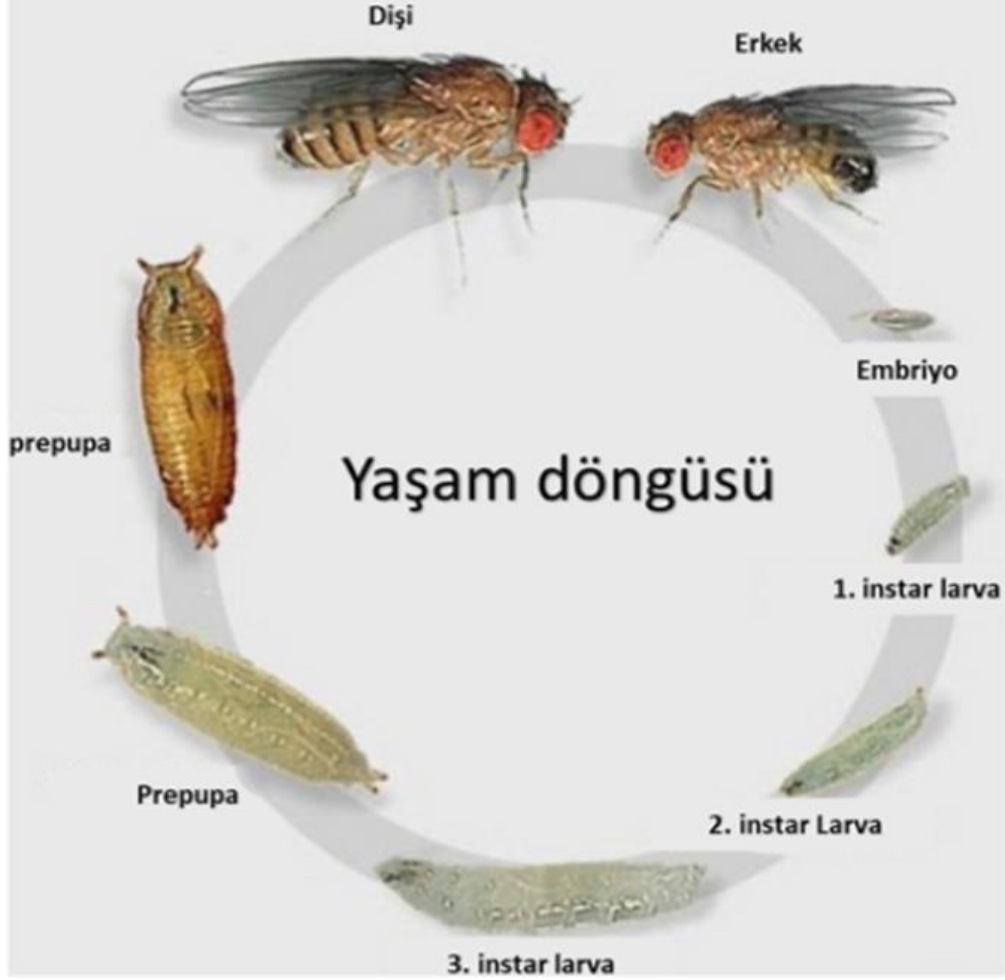
Sirke sineği veya meyve sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster*, Tomas Morgan Hunt'un 1900'lü yılların başında başlayan çalışmaları ile 100 yılı aşkın süredir deney hayvanı olarak kullanılmaktadır. İlk 50 yıllık süreçte *Drosophila* çalışmaları genetik araştırmalar ve kalıtımın temelleri üzerineydi. Bu yıllarda geliştirilen en önemli metodlardan biri balancer kromozomlar oldu. İlk defa Hermann Muller tarafından kullanılan balancer kromozomlar, kromozomlar arasında rekombinasyonu engelleyerek mutasyonların heterozigot stok hatları olarak saklanmasına olanak verdi (51,52). İlerleyen süreçte genetik metodların gelişmesi ile araştırmacılar kalıtım harici sorular ile ilgilenmeye başladılar. Çalışmalar sirkadiyen ritmin temelleri, sinir sisteminin gelişimi ve sinir bilim konusunda buluşlara yol açtı. Kompleks sinir sistemi yapısı ve insana benzer nörolojik fonksiyon özellikleri *Drosophila*'nın nörodejeneratif hastalıkları çalışmak için ideal bir model organizma olmasını sağladı. Sinir sisteminin gelişimi ve temel fonksiyonlarının anlaşılmasında kullanılabilecek en faydalı modellerden biri olduğunu gösterdi (53). Böylece günümüzde sinirbilim çalışmalarında en çok tercih edilen model organizmalardan birisi oldu (54,55). Bu güne kadar *Drosophila* üzerinde yapılan çalışmalar bilime çok önemli katkılar yapmış, sonuncusu da 2017 yılında olmak üzere 8 Nobel ödülünün alınmasında aracı olmuştur (56).

2.3.1. Yaşam Döngüsü

Drosophila yaşam döngüsü diğer pek çok deney hayvanına göre oldukça hızlıdır ve tek seferde çok sayıda yavru meydana getirirler. 25 °C sıcaklıkta 10-12 günde

erişkinliğe ulaşmakla birlikte embriyonik gelişim süreleri ve yaşamlarının diğer aşamalarında geçirdikleri süre ortam sıcaklığına bağlı olarak değişiklik gösterir.

Yumurtalar yaklaşık 0.5mm uzunluk ve 0.2 mm çapında oval şekillidir. Yeni bırakılmış bir yumurta yaklaşık 24 saat embriyogenez sürecinden geçerek birinci instar larvayı oluşturur. Yumurtadan çıkan larvalar besi yerinde yüzeyinde bulunan maya hücreleri ile beslenir. Yumurtadan çıktıktan yaklaşık 24 saat sonra larva ilk deri değişimini gerçekleştirerek ikinci instar larva dönemine geçer. Tekrar bir günün ardından da ikinci deri değişimini gerçekleştirip üçüncü instar larva halini alır. Bu dönemde beslenip büyüyen larva 2 günün ardından besi yerine açtığı tünellerden çıkarak tüpe tırmanır ve uygun bir yerde pupalaşır. Bu 5-7 günlük hareketsiz pupalık döneminde erişkin sineğin fiziksel özelliklerine kavuşmak için kapsamlı değişikliklerden geçer. Gelişimini tamamlaması ile pupa kılıfını delerek dışarı çıkar. Yeni çıktığında renkleri daha soluk ve vücudu daha yumuşaktır. Zaman geçtikçe vücudu sertleşir kanatlar açılır ve normal erişkin görünümüne kavuşur.



Şekil 4. Yaşam döngüsü.
(57) numaralı referanstan modifiye edilerek kullanılmıştır.

2.3.2. Cinsiyet Tayini

Deneyisel çaprazlamalar için dişi ve erkek sineklerin ayrılması gereklidir. Bu ayırım stereo mikroskop altında bazı belli başlı fiziksel görünüş farklılıklarının incelenmesi ile yapılır.

Genital organın dış yapısı iki cinsiyet arasında farklılıklar gösterir. Erkek sineğin genital organı daha koyu renkte gözlenir. Dişiler 7 abdomen segmentine sahip iken erkek sinekler 5 abdomen segmentine sahiptir. Dişilerde abdomen, açık ve koyu renkte bantlar halinde uç kısma kadar uzanan bir desene sahip iken erkeklerde abdomenin son kısmı yoğun pigment birikimi sebebi ile siyah görünür. Dişi sineklerin abdomenleri

daha uzundur ve vücutları erkeklere göre daha büyüktür. Erkek sineklerin abdomenleri daha kısadır ve ucu küttür.

Dişi sinek pupadan çıktıktan sonra oda sıcaklığında yaklaşık 8-10 saat içinde cinsel olgunluğa erişir. Dişi sinek bir defa cinsel olgunluğa eriştiği zaman birçok erkek sinekle eşleşebilir. Dişi sinek çiftleşmeden sonra spermi depo ederek tekrar kullanabilir. Çaprazlardan üretilen yavruların (F₁) saf olduğundan emin olmak için deney gruplarının oluşturulmasında kullanılan dişi sineklerin bakire olması istenir. Bakire ayırımı pupadan çıkan sineklerin cinsel olgunluğa erişmeden önce ayrılarak yeni tüplere aktarılması ile yapılabilir. Bir diğer yöntem de sadece bakire sineklerde abdomende görülen mekonyum görüntüsüne göre ayırmaktır.

2.3.3. Korunmuş moleküler mekanizmalar

Sinekler ve insanlar birbirlerinden ne kadar farklı görünseler de insanı insan yapan moleküler süreçlerin, sineklerde de oldukça benzer şekilde çalıştığı görülüyor. Yapılan tahminlere göre insanda hastalıklar ile ilişkili bulunmuş genlerinin %60'ından fazlasının *Drosophila*'da ortologları mevcuttur (58). Özellikle kanser, nörolojik hastalıklar, malformasyonlar ve metabolik hastalıklar ile ilişkili genlerde benzerlik oranları çok daha yüksek iken hematolojik hastalıklar, endokrin bozukluklar ve immun sistem ilişkili genlerde bu benzerlik daha düşük bulunmuştur (58). Embriyonik aks polarizasyonu, metabolik süreçler, organogenez ve sinir sistemi gelişiminde görev alan moleküler mekanizmalar iki canlı arasında oldukça benzerdir. Öyle ki sinek geninin memeli geni yerine aktarılması veya tersi metabolik fonksiyonu genellikle bozmaz (59).

Drosophila oldukça kompleks davranışsal özellikler de sergiler. Yön bulma, tırmanma, beslenme, sirkadiyen ritim ve uyku, öğrenme ve hafıza, bağımlılık, kendini temizleme, agresyon ve kur davranışları sineklerde gözlemlenebilen ve farklı metotlarla ölçümlenebilen davranışlar arasındadır (60,61).

2.3.4. *Drosophila* Nöroanatomisi

Drosophila beyninde yaklaşık olarak 100.000 nöron bulunmaktadır ve günümüzde gelişen teknoloji sayesinde *Drosophila* beyninin elektron mikroskopik düzeyde detaylı bir haritası çıkarılmış durumdadır (62). Sineklerde de nöronlar memelilerde olduğu gibi sayısız fonksiyonel devreler ile segmenter bir şekilde organize olmuşlardır. Bu devreler çiftleşme, agresyon, kur, öğrenme ve hafıza gibi davranışların oluşturulmasında görev alırlar. Bu davranışlar oluşurken moleküler düzeydeki mekanizmalar ve nörotransmitterler insanlardakine oldukça benzerdir. Dopamin (DA), serotonin, glutamat, GABA, asetilkolin, histamin, adenozin ve nörokininler sineklerde de bulunan nörotransmitterlerdir (59). Bunun yanında bazı farklılıklar da söz konusudur. Örneğin, sineklerde adrenerjik sistem bulunmamaktadır fakat onun yerine benzer fonksiyonlar oktapamin ve tiramin tarafından sağlanır. Sineklerde katekolaminerjik tek nörotransmitter dopamindir (63,64).

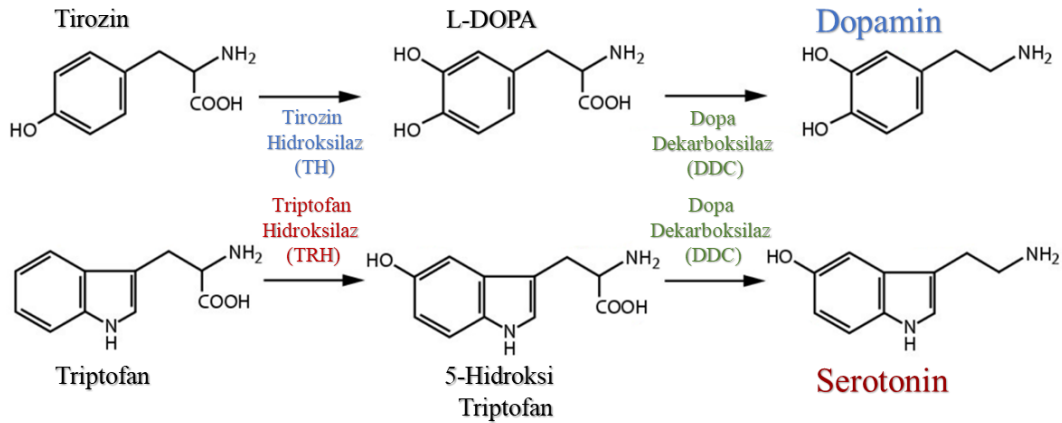
2.3.4.1. *Dopaminerjik sistem*

Dopamin memelilerde motor koordinasyon, motivasyon, ödül mekanizması ve bağımlılık ile öğrenme ve bellek fonksiyonlarında görev alır. Memelilerdeki gibi sineklerde de dopaminerjik sistem pek çok önemli davranışta görev almaktadır. İnsanda dopaminerjik sistem bozuklukları pek çok hastalık ile ilişkilendirilmiştir. En iyi bilinenlerinden biri dopaminerjik nöron kaybı ile seyreden Parkinson hastalığıdır. Bu nörodejeneratif bozukluk hipokinetik ve hiperkinetik hareketlerin kombinasyonu ile ilerleyen bunun yanında bilişsel fonksiyonları da etkileyen progresif seyirli bir hastalıktır (64). Bunun yanında DA sistem bozuklukları herediter distoni, hipersomnia, huzursuz bacak sendromu, duygu durum bozuklukları ile de ilişkilendirilmiştir. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan dopaminerjik ajanların kullanıma girmesi ile dopaminerjik sistemin fazla uyarılması sonucunda da tardif diskinezi gibi hiperkinetik bozukluklarının gelişebileceği görülmüştür.

Drosophila beynindeki nöronların yaklaşık 130 tanesi dopaminerjik nörondur (64) fakat geniş yayılımları sayesinde bu az sayıdaki nöronlar yaygın bir etki oluşturabilirler. Şimdiye kadar dopaminerjik sistemin sineklerde de hareket öğrenme

ve bellek, kur davranışları ve bağımlılık üzerinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda olduğu gibi sineklerde de artmış dopamin aktivitesi hiperaktiviye sebep olurken azalmış DA aktivitesi hipoaktivite ile ilişkili bulunmuştur (65–68).

Dopamin bitkilerde ve çoğu hayvanda sentezlenen, öncül molekülü L-DOPA'dan bir karboksil grubunun uzaklaştırılmasıyla sentezlenen bir amindir. L-DOPA ise tirozin amino asitinden tirozin hidroksilaz enzimi ile sentezlenir. Serotonin sentezi için ilk basamak triptofan amino asidinin 5. pozisyonundaki karbonunun triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmesiyle 5- hidroksi triptofan oluşturulmasıdır. Daha sonra 5- hidroksi triptofandan dopa dekarboksilaz enzimi ile serotonin sentezlenir. Sineklerde adrenalin ve noradrenalin sentez için gerekli genlerin ve enzimlerin bulunmaması sebebiyle tirozin hidroksilaz enzimi dopaminerjik nöronlara spesifik iken DDC enzimi iki nörotransmitter için de ortak bir enzimidir ve iki nöron grubunda da gen ifadesi mevcuttur (64).



Şekil 5. Dopamin ve serotonin sentez yolağı.

2.3.5. *Drosophila* Genetik Özellikleri

Drosophila'nın deney hayvanı olarak en dikkat çekici yönlerinden biri olan genetik yapısıdır. Göreceli olarak az sayıda gen toplamda 4 çift kromozom üzerinde bulunur. Bu kromozomlardan ilk çift cinsiyet kromozomları, kalan 3 çift kromozom otozomal kromozomlardır. Karşılaştırma amacı ile insana baktığımızda 46 kromozomu bulunan insanın gen sayısının 19.000– 20.000 aralığında olduğu tahmin

edilmektedir (69). Yaklaşık 14000 geni bulunan sirke sineğinin ise genlerin büyük miktarı ilk 3 kromozomda yer alır (59). 4. Kromozom oldukça küçük yapıdadır ve üzerinde az sayıda gen bulundurulur.

Yıllar içinde araştırmacılar *Drosophila* üzerinde oldukça kompleks genetik manipülasyonlar yapabilecekleri yöntemler geliştirmişlerdir. 1982 yılında transgenik sinek üretimi için yeni bir metodun geliştirilmesi ile genetik çalışmaların kolaylığı artmış, *Drosophila*'da transpozon olarak işlev gösteren P-elementi kullanılarak DNA parçalarının kromozomda rastgele bölgelere eklenmesine olanak sağlanmıştır (70,71).

İlerleyen yıllarda geliştirilen yeşil floresan protein (GFP) ile oluşturulan transgenik sineklerde floresan işaretlemeler yapılabilmüş, RNA interference yöntemi ile istenilen genlerin susturulması sağlanabilmiştir. En sık kullanılan yöntemlerden birisi olan Gal4-UAS ikili sistemi ise transgenik deney hayvanlarının oluşturulmasını ve bunlarla geniş çaplı tarama (screening) çalışmalarının yapılmasını sağlamıştır.

2.3.5.1. Gal4-UAS İkili Sistemi

Gal4-UAS ikili sisteminin geliştirilmesi sineklerde transgenik ekspresyonun istenilen hücrede ve istenilen zamanda yapılabilmesini sağlayarak *Drosophila* genetiğine büyük bir zenginlik katmış (72), *Drosophila* üzerinde sınırlı bir bölgede gen ifadesi sağlanması amacı ile en sık kullanılan sistem olmuştur.

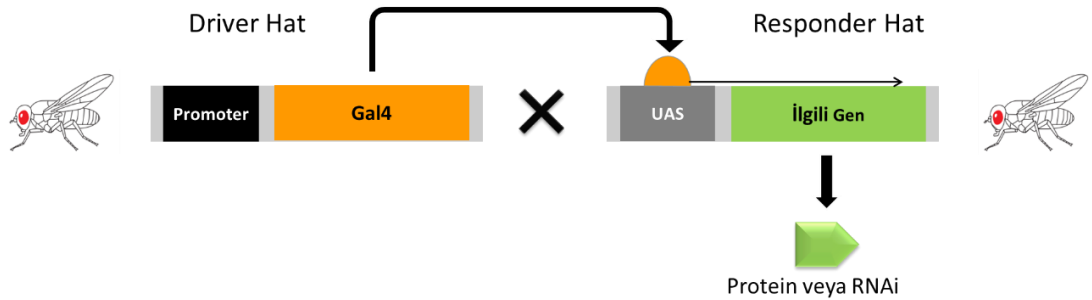
Bu sistem Gal4 ve Upstream Activation Sequence (UAS) olmak üzere iki parçadan oluşur. Gal4 geni, 881 aminoasitten oluşan, ilk defa bira mayasında tanımlanmış (*Saccharomyces cerevisiae*) Gal4 proteinini kodlar. Bu protein DNA'ya bağlanarak hedef genin transkripsiyonunu aktive eder böylece transkripsiyon aktivatörü olarak görev alır. Diğer parça olan UAS, GAL4 proteininin DNA üzerinde spesifik olarak bağlandığı 17 baz çiftlik dizinin adıdır ve kendinden sonra gelen genin ifadesini güçlendirir (73).

Gal4 ve UAS parçaları sinekte endojen olarak bulunmaz. Transgenik sinek hatlarında eksprese edilir ve mayalarda olduğu gibi sineklerde de GAL4 varlığı UAS'ı aktive ederek gen ifadesine sebep olur. GAL4 sineklerde doğal olarak bulunmadığı

için sinek hücrelerindeki metabolizma süreçleri ile etkileşmez ve hücre içinde biyolojik aktivitesi bulunmaz fakat nadir durumlarda yüksek doz GAL4 ifadesinin fenotipi etkileyebildiği gösterilmiştir (74).

Araştırmacılar yıllar içinde spesifik doku veya hücre gruplarında GAL4 proteini ifade eden çeşitli Gal4 hatları oluşturmuşlardır. Bu şekilde bir hat sadece kas hücrelerinde Gal4 ifade ederken bir diğeri sadece sinir hücrelerinde Gal4 ifade edebilir hale gelmiştir. GAL4-UAS sinek hatları çeşitliliği günümüzde 10.000'in üzerine çıkmış ve böylece oldukça güçlü bir genetik yöntem haline gelmiştir.

Gal4 UAS ikili sisteminde, Gal4 driver hat, UAS responder hat olarak isimlendirilir. Bu iki kısım farklı paternal sinek hatlarında muhafaza edilir. Böylece iki hücre hattında da etkileşim olmayacağı için ilgili genin ifadesi gerçekleşmez. Paternal sinek hatlarının çaprazlanması ile Gal4 bulunan hücrelerde GAL4 proteini UAS'ı aktive ederek ardından gelen ilgili genin ekspresyonunu sağlar.



Şekil 6. Gal4-UAS İkili Sistemi.

2.3.5.2. RNA İnterferans (RNAi)

Drosophila ile yapılan çalışmalarda çok sık kullanılan bir diğer yöntem de RNA interferans yöntemidir. RNA interferans, RNA moleküllerinin, hedeflenmiş mRNA moleküllerine bağlanıp nötralize ederek gen ekspresyonunu inhibe ettiği biyolojik bir süreçtir ve hayvanlar dahil birçok ökaryotta bulunur. RNAi'nin ve onun düzenleyici rolünün keşfedilmesinden bu yana, istenen genlerin baskılanmasında muazzam bir potansiyele sahip olduğu açıkça ortaya çıkmıştır.

RNAi temelde iki adımlı bir süreçtir. İlk adım çift zincirli RNA (dsRNA)'nın bir tip 3 endoribonükleaz olan Dicer enzimi ile ATP bağımlı bir yol üzerinden 21-23 baz çiftlik küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) parçalanmasıdır. İkinci adımda siRNA, RISC (RNA- induced silencing complex) olarak adlandırılan kompleksin bir parçası haline gelir. RISC, siRNA'lar yardımı ile komplementer mRNA'ya bağlanır ve mRNA dizisinin parçalanması sağlanır (75). Sonuçta ilgili genin mRNA düzeyinin azalması genin ifade ettiği proteinin sentezinin azalmasına sebep olur. Günümüzde bu teknik gen susturulması amacı ile yaygın deneysel bir araç olarak kullanılmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda deneyler *Drosophila melanogaster* (sirke sineği) üzerinde *in vivo* koşullarda yapılmıştır. Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmeliğinin madde 4/d bendinde deney hayvanı tarifi; "prosedürlerde kullanılan, serbest yaşayan veya çoğalan larva biçimleri, canlı kafadanbacaklılar ve normal fetal gelişimlerinin son üçte birlik döneminden itibaren memeliler dahil, insan olmayan herhangi bir omurgalı canlıyı," şeklinde yapılmıştır. Kullanacağımız tür ise omurgasız bir canlıdır ve aynı yönetmeliğe göre etik kurul izni alınması gerekmemektedir.

3.1. KULLANILAN *DROSOPHILA* HATLARI

Gal4-UAS ikili sistemi ile istenilen hücrelerdeki hedef proteinin ekspresyon düzeyini değiştirmek veya farklı bir protein sentezlenmesini sağlamak mümkündür. Bunu yapmak için biri driver biri responder olmak üzere iki tür sinek hattına ihtiyaç vardır

Tablo 1. Sinek hatları, ekspresyon özellikleri ve kaynakları.

Sinek Hatları	Ekspresyon Özelliği	Kaynak
Elav ^{C155} -Gal4	Driver- Tüm Nöronlarda	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
TH-Gal4	Driver- Sadece Dopaminerjik Nöronlarda	Serge Birman Laboratuvarı Stokları
DDC-Gal4	Driver- Dopaminerjik ve Serotonerjik Nöronlarda	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
TRH-Gal4	Driver- Sadece Serotonerjik Nöronlarda	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
UAS-CG9603-RNAi	Responder- Cox7a Altbirim RNAi Ekspresyonunu Sağlar.	Vienna Drosophila Research Center
UAS-Dcr-2	Responder- Dicer-2 Enzimi Ekspresyonunu Sağlar.	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2	Responder- Cox7a Altbirim RNAi ve Dicer-2 Ekspresyonu Sağlar.	İki ayrı hattın çaprazları ile üretildi: - UAS-CG9603-RNAi (2. kromozom) - UAS-Dcr-2 (3. kromozom)
UAS-Stinger	Responder- Nükleusta Enhanced GFP Ekspresyonu sağlar.	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
w ¹¹¹⁸	Beyaz Göz Mutasyonu taşıyan doğal suş	Prof. Jacobs Lab Stokları (Tampere Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü)

3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

Çalışmada kullanılan NaOH, HCl, NaCl, KCl, CaCl₂.2H₂O, MgCl₂.6H₂O, NaHCO₃, Trehalose.2H₂O, Sükröz, HEPES, 10X Fosfatlı tampon çözeltisi (PBS), Triton X-100, Etanol, Sığır serum albumini (BSA) ve Nipagin Sigma (ABD)

firmasından, Propionik asit Honeywell (ABD) firmasından, Agar Flystuff (ABD) firmasından temin edildi.

3.3. HAZIRLANAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER

3.3.1. PBS -Triton X Çözeltisi (PBSTx):

PBS içinde 0,1% olacak şekilde Triton X-100 çözeltisi hazırlandı.

3.3.2. Bloklama Çözeltisi:

Antikorların non-spesifik bağlanmasını azaltmak ve daha net bir görüntü elde etmek için bloklama çözeltisi kullanıldı. PBSTx içinde %5'lik bovine serum albumin çözeltisi hazırlandı.

3.3.3. Hemolymph-like saline 3.1 (HL3.1):

Drosophila hemolenfini taklit eden bir çözeltilidir. Diseke edilen dokuların fiksasyonuna kadar fizyolojisinin korunmasına yardımcı olur (76).

Karışım içeriği; 70mM NaCl, 5mM KCl, 0,8mM CaCl₂.2H₂O, 4mM MgCl₂.6H₂O, 10mM NaHCO₃, 5mM Trehalose.2H₂O, 115mM Sükroz, 5mM HEPES olacak şekilde hazırlandı. Karışım tek kullanımlık bir tüp üstü filtre (Thermo Fisher, ABD) ile sterilize edildi.

3.3.4. %4 Formaldehit Solüsyonu:

Diseke edilen beyinlerin tespiti için %4'lük formaldehit solüsyonu kullanıldı. 40 ml %4'lük Formaldehit solüsyonu için 1,6 g paraformaldehit ve 200 µl 1 M NaOH kullanıldı. Karışımın pH'ı 7,2 olarak ayarlandı ve filtrelendikten sonra +4 derecede saklandı.

3.4. MALT AGAR BESİ ORTAMI

Deneyle süresince kullanılan besi ortamı taze olarak hazırlanmış ve kullanılabana kadar 4 °C’de soğuk odada saklanmıştır.

Tablo 2. Besi Ortamı İçindekiler Listesi ve Miktarları

Madde	Miktar
Su	6800 ml su
Agar	44 g
İrmik unu	260 g
Malt özü	500 g
Aktif kuru maya	120 g
%5 Nipagin Etanol çözeltisi	164 ml
Propionik Asit	46 ml

3.4.1. Besi Ortamı Hazırlanması

1. 6400 ml su ölçülerek tencereye konuldu ve kaynatıldı.
2. Su kaynadıktan sonra sırası ile agar, irmik unu ve malt eklendi.
3. 10 dakika süre ile iyice karıştırılarak kaynatıldı.
4. Başka bir kaptaki 400 ml su ile kuru maya karıştırıldı ve 10 dakika beklemeye bırakıldı.
5. Karışıma maya eklenerek iyice karıştırıldı ve 70 °C altına düşmesi beklendi.
6. Propionik asit ve %5’lik hazırlanan nipagin etanol karışımı eklendi.
7. Soğumasına izin verilmeden tüplere aktarıldı.
8. Tüpler oda ısısında soğuması ve katılaşması beklendikten sonra 4°C de saklandı.

3.5. KULLANILAN ANTİKORLAR

Antikorlar immün floresan görüntüleme amacı ile kullanıldı. Beyinler bütün halde (whole-mount) konfokal mikroskopi altında incelendi.

Tablo 3. Primer antikorların marka ve katalog numaraları.

Primer antikorlar	Marka
Tavşan Anti-Tirozin Hidroksilaz antikor	#AB152, Merck, Almanya
Fare Anti-GFP-1G9 antikor	#GFP-1G9, DSHB, ABD

Tablo 4. Sekonder antikorların marka ve katalog numaraları.

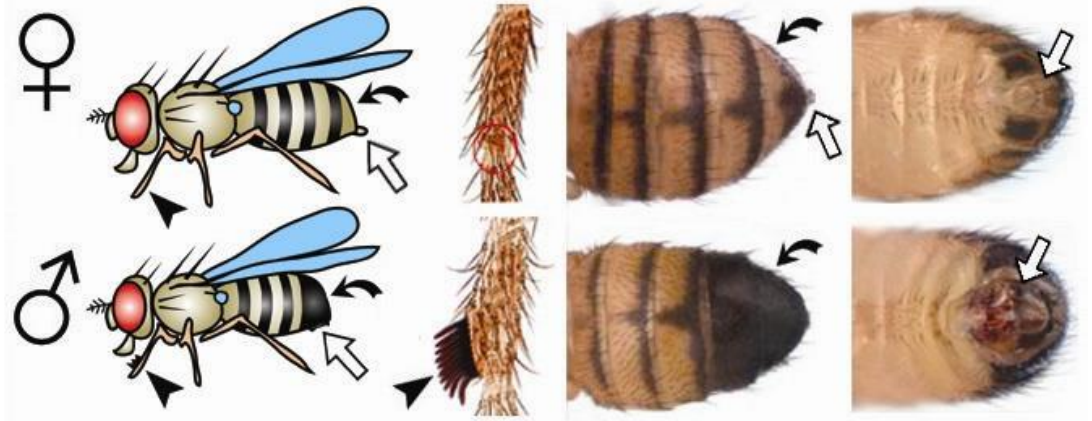
Sekonder antikorlar	Marka
Keçi anti-Tavşan IgG Alexa Flour 568	#A-11011, Thermo Fischer Scientific, ABD
Keçi anti-Fare IgG Alexa Flour 488	#A-11001, Thermo Fischer Scientific, ABD

3.6. SİNEK KÜLTÜRÜ

Deneyle *Drosophila melanogaster* türü deney hayvanları kullanılarak gerçekleştirildi. Stok sinek hatları oda sıcaklığında muhafaza edildi ve yaklaşık iki haftada bir taze besin içeren tüplere aktarıldı. Sinek hatlarının saflıklarının korunması ve birbirleri ile karışmamaları için bir kez tüpten çıkarılan sinekler ya bir deneyde kullanılmak üzere başka tüplere aktarıldı ya da morga atılarak uzaklaştırıldı. Deneyle kullanılan veya çapraz sonrası kullanılacak olan sinekler kontrollü nem ortamı sağlayan bir inkübatörde 25 °C ortam, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde muhafaza edildi. Sinekler tarife uygun olarak hazırlanan malt agar ortamında yetiştirildi.

3.6.1. Sineklerin Cinsiyet Ayrımı

Deney gruplarını oluşturmak için yapılması gereken çaprazları kurmadan önce ilgili gruplardan hem dişi hem de erkek sineklerin ihtiyaç kadar toplanması gerekti. Cinsiyet ayrımı için sinekler CO₂ anestezisi altında stereo mikroskop ile görüntülendi. Dişi ve erkek sinekler fiziksel görünüşlerindeki farklar yardımı ile ayırt edildi.



Şekil 7. Cinsiyet ayrımını sağlayan anatomik yapılar.

Üstte dişi altta erkek sineğin görüntüleri yer almaktadır. Birinci kolon lateral tüm vücudu göstermektedir. İkinci kolon ön bacakların büyütülmüş görüntüsü olup sadece erkeklerde tarak benzeri yapılar bulundurmaktadır. Üçüncü kolonda dorsal, dördüncü kolonda ventral yapılar gözlenmektedir. (77) numaralı referanstan alınmıştır (CC BY 4.0).

3.6.2. Bakire Sineklerin Toplanması

Dişi sineklerin yalnızca çaprazlandıkları erkek sineklerle çiftleştiğinden emin olmak için dişiler yalnızca bakireler arasından seçildi. Bakire sineklerin toplanması iki farklı yöntemle gerçekleştirildi.

Zamana bağlı yapılan ayırım yönteminde, sineklerin yumurtadan çıkması ile cinsel olgunluğa ulaşması arasında geçen süre kullanıldı. Yumurtadan yeni çıkmış sinekler oda sıcaklığında 8-10 saat ve 18 santigrat derecede 16 saat cinsel olgunlaşma süreci geçirirler. Bu süre içinde toplanan dişi sinekler bakiredir. Çalışmamızda içlerindeki erişkinler tamamen boşaltılmış tüpler akşamdan 18 santigrat derece sıcaklığındaki odaya bırakıldı. Ertesi sabah 18 saatin sonunda tüplerde çıkmış olan dişi

sinekler başka tüplere aktarıldı. Erkekler de morga atılarak uzaklaştırıldı. Boş tüpler oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Akşam 8 saatin sonunda yeni çıkmış dişiler toplandı, erkekler de uzaklaştırıldı. Tüpler erkesi gün toplanmak üzere 18 santigrat derece soğuk odaya bırakıldı.

Üstteki yöntemin kullanılmadığı durumlarda görsel olarak ayırma gidildi. Herhangi bir zamanda tüplerin içinde birikmiş olan sinekler CO₂ anestezisi altında stereo mikroskop ile gözlendi. İnce bir fırça yardımı ile bakire sineklerin karın bölgesinde bulunan koyu bir leke olan mekonyum işareti arandı. Bu işareti taşıyan dişi sinekler başka tüplere aktarıldı. Kalan sinekler morga atıldı.

Tüpler içinde yirmişerli olarak toplanmış bakire sinekler kullanılmadan önce en az 3 gün bekletilerek tüplerde larva olup olmadığına bakıldı. Larva gözlenen tüpler, içindeki en az bir sineğin bakire olmadığı düşünülerek çöpe atıldı.

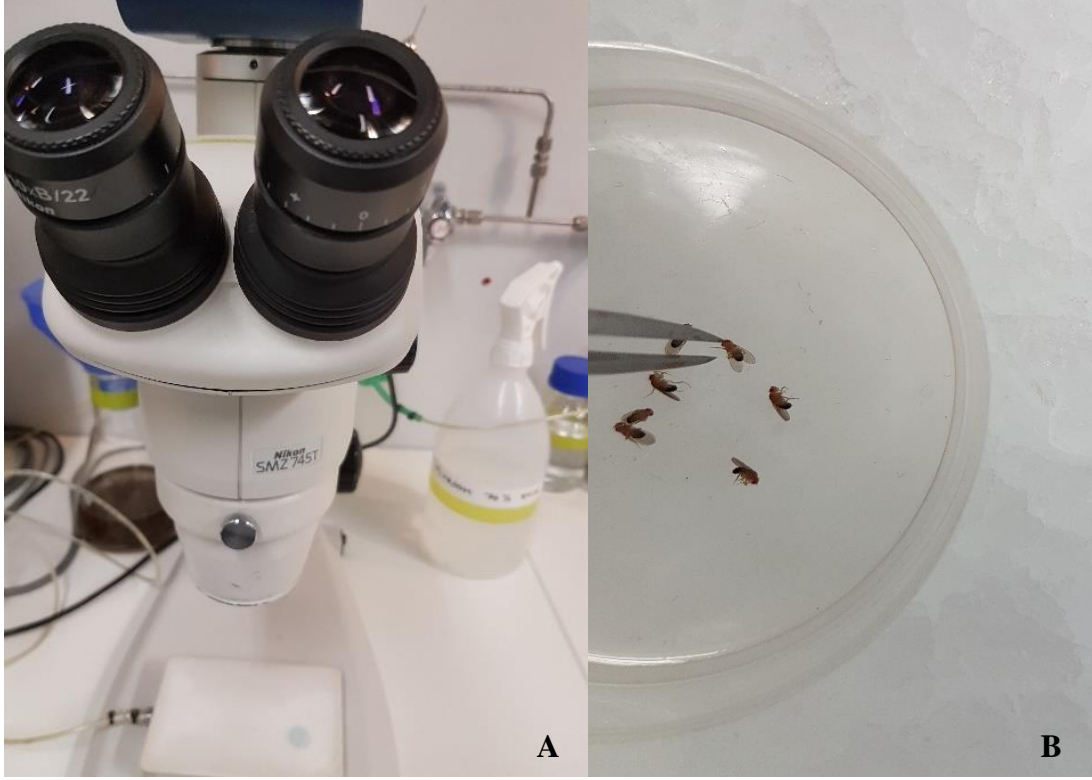


Şekil 8. Bakire sinek görüntüsü.
Oklar mekonyum izini göstermektedir. (78) numaralı referanstan modifiye edilerek kullanılmıştır.

3.6.3. Anestezi İşlemi

Sineklerle çalışılırken tüpten tüpe aktarma, bakire sineklerin toplanması ve çaprazlanması sırasında sineklerin uçup kaçmaması için anestezisyne ihtiyaç duyuldu. Anestezi için çalışmamızda iki ayrı yöntem kullanıldı. Karbondioksit anestezisi günlük sinek bakımı, yeni tüplere aktarımı ve bakire sinek toplanması gibi işlemler

sırasında kullanıldı. Sinekler CO₂ tabancası ile tüpün duvarı ve süngeri arasından bir miktar gaz pompalanarak bayıldıktan sonra CO₂ pedine aktarıldı. CO₂ pedindeki düzenli CO₂ ıkışı sayesinde stereo mikroskop altında anestezi devam ettirilerek sineklerin cinsiyet ayırımı sağlandı.



Şekil 9. Kullanılan anestezi yöntemleri.

A) Kullanılan stereo mikroskop ve CO₂ pedi. B) Diseksiyon ncesi soğuk anestezisi uygulanması.

İmmunohistokimyasal görüntüleme amacı ile yapılan diseksiyon işlemi öncesindeki anestezi ise soğuk anestezisi yöntemi ile sağlandı. Diseke edilecek sineklerin bulunduğu tüpü buz içinde birkaç dakika bekletildi. Hareketsiz kalan sinekler buzun üzerine yerleŐtirilmiŐ ve üzeri önceden silikon ile kaplanmış petri kabına alındı.

BeŐ dakikanın üzerinde CO₂ maruziyetinin hareket kabiliyetini ve davranıŐ testlerini etkilemesi (79) sebebi ile tırmanma testi öncesinde anestezi kullanılmadı.

3.6.4. Çaprazların Kurulması

Çaprazlanacak sinek hatları ve hangi hattın dışısının kullanılacağına göre erkek ve bakire dişi sinekler önceden toplandı. En az 3 günlük beklemeden sonra bakire sineklerin tüplerinde larva görülmemesi teyit amaçlı kullanıldı. Sinekler dişi/erkek oranı 3/1 – 4/1 arasında olacak şekilde karıştırılarak yeni tüplere aktarıldı.

3.6.5. Sineklerin Teminasyonu

Kullanılmayacak olan sinekler “morg” denilen içi deterjanlı su dolu cam şişelere atılarak terminasyonları sağlandı.

3.7. MOTOR FONKSİYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ

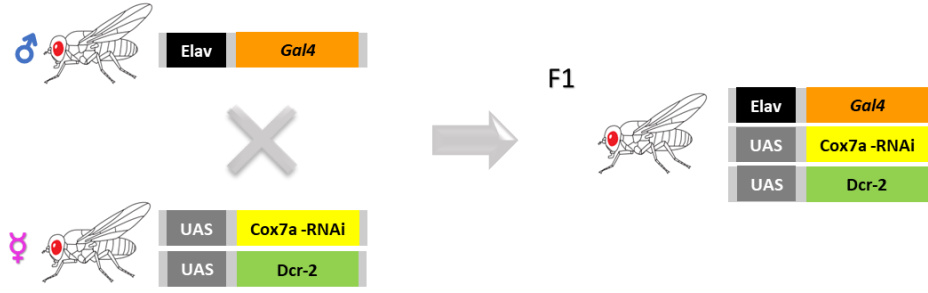
Grupların motor fonksiyonlarının değerlendirilmesi için erişkin sineklerin içgüdüsel tırmanma davranışlarından yararlanıldı.

3.7.1. Tırmanma Testi İçin Grupların Oluşturulması

Hedef dokuda gen ekspresyonunun yapılabilmesi için *Drosophila melanogaster* türü sineklerde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri olan UAS-Gal4 ikili ekspresyon sistemi kullanıldı. Bu yöntem ile ilgilenilen genin ekspresyonu farklı doku veya hücre tipine spesifik olarak sağlanabilmektedir.

3.7.1.1. Pan-nöronal COX knockdown grubu (PKD)

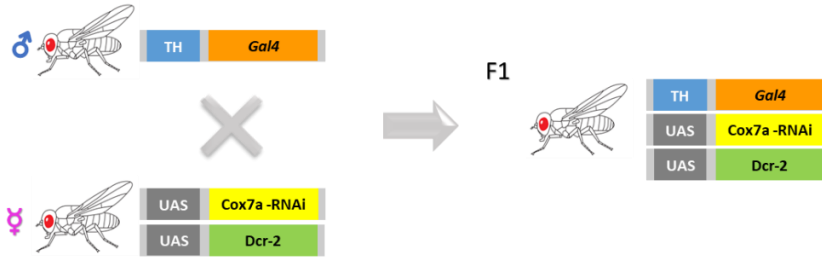
Pozitif kontrol grubunun oluşturulması amacı ile tüm nöronlarda COX enzim eksikliği oluşturulması için UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sineklerle Elav^{C155}-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. Elav^{C155}-Gal4 / + ; UAS-CG9603-RNAi / + ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.



Şekil 10. Pan-nöronal COX knockdown grubunun oluşturulması. Genler homozigot olarak taşınmaktadır, basitleştirmek için tek kromozom olarak şematize edilmiştir.

3.7.1.2. TH knockdown grubu (THKD)

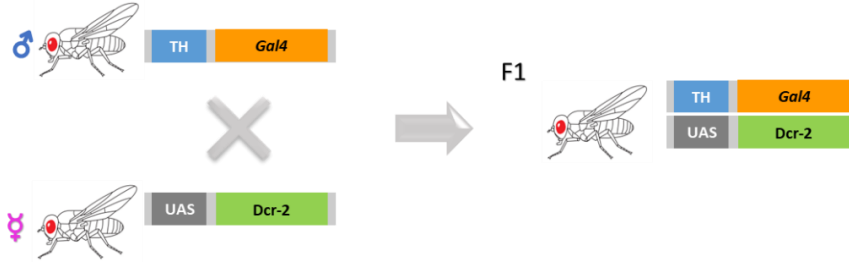
Sadece Dopaminerjik nöronlarda COX enzim eksikliğinin oluşturulması amacı ile daha önceden toplanan UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile Elav^{C155}-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / TH-Gal4; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.



Şekil 11. TH knockdown grubunun oluşturulması. Genler homozigot olarak taşınmaktadır, basitleştirmek için tek kromozom olarak şematize edilmiştir.

3.7.1.3. TH kontrol grubu (THKon)

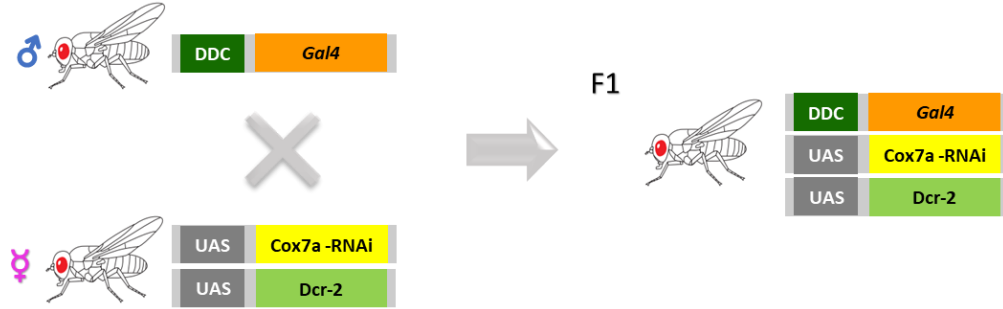
TH-Gal4 için kontrol grubu oluşturulması amacı ile daha önceden toplanan UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. TH-Gal4 / +; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.



Şekil 12. TH kontrol grubunun oluşturulması.
Genler homozigot olarak taşınmaktadır, basitleştirmek için tek kromozom olarak şematize edilmiştir.

3.7.1.4. DDC knockdown grubu (DDCKD)

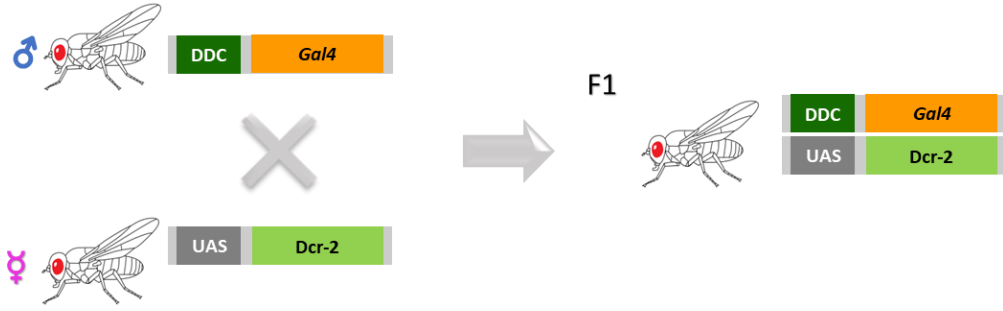
Dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarda COX enzim eksikliği oluşturulması amacı ile UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile DDC-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / DDC-Gal4 ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.



Şekil 13. DDC knockdown grubunun oluşturulması.
Genler homozigot olarak taşınmaktadır, basitleştirmek için tek kromozom olarak şematize edilmiştir.

3.7.1.5. DDC kontrol grubu (DDCKon)

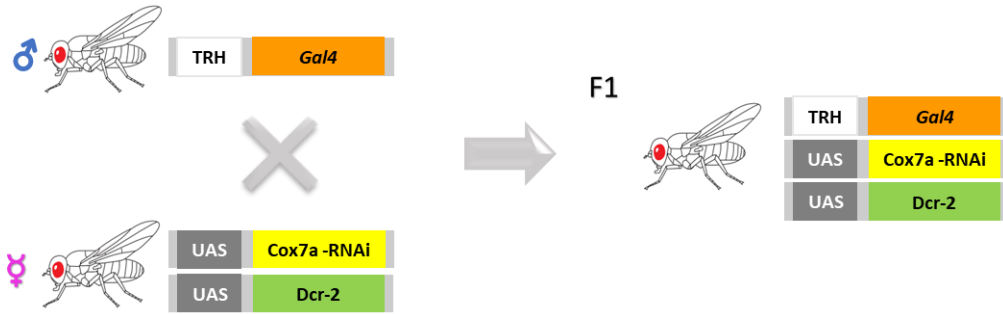
DDC-Gal4 için kontrol grubu oluşturulması amacı ile UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile DDC-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. DDC-Gal4 / +; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.



Şekil 14. DDC kontrol grubunun oluşturulması.
Genler homozigot olarak taşınmaktadır, basitleştirmek için tek kromozom olarak şematize edilmiştir.

3.7.1.6. TRH knockdown grubu (TRHKD)

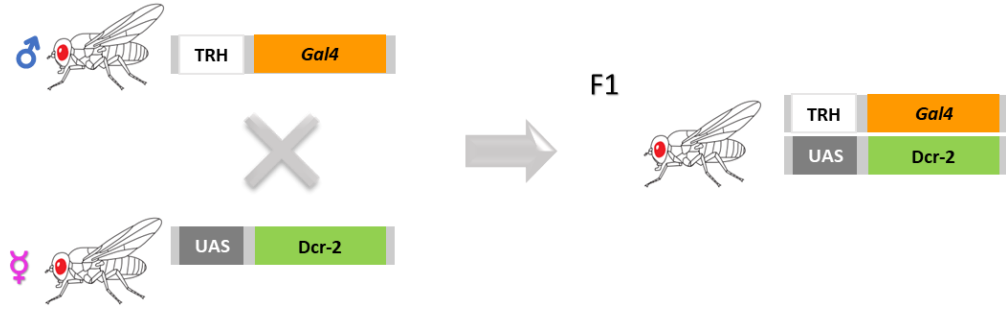
Sadece serotonerjik nöronlarda COX enzim eksikliği oluşturulması amacı ile UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TRH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / TRH-Gal4 ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.



Şekil 15. TRH knockdown grubunun oluşturulması.
Genler homozigot olarak taşınmaktadır, basitleştirmek için tek kromozom olarak şematize edilmiştir.

3.7.1.7. TRH kontrol grubu (TRHKon)

TRH-Gal4 için kontrol grubunu oluşturulması amacı ile UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TRH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. TRH-Gal4 / +; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.



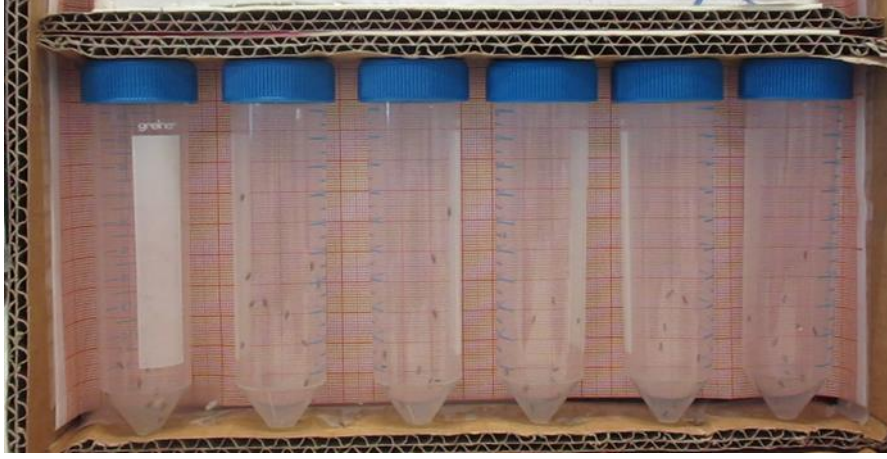
Şekil 16. TRH kontrol grubunun oluşturulması. Genler homozigot olarak taşınmaktadır, basitleştirmek için tek kromozom olarak şematize edilmiştir.

3.7.2. Tırmanma Deneyi

Tırmanma Deneyi için Negatif Geotaksis Assay'ın bir varyasyonu olan Rapid iterative negative geotaxis (RING) assay yöntemi kullanıldı (80,81). Kullanılan yöntem aşağıda maddeler halinde yazıldı.

1. Çaprazlanmış sinekler çiftleşmeleri için oda sıcaklığında 2 gün bekletildi.
2. Sinekler yeni birer tüpe aktarıldı ve 25 °C inkübatörde 24 saat bekletildi.
3. Bu son işlem 2 defa daha yapılarak erişkin sinekler uzaklaştırıldı ve yumurta içeren toplamda 3'er adet tüp elde edildi.
4. Sinekler çıkana kadar tüpler 25 santigrat derece inkübatörde tutuldu.
5. Tüplerden çıkan bakire sinekler 3 gün boyunca toplanarak yeni tüplere aktarıldı ve 25 santigrat derece inkübatörde tutuldu.
6. Deneyden 3 gün önce toplanan bu bakire sinekler yeni tüplere 10'arlı gruplar halinde aktarıldı. Bu aşamadan sonra bir daha CO₂ anestezisi kullanılmadı.
7. Deney günü her bir tüp içindeki sinekler birer 50ml Falkon tüplere aktarıldı.
8. Aynı genotipteki sinekler beraberce önü açık, arkasına milimetre kâğıdı kaplanmış karton kutuya yan yana ve dik bir biçimde yerleştirildi.
9. Burada 1 dakika alışma süresi tanındı.
10. Tüpler aynı anda karton kutu aracılığı ile yere vuruldu ve tüpteki sineklerin dibe düşmeleri sağlandı.
11. Vurma işlemi 30 saniye aralarla toplam 3 defa olacak şekilde tekrarlandı.
12. Bu esnada 1 metrelik mesafeden Canon Ixus 170 kamera ile görüntü kayıt altına alındı.
13. Deney bittikten sonra sinekler morga atıldı.

14. Görüntülerin analizi GOM Media Player uygulaması aracılığı ile yavaş çekimde izlenerek yapıldı.
15. Her bir tüp için 10 saniye içinde 6 cm tırmanabilen sinekler sayıldı ve kaydedildi.
16. Aynı tüplerin skorlarının ortalaması alınarak tırmanma indeksi hesaplandı.



Şekil 17. Tırmanma deneyi için kullandığımız platform.

Deneyin sonuçları box plot grafiği ile gösterilmiştir. Bu gösterimde orta hatlar medyanları gösterir. Kutu sınırları, R yazılımı tarafından belirlenen 25. ve 75. persentilleri gösterir. Bıyıklar, persentiller arası aralığın 1,5 katı kadar uzundur (Tukey metodu).

3.8. ÖMÜR UZUNLUKLARININ BELİRLENMESİ

UAS-Gal4 ikili sistemi yardımı ile yapılan çaprazlar sonucu 5 grup oluşturuldu. Grupların yaşam süreleri ömür deneyi (lifespan assay) ile belirlendi.

3.8.1. Grupların Oluşturulması

3.8.1.1. Negatif kontrol grubu oluşturulması:

UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile w^{1118} genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / + ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.8.1.2. Pan-nöronal COX Knockdown Grubu (PKD)

Pozitif kontrol grubu oluşturulması için UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile Elav^{C155}-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. Elav^{C155}-Gal4 / + ; UAS-CG9603-RNAi / + ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.8.1.3. TH Knockdown grubu (THKD):

Sadece Dopaminerjik nöronlarında COX enzimi susturulmuş deney grubu oluşturulması için UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / TH-Gal4; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.8.1.4. DDC Knockdown grubu (DDCKD)

Dopaminerjik ve Serotonerjik nöronlarında COX enzimi susturulmuş deney grubunun oluşturulması için UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / DDC-Gal4 ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.8.1.5. TRH Knockdown grubu (TRHKD)

Sadece serotonerjik nöronlarda COX enzimi susturulmuş deney grubunun oluşturulması amacı ile UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TRH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / TRH-Gal4 ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.8.2. Ömür Deneyi

Grupların yaşam ömürleri Lifespan Assay yöntemi ile belirlendi. Yöntem aşağıda özetlendi.

1. Çaprazlanan sinekler oda ısısında 2 gün bekletildi.
2. İki günün ardından sinekler yeni tüplere aktarılarak 25 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildi. Boşalan tüp 25 santigrat derecede muhafaza edildi.

3. İki numaralı işlem 2 kere daha tekrarlanarak toplamda 3 tüp yumurta toplanılmış oldu.
4. Çaprazlanmış erişkin sinekler morga atıldı.
5. İnkübasyonun ardından pupalardan çıkan dişi sinekler, her bir tüp için 20 sinek ve her bir grup için 5 tüp olacak şekilde yeni tüpler içine aktarıldı.
6. Bundan sonra yaklaşık 2 ay boyunca, her pazartesi çarşamba ve cuma, sineklerin tüpleri değiştirildi.
7. Tüp değişimi sırasında her bir tüp içindeki ölü sinekler sayılarak kayıt altına alındı.
8. Zamanla değişen sinek miktarı ve ölenlerin sayısı grafiğe döküldü.

3.9. PUPAL ÖLÜM ORANLARININ BELİRLENMESİ

3.9.1. Grupların Oluşturulması

3.9.1.1. Negatif kontrol grubu oluşturulması

UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile w^{1118} genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / + ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.9.1.2. TH Knockdown grubu (THKD)

Sadece Dopaminerjik nöronlarında COX enzimi susturulmuş deney grubu oluşturulması için UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / TH-Gal4; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.9.1.3. DDC Knockdown grubu (DDCKD)

Dopaminerjik ve Serotonerjik nöronlarında COX enzimi susturulmuş deney grubunun oluşturulması için UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / DDC-Gal4 ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.9.1.4. TRH Knockdown grubu (TRHKD)

Sadece serotonerjik nöronlarda COX enzimi susturulmuş deney grubunun oluşturulması amacı ile UAS-CG9603-RNAi; UAS-Dcr-2 genotipindeki bakire sinekler ile TRH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler çaprazlandı. UAS-CG9603-RNAi / TRH-Gal4 ; UAS-Dcr-2 / + genotipinde sinekler elde edildi.

3.9.2. Pupa Ölüm Deneyi

Gruplardaki pupa ölüm oranlarının belirlenmesi Pupal Lethality Assay yöntemi ile belirlendi. Yöntem aşağıda özetlendi.

1. Çaprazlanan sinekler oda ısısında 2 gün bekletildi.
2. İki günün ardından sinekler yeni tüplere aktarılarak 25 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildi. Boşalan tüp 25 santigrat derecede muhafaza edildi.
3. İki numaralı işlem 2 kere daha tekrarlanarak toplamda 3 tüp yumurta toplanılmış oldu.
4. Çapraz yapılmış erişkin sinekler morga atıldı.
5. Deney boyunca tüplerdeki toplam pupa sayısı ve pupadan çıkan sinek sayısı günlük olarak sayıldı ve erişkin sinekler tüpten uzaklaştırıldı.
6. Baştaki pupa sayısı ile çıkan sinek sayısı oranlanarak pupaların erişkinliğe dönme yüzdesi hesaplandı.

Deneyin sonuçları box plot grafiği ile gösterilmiştir. Bu gösterimde orta hatlar medyanları gösterir. Kutu sınırları, R yazılımı tarafından belirlenen 25. ve 75. persentilleri gösterir. Bıyıklar, persentiller arası aralığın 1,5 katı kadar uzundur (Tukey metodu).

3.10. İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

Kullanılan sinek hatlarının ve oluşturulan çaprazların istenilen nöron gruplarında etkili olduğunu sınamak için immünohistokimyasal yöntemlerden faydalanıldı.

3.10.1. Grupların Oluşturulması

3.10.1.1. *Dopaminerjik n6ron 7ekirdeklerinde GFP ekspresyonu (TH>Stinger)*

UAS-Stinger genotipindeki bakire dişi sinekler ile TH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler 7aprazlandı. TH-Gal4 / UAS-Stinger genotipinde sinekler elde edildi.

3.10.1.2. *Dopaminerjik ve Serotonerjik n6ron 7ekirdeklerinde GFP ekspresyonu (DDC>Stinger)*

UAS-Stinger genotipindeki bakire dişi sinekler ile DDC-Gal4 genotipindeki erkek sinekler 7aprazlandı. Ddc-Gal4 / UAS-Stinger genotipinde sinekler elde edildi.

3.10.1.3. *Serotonerjik n6ron 7ekirdeklerinde GFP ekspresyonu (TRH>Stinger)*

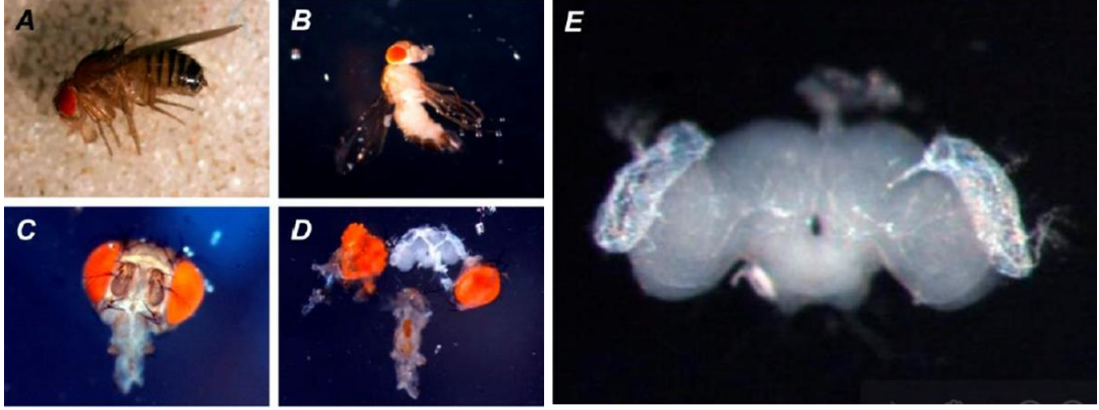
UAS-Stinger genotipindeki bakire dişi sinekler ile TRH-Gal4 genotipindeki erkek sinekler 7aprazlandı. TRH-Gal4 / UAS-Stinger genotipinde sinekler elde edildi.

3.10.2. Beyin Diseksiyonu

7aprazlanan sineklerin beyinleri fiksasyon ve boyama işlemleri i7in aşağıdaki y6nteme g6re diseke edildi.

1. Sineklerin bulunduğu t6p bir s6re buzun 6st6nde bekletilerek sineklerin anestezisi sağlandı.
2. Hareketsiz kalan sinekler daha 6nce buzun 6st6ne yerleştirilmiş, i7i silikon kaplı petri kabına aktarıldı.
3. İ7i daha 6nceden silikon kaplanmış kuyucukları olan altılı well plate'in bir g6z6ne %70'lık Alkol 76zeltisi iki g6z6ne de daha 6nceden hazırlanmış HL 3.1 76zeltisi eklenerek stereo mikroskopun altına yerleştirildi.
4. İşlem 6ncesi bilenerken u7ları iyice inceltilmiş forsepsler yardımı ile sinek g6vde karın b6lgesi arasından tutularak alkol 76zeltisine daldırıldı. Bu sayede sineğin 7evresindeki hidrofobik tabaka ve kirlerden arındırıldı.
5. Sinek hemolenf 76zeltisine aktarılarak proboscis ile g6z6 arasından tutularak kafa g6vdeden ayrıldı.

6. Önce kutikula tabakası ve proboscis sonra da trakea dikkatlice beyinden sıyrıldı.
7. Bu işlemler istenilen sayıda beyin elde edilene kadar uygulandı.



Şekil 18. Beyin diseksiyonu aşamaları ve beyin dokusu. A-B-C-D) Diseksiyon aşamaları. E) Disseke edilmiş sinek beyini ve trakea yapıları. (82) numaralı referanstan modifiye edilerek kullanılmıştır.

3.10.3. Çıkarılan Beyinlerin Fiksasyonu

1. Diseke edilmiş bütün haldeki (whole-mount) Drosophila beyinleri fiksasyonu için ince uçlu bir pipet yardımıyla 2ml'lik Eppendorf tüpüne aktarıldı.
2. Tüp üzerinde bir miktar hava boşluğu kalacak şekilde %4 paraformaldehit ile dolduruldu.
3. 20 dakika boyunca +4 C derecede bir rotator aracılığı ile dönmesi sağlandı.
4. Tüpteki sıvı, mikroskop altında bir pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı. Üzerine %0,1'lik Triton X-100 PBS çözeltisi eklenerek tekrar 20 dakika +4 derecede rotator aracılığı ile fiksatifin yıkanması sağlandı.
5. Son madde toplamda 3 defa yıkama yapılacak şekilde tekrarlandı.

3.10.4. Boyama işlemi

1. Fiksasyonu tamamlanmış beyinler 5% bovine serum albümin (BSA) – PBSTx karışımı ile 20 dakika karıştırıldı.
2. 5% BSA – PBSTx karışımı içinde Tavşan anti-TH (1:200) ve Fare anti-GFP clone 1G9 (1:200) primer antikorları eklenerek 2 gece +4 derecede antikorların hedef proteinlerine tutunması sağlandı

3. Vialdeki sıvı, mikroskop altında bir pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı. Üzerine %0,1'lik Triton X-100 PBS çözeltisi eklenerek tekrar 20 dakika +4 derecede rotator aracılığı ile dönmesi sağlandı.
4. Son madde toplamda 3 defa yıkama yapılacak şekilde tekrarlandı.
5. Beyinler, 5% BSA – PBSTx karışımı içinde Alexa 568 keçi anti-tavşan (1:500) ve Alexa 488 keçi anti-fare (1:500) sekonder antikorları ile karanlıkta, +4 santigrat derecede 2 gece rotatorda dönmeye bırakıldı. Bu floresan antikorların primer antikorlara tutunması ile hedef moleküller işaretlendi.
6. Ardından PBSTx ile 3x20 dakika, karanlıkta yıkama işlemi yapıldı.

3.10.5. Dokuların Lama Yüklenmesi

1. Beyinler %80 gliserol ve ultrapure su içeren mounting solüsyonu kullanılarak lamlara aktarıldı.
2. Lamel çift taraflı bant yardımı ile hafif yükseltildi.
3. Lamelin kenarları tırnak cilası ile mühürlendi.

3.10.6. Görüntü Analizi ve Hücre Sayımı

Görüntüler Zeiss LSM 700 model Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ve Plan-Apochromat 10x/0.45 objektif aracılığı ile elde edilmiştir, görüntü kaydı Zen yazılımı aracılığı ile yapılmıştır.

Optik kesitler ImageJ yazılımı aracılığı ile analiz edilmiştir. Analiz sırasında sadece GFP, sadece anti-TH antikor ve ikisi beraber boyanan nöron nükleusları sayılarak not edilmiş, her gruptan en az 70 nöron sayılmıştır. Bulgular kısmında paylaştığımız görüntüler optik kesitlerin üst üste bindirilmesi (maximum intensity projection) ile oluşturulmuştur.

3.11. İSTATİSTİK YÖNTEMLER

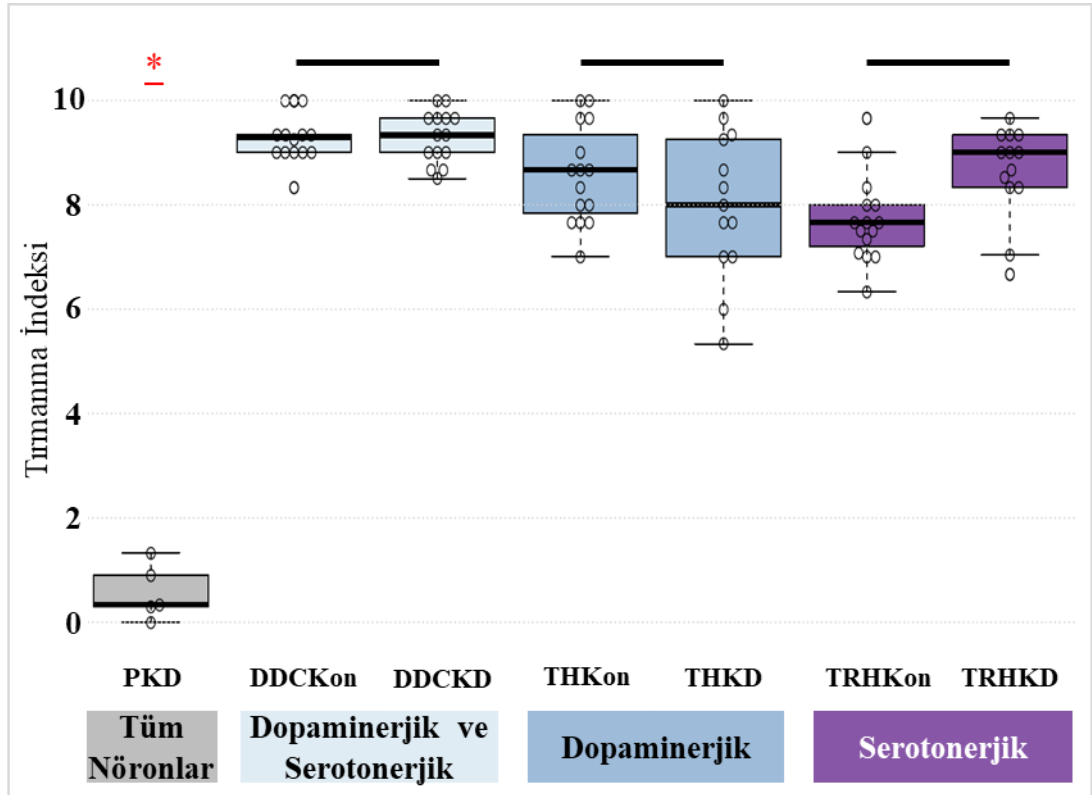
Veriler SPSS 24.0 (IBM SPSS Statistics 24 software) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart hata, ortanca (minimum ve maksimum değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

Bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olması durumunda Post Hoc test olarak LSD testi ile ikili grup farklılıkları incelenmiştir. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise ki-kare analizi ile incelenmiştir. Sağkalım analizlerinde, Kaplan Meier eğrileri kullanılarak bağımsız grupların sağkalım farklılıkları için Log-rank yöntemi kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. HAREKET BOZUKLUKLARININ BELİRLENMESİ

Yapılan tırmanma deneyi sonucunda pozitif kontrol grubu sonuçları diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Grupların kendi kontrolleri ile arasında ise anlamlı bir fark saptanamamıştır (Şekil 19).



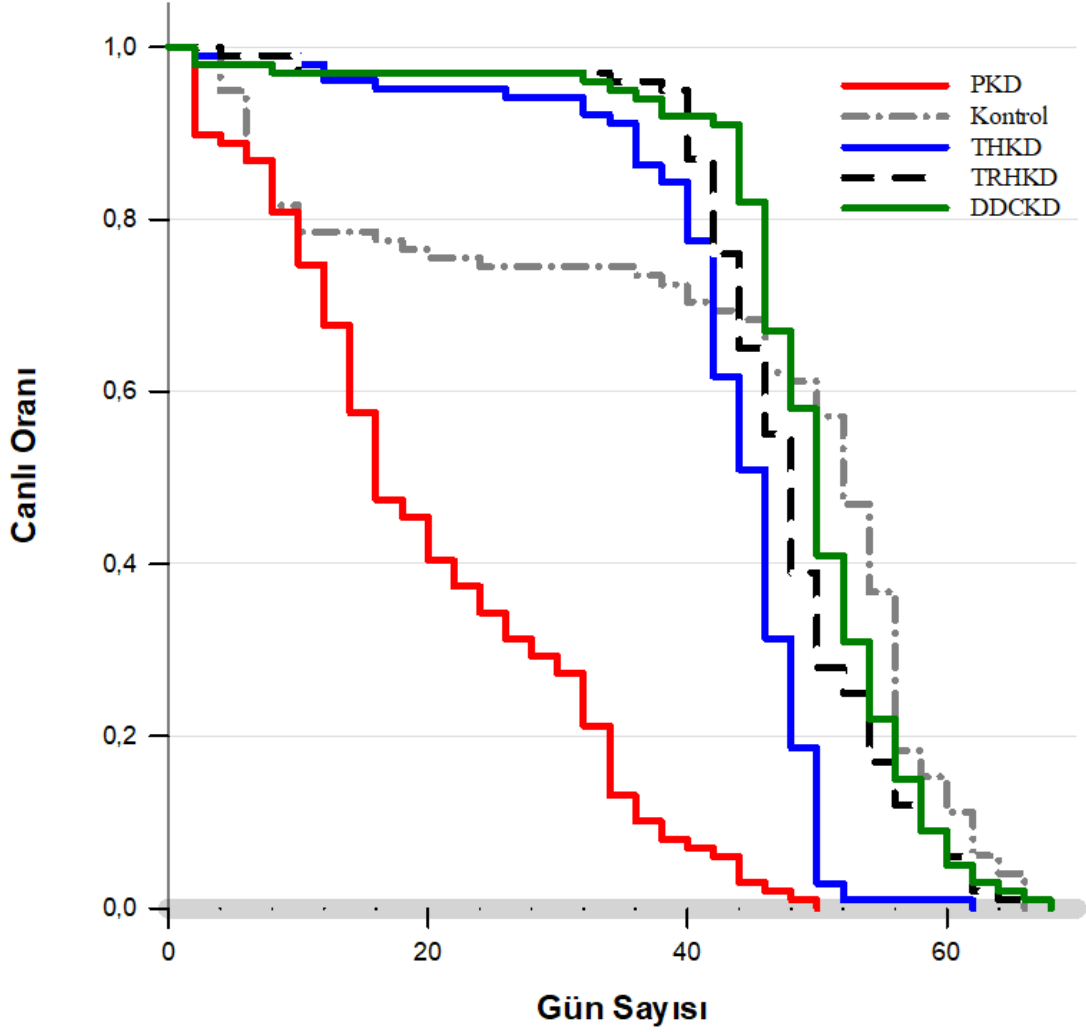
Şekil 19. Grupların hareket kabiliyetlerinin tırmanma deneyi ile değerlendirilmesi.

PKD: Pan-nöronal knockdown grubu (n=5), THKD: TH Knockdown grubu (n=14), THKon: TH Kontrol grubu (n=14), DDCKD: DDC Knockdown grubu (n=15), DDCKon: DDC Kontrol grubu (n=13), TRHKD: TRH Knockdown grubu (n=15), TRHKon: TRH Kontrol grubu (n=13). *: $p<0,001$ diğer gruplardan fark; —: gruplar arasında anlamlı fark yok.

4.2. ÖMÜR UZUNLUKLARININ BELİRLENMESİ

Deney grupları erişkin sineklerinin ömür uzunluklarındaki farklılığın araştırılması için lifespan assay deneyi uygulanmıştır. Her bir grup için 5 tüp içinde 20'şer sinek olacak şekilde toplamda 100 dişi sinek kullanılmıştır. Canlı sayısındaki

değişim Kaplan-Meier eğrisi ile çizdirilmiştir (şekil 20). Her bir çizgisel gösterim deney gruplarındaki sinek sayılarının zamana bağlı olarak değişimini göstermektedir. Gruplar arasındaki fark log-rank testi ile ölçülmüş ve anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p < 0,0001$).



Şekil 20. Gruplardaki canlı oranının zamana bağlı değişiminin Kaplan-Meier eğrileri ile gösterilmesi. X eksenini deneyin başlangıcından itibaren geçen gün sayısını, Y eksenini ise yaşayan sinek oranını kesir olarak göstermektedir. PKD: Pan-nöronal knockdown grubu, THKD: TH Knockdown grubu, DDCKD: DDC Knockdown grubu, TRHKD: TRH Knockdown grubu.

Pan-nöronal COX enzim eksikliği oluşturulmuş PKD grubunda yaşam süresinin diğer gruplara göre anlamlı bir biçimde kısa olduğu görülmüştür ($p < 0,0001$). Sadece dopaminerjik nöronlarda COX enzim eksikliği oluşturulmuş THKD grubu PKD grubuna göre anlamlı derecede uzun yaşamış fakat diğer gruplara göre anlamlı derecede kısa ömür uzunluğu göstermiştir (Tablo 5).

Dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarında COX enzim eksikliği oluşturulmuş DDCKD grubu ile sadece serotonerjik nöronlarında COX enzim eksikliği oluşturulmuş TRHKD grubu PKD ve THKD grubuna göre anlamlı derecede uzun yaşamış, kontrol grubundan anlamlı bir farkları bulunamamıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Ömür uzunluklarının ortalama, ortanca değerleri, standart hataları ve güven aralığı değerleri

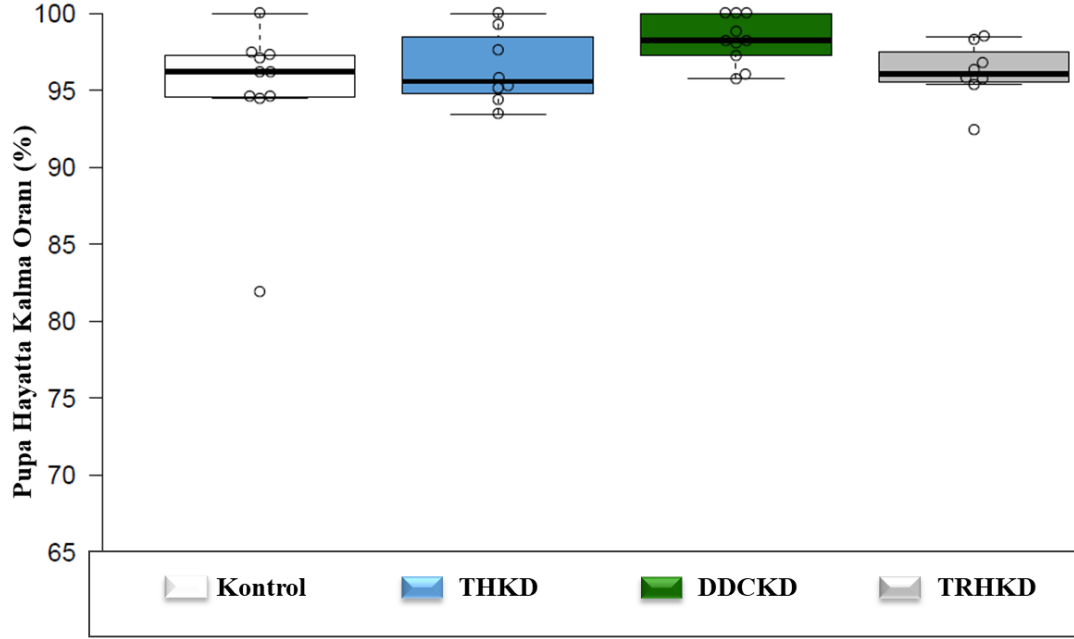
Gruplar	Ortalama \pm SH	95% GA	Ortanca \pm SH	95% GA	Maximum Ömür
Kontrol	42,49 \pm 2,11	38,36 – 46,62	52 \pm 0,988	50,06 – 53,94	66
PKD *	20,22 \pm 1,27	17,73 – 22,71	16 \pm 1,75	12,56 – 19,44	50
THKD *, #	42,92 \pm 0,89	41,17 – 44,67	46 \pm 0,61	44,82 – 47,19	62
TRHKD #, θ	47,42 \pm 0,96	45,54 – 49,30	48 \pm 0,61	46,81 – 49,20	68
DDCKD #, θ	49,08 \pm 1,02	47,08 – 51,08	50 \pm 0,58	48,87 – 51,13	68

PKD: Pan-nöronal knockdown grubu, THKD: TH Knockdown grubu, DDCKD: DDC Knockdown grubu, TRHKD: TRH Knockdown grubu. N=100. *: p<0.001 düzeyinde kontrol grubundan fark, #: p<0.001 düzeyinde PKD grubundan fark, θ : p<0.001 düzeyinde THKD grubundan fark.

4.3. PUPAL ÖLÜM ORANLARININ BELİRLENMESİ

COX enzim eksikliğinin pupal dönemdeki hayatta kalma oranlarına etkisi pupal lethality assay yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırılarak anlamlılık değerlendirildi. Deney gruplarının hiçbirinde kontrole göre

anlamli bir fark gözlenmedi (Şekil 21).



Şekil 21. Grupların hayatta kalım oranları.

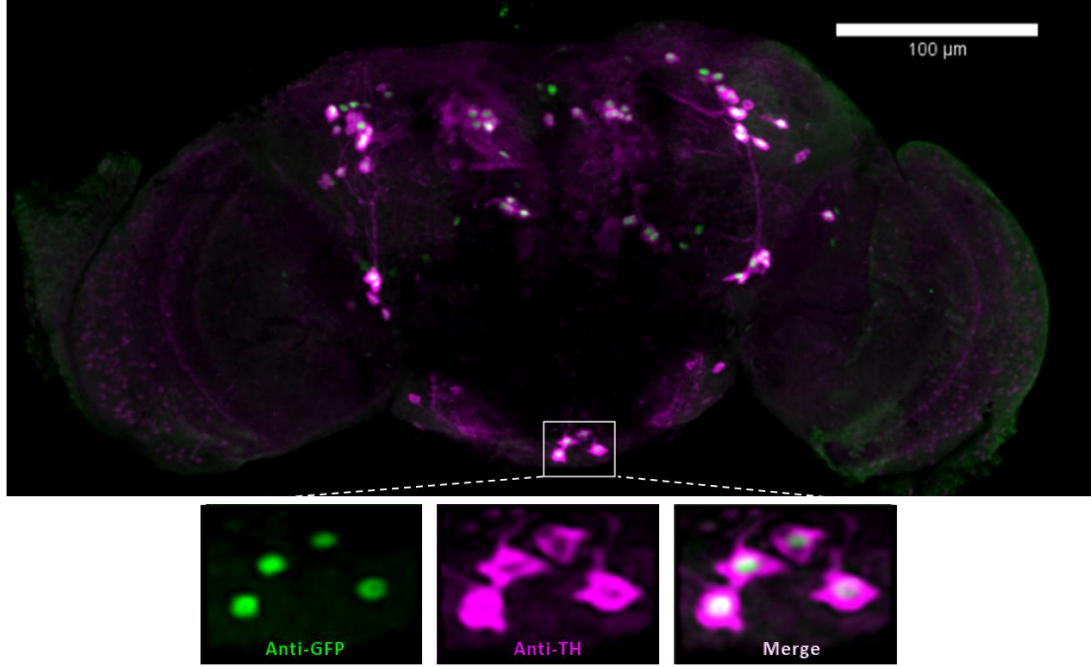
X eksenini deney gruplarını, Y eksenini pupadan erişkinliğe geçiş oranını yüzde olarak gösterir. Kontrol (n=10), THKD: TH Knockdown grubu (n=8), DDCKD: DDC Knockdown grubu (n=10), TRHKD: TRH Knockdown grubu (n=8).

4.4. İMMUNOHİSTOKİMYA BULGULARI

Deneilerde kullanılan driver sinek hatları UAS-Stinger sineklerle çaprazlanarak, sırası ile TH-Gal4, DDC-Gal4 ve TRH-Gal4 ekspresyonu yapan sinir hücrelerinin nükleuslarında GFP ekspresyonu sağlandı. Bu ekspresyonun oluşturacağı floresan ışımaya, GFP primer ve sekonder antikorları yardımı ile güçlendirildi. Anti-TH antikorunu tirozin hidroksilaz enzimi ifade eden sinir hücrelerinin boyanması için kullanıldı. GFP ekspresyonu olan nükleuslar yeşil renk ile, dopamin sentezinde görev yapan tirozin hidroksilaz enzimi ise mor renk ile gösterilmiştir. Kolokalizasyonun olduğu hücreler birleştirilmiş görüntülerde (merge) beyaza yakın görülmektedir.

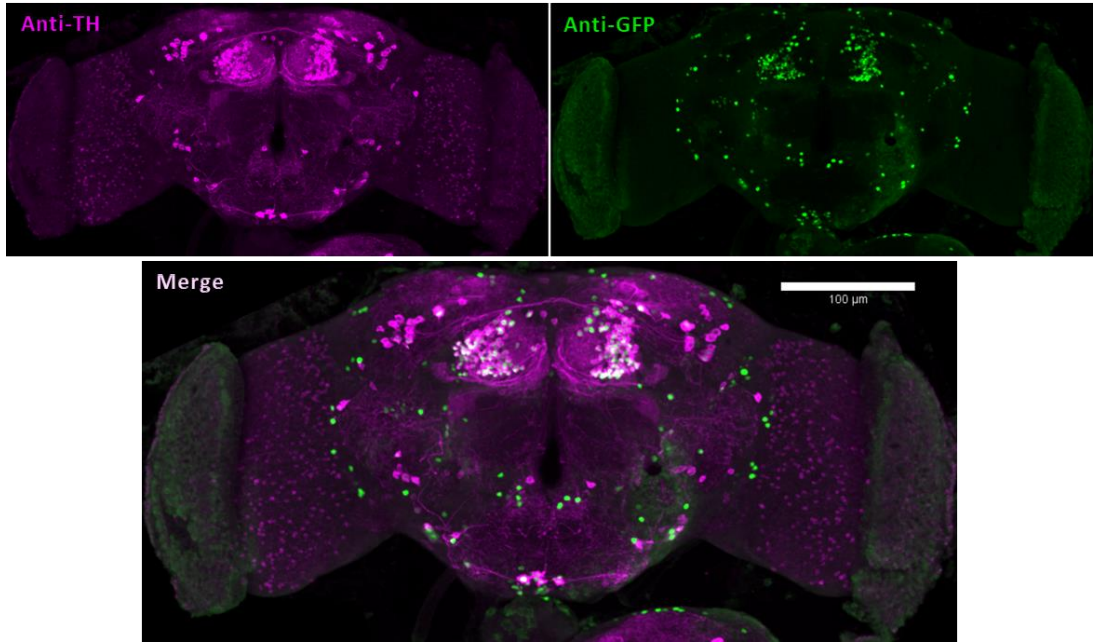
Birleştirilmiş görüntüde nöron nükleusları sadece GFP boyanan veya beraber boyananlar (kolokalize) olacak şekilde sınıflandırılarak sayılmış, kolokalizasyon oranları bulunmuştur. TH>Stinger grubunda kolokalizasyon oranı %91,4 (şekil 22),

DDC>Stinger grubunda %65,6 (şekil 23), TRH>Stinger grubunda %16,8 (şekil 24) olarak bulunmuştur.



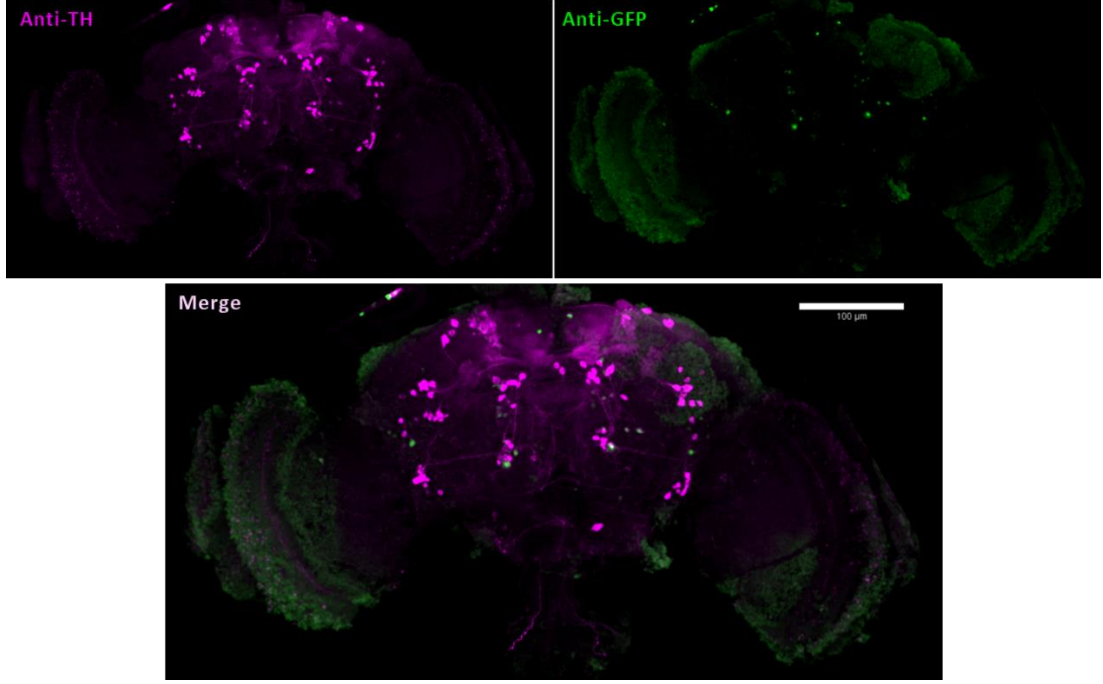
Şekil 22. TH>Stinger sineklerde floresan görüntüleme.

TH>Stinger sineklerde anti-TH ve anti-GFP antikor ile immünfloresan boyaması yapılan tam beyin dokusunun konfokal mikroskopi görüntüsü. Görüntü optik kesitlerin üst üste bindirilmesi ile oluşturulmuştur. Alttaki görüntüler kolokalizasyonları daha yakından göstermektedir.



Şekil 23. DDC>Stinger sineklerde floresan görüntüleme.

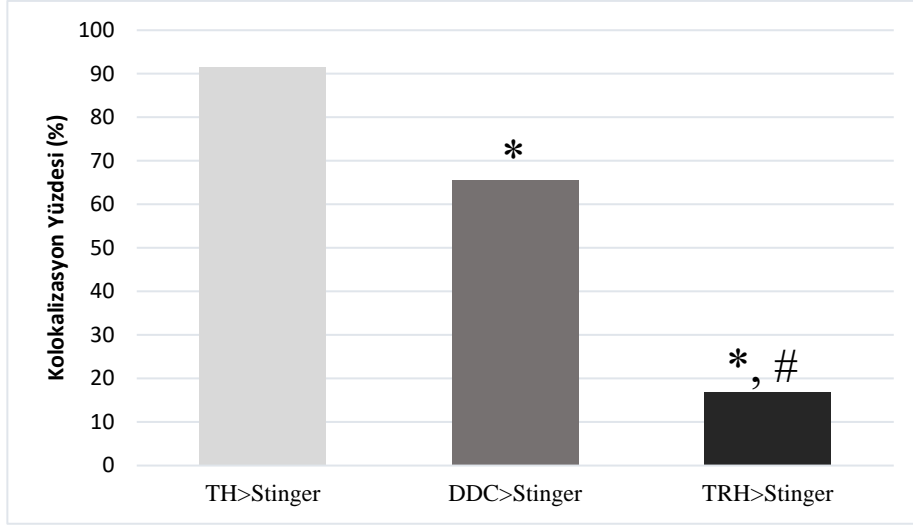
DDC>Stinger sineklerde anti-TH ve anti-GFP antikor ile immünfloresan boyaması yapılan tam beyin dokusunun konfokal mikroskopi görüntüsü. Görüntü optik kesitlerin üst üste bindirilmesi ile oluşturulmuştur.



Şekil 24. TRH>Stinger sineklerde floresan görüntüleme. TRH>Stinger sineklerde anti-TH ve anti-GFP antikor ile immünfloresan boyaması yapılan tam beyin dokusunun konfokal mikroskopi görüntüsü. Görüntü optik kesitlerin üst üste bindirilmesi ile oluşturulmuştur.

4.4.1. Kolokalizasyon Oranlarının Değerlendirilmesi

Kolokalizasyon oranları bulunmuş grupların, iki yüzde arasındaki anlamlılık testi ile aralarındaki anlamlılık değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki fark anlamlıdır.



Şekil 25. Grupların anti-TH antikoruna ile kolokalizasyon oranları (%).

*: TH TRH>Stinger grubuna göre anlamlı fark, #: DDC>Stinger grubuna göre anlamlı fark.

TARTIŞMA

Mitokondriyal disfonksiyonların, nörodejeneratif hastalıklardan kardiyovasküler bozukluklara, kanserden obeziteye kadar pek çok hastalıkla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (83). Daha önceden oldukça nadir görülen bir grup bozukluk olarak nitelendirilen mitokondriyal bozuklukların, yeni epidemiyolojik çalışmaların yardımı ile sanıldığından çok daha sık (en az 1/5000) olduğu bulunmuştur (18,34). Bireysel mitokondriyal mutasyon oranı daha da sıktır. Elliott ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada en az 200 sağlıklı insanın 1'inde patolojik mtDNA mutasyonu gözlemlemiştir (84).

Mitokondrinin primer hastalıklarının yanı sıra, Parkinson Hastalığı, Alzheimer Hastalığı ve Otizm Spektrum Bozuklukları gibi sık görülen nörolojik rahatsızlıkların mitokondriyal bozukluklarla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (3,4,85). Metabolizmada çok merkezi bir rol üstlenen ve enerji üretiminden kalsiyum homeostazisine kadar pek çok görevi bulunan mitokondrinin, pek çok hastalık ile ilişkisinin fark edilmesi, mitokondriyal hastalıkları daha iyi anlamamız gerektiğini göstermektedir.

Nörodejenerasyon bir hastalığa veya yaşlanmaya bağlı olarak sinir hücrelerinin yapı veya fonksiyonlarında bozulmaya bağlı ilerleyici nöron kaybı olarak tanımlanabilir. Epidemiyolojik araştırmalar ışığında artan yaş ile nörodejeneratif hastalıklar arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Günümüzün yaşlanan toplumunda nörolojik hastalıkları anlamının önemi gün geçtikçe artmaktadır. Alzheimer, Parkinson ve Motor Nöron hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ile mitokondriyal hastalıklara bağlı nörodejenerasyon farklı klinik tablolar oluştursalar da patogeneizde bazı benzerlikler mevcuttur. Mitokondriyal hastalıkların oluşturduğu nörodejenerasyonun ve buna bağlı gelişen hareket bozukluklarının daha iyi anlaşılması diğer nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisine ışık tutabilir.

COX enzimi (kompleks IV) eksikliği, insanda ETZ fonksiyon bozukluğu oluşturan en sık sebeplerden biridir ve mutasyonları myopati, MELAS, ensefalomyopati ve motor nöron hastalığı benzeri çeşitli fenotiplerle ilişkilendirilmiştir (6). 13 farklı altbirimden oluşan yapısı ve birleşme süreci ile oldukça komplekstir (29). ETZ'nin son enzimi ve elektronların son durağıdır. Sitokrom C molekülündeki elektronları moleküler oksijene aktarır. Burada oluşan

mutasyonlar kompleksler üzerinden akan elektronların son durağı olan oksijen ile birleşmemesine sebep olur. ETZ birbiri ile devamlılık içeren enzimler bütünüdür ve bir enzim kompleksindeki fonksiyon bozukluğu diğer kompleksleri de etkileyerek ETZ üzerindeki elektron akışını durmasına ve membranlar arası boşluğa proton pompalanmasının sekteye uğramasına neden olur. Sonuç olarak ATP üretimi durur, hücre enerji ihtiyacını karşılayamaz hale gelir. Hücreyi fonksiyon bozukluğuna veya ölüme götüren diğer bir sebep de hücre içinde oksidatif stresin artması olacaktır. Çünkü mitokondriyal disfonksiyon sonucu moleküler oksijene aktarılamayan elektronlar matrikse gelerek reaktif oksijen türlerinin oluşmasına sebep olur. Artan oksidatif stres hem hücre içi metabolizmayı bozar hem de mDNA üzerine genotoksik etki göstererek yeni mitokondriyal disfonksiyonlara sebep olabilir (33).

Mitokondriyal bozuklukların klinik semptomlar oluşturabileceği üzerine ilk kanıt 1962 yılında Lutf ve arkadaşları tarafından hipermetabolizm bulguları ile seyreden bir kadın hastada ortaya atılmıştır (86). O günden bu yana mitokondriyal bozukluklar ve olası tedavileri üzerine çalışma yapmak için araştırmacılar hayvan modelleri kullanmışlardır. Fare modellerinin bazı kısıtları olması araştırmacıları alternatif modeller arayışına itmiştir. Bir model olarak *Drosophila* mitokondriyal fonksiyon bozuklukları da dahil olmak üzere pek çok hastalık için uygun bir model sunar. Özellikle Gal4-UAS ikili sistemi ve RNA interferans yönteminin gelişmesi ile güçlü bir alternatif model haline gelmiş ve çok sayıda mitokondriyal hastalık modeli oluşturulmuştur (87). Oksidatif fosforilasyon komplekslerinin bileşimi, mtDNA'nın genel yapısı ve gen içeriği ve temel sistemlerinin enerji metabolizması, insanlara benzerdir (12).

Drosophila COX enziminin nükleer DNA'da kodlanan altbirimleri çoğunlukla, tek kopya genler olarak kodlanır. Fakat iki önemli istisna, testise spesifik bir isoformu (CG10396) ve yaygın olarak eksprese edilen ikinci bir isoformu (CG10664) bulunan COX4 ve yine testise spesifik bir isoformu (CG18193), daha çok kaslarda ifade edilen bir isoformu (CG34172) ve hemen her yerde ifadesi olan üçüncü bir isoformu (CG9603) olan COX7a altbirimleridir. CG9603 beyindeki COX7a ifadesinin %99'undan sorumludur.

Önceki çalışmalarda tüm nükleer DNA kaynaklı COX mutasyonlarının letal olması kompleks IV'ün nDNA mutasyonlarının hayatla bağdaşmadığını düşündürmekteyken Liu ve ark. *Drosophila*'da COX6a altbirimi mutasyonunun (levy mutasyonu) mitokondriyal ensefalopati benzeri progresif nörodejenerasyon ve kısalmış ömür ile seyrettiğini göstermiştir (88).

Kemppainen ve ark. COX7a altbiriminin CG9603 isoformunun RNAi yöntemi ile susturulması sonucu nöronlardan kaynaklanan bir hareket bozukluğu tespit etmişlerdir (12). Andjelkovic ve ark. yaptıkları çalışmada nöronal Cox7a (isomer CG9603) eksikliğinde oluşan hareket bozukluğunu teyit eden ikinci çalışma olmuştur.

İnsanda Substantia nigra pars compacta'da bulunan dopaminerjik nöronların kaybının Parkinson Hastalığı ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (89). *Drosophila* beyinde göreceli olarak az sayıda dopaminerjik nöron vardır (~130) fakat bu nöron gruplarının, motivasyon, ödül mekanizması, bağımlılık, öğrenme ve bellek fonksiyonları gibi pek çok fonksiyonda rolü olduğu bulunmuştur. Bu fonksiyonların en önemlilerinden birisi istemli hareketin kontrolüdür.

Tüm bu bilgiler ışığında bizim hipotezimiz tüm beyindeki COX enzim eksikliğinde gelişen hareket bozukluğunun altında yatan temel mekanizmanın dopaminerjik nöronlarda oluşan fonksiyon bozukluğu olabileceğiydi. Hipotezimizi sınamak için sadece dopaminerjik nöronlarında COX enzimi susturulmuş transgenik sinekler oluşturarak grupların tırmanma testi ile hareket becerilerini değerlendirmeyi planladık. Bunun yanında oluşturduğumuz enzim eksikliğinin ömür uzunluğuna ve pupal ölüm oranlarına etkisini inceledik.

Grupları oluşturmak için *Drosophila melanogaster* türünde yıllardır başarı ile kullanılan bir yöntem olan GAL4-UAS ikili sistemini kullandık. Bu yöntemde kullanılan Gal4 sinek hatları gen ifadesinin hücre tipi spesifik olarak yapılmasını sağladı. TH-Gal4 sinek hattında GAL4 geni, tirozin hidroksilaz geninin promoter'ının hemen önünde yer aldığı için sadece bu promoter'ın aktif olduğu hücreler olan dopaminerjik nöronlarda gen ifadesi sağladı. *Drosophila*'da dopaminerjik nöronlarda gen ifadesi gerçekleştirebilecek diğer driver sinek hattı olan DDC-Gal4 sinek hattını da çalışmamızda kullandık. DDC-Gal4 sinek hattı dopa dekarboksilaz enziminin promoter'ı aracılığı ile bu enzimi üreten hücreler olan hem dopaminerjik hem de

serotonerjik nöronlarda Gal4 ifadesini sağladı. DDC-Gal4 hattı aracılığı ile gerçekleşecek gen ifadesinin etkilerinin serotonerjik nöronlar üzerinden de görülebilmesi sebebi ile çalışmamızda sadece serotonerjik nöronlarda GAL4 ifadesi sağlayan TRH-GAL4 sinek hattını da kullandık. Böylece sadece serotonerjik nöronlarda gelişen COX eksikliğinin hareket üzerine olan etkisini de incelemiş olduk.

Sineklerde tırmanma hareketi (negatif geotaksis), bir tüpün dibi yere vurulduktan sonra sineğin tüpün duvarında tırmanarak gerçekleştirdiği içgüdüsel bir kaçış tepkisidir. Negatif geotaksis, sineklerin mekanik olarak uyarılmasıyla ortaya çıkar. Geleneksel erişkin tırmanma deneyi (negatif geotaksis), denemeler arasındaki sapma oranı daha yüksek ve daha zaman alıcı bir deneydir. Gargano ve ark. tarafından geliştirilen RING testi, lokomotor ve tırmanma davranışlarını ölçmek için tekrarlanabilir, hassas ve yüksek verimli bir yaklaşım sunarak diğer protokollere göre pek çok avantaja sahiptir (80). RING yöntemi, çok sayıda hayvan kullanılarak, birçok gruba, aynı anda test edilebilir. Bu yüksek verim RING yöntemini tarama deneyleri için daha elverişli kılar. Bu yöntem sineklerin dijital görüntülenmesine dayanır, oldukça az ekipman ve alan gerektirir (81).

Gorgano ve ark. geliştirdikleri yöntemde tüp başına 25 sinek kullanarak deneyi gerçekleştirmişler ve bir dijital kamera aracılığı ile 30 cm uzaktan kayıt almışlar. Ayala ve arkadaşları ise tüpler içinde 10'ar sinek olacak şekilde 1 metre uzaktan kayıt olarak metodu biraz değiştirerek kullanmışlar. Biz de çalışmamızda hareket bozukluğunu değerlendirirken RING yöntemi Ayala ve ark. kullandığı biçimde kullandık.

Tırmanma deneyi sonuçlarımız, pozitif kontrol grubu olarak kullanılan Pan-nöronal COX knockdown grubu tırmanma testi sonuçları diğer gruplara göre anlamlı düşüktü ($p < 0,001$). Hem serotonerjik hem de dopaminerjik nöronlarda gen ifadesini sağlayan DDC-Gal4 aracılı DDC knockdown grubu (DDCKD) sadece dopaminerjik nöronlarda gen ifadesi sağlayan Th-gal4 aracılı TH knockdown grubu ile sadece serotonerjik nöronlarda gen ifadesi sağlayan Trh-gal4 aracılı TRH knockdown grubu kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark göstermedi.

Kemppainen ve ark. Gal4-UAS yöntemi ile ilk defa COX enzim eksikliğini sadece nöronlar üzerinde oluşturarak, nöron spesifik enzim eksikliği oluşturulmuş sineklerin pupal dönemde ölmediğini ve hızlı ilerleyen lokomotor bozukluk ve nöbet eğilimi gösteren bir fenotip geliştirdiğini göstermişler. Elav-Gal4 pupal dönemde gelişmekte olan torasik kaslarda da bir miktar aktiftir. Bu durum Elav-Gal4 kullanılarak oluşturulan fenotiplerin yorumlanmasını bir miktar zorlaştırır. Elav-GAL4 aracılı Cox4, Cox5b veya Cox6a gen susturmasının yarattığı zayıflık, hareketsizlik ve lokomotor işlev bozukluğu, kaslara özgü bir driver olan G14 tarafından üretilen etkilere benzerdir. Fakat kas dokusunda Cox7a ekspresyonu CG34172 izomeri şeklinde ifade edildiğinden, Kemppainen ve ark. kas dokusu spesifik bir driver olan G14 kullanılarak CG9603 susturulması bir etki ortaya çıkarmamıştır. Bu da Elav-GAL4 aracılı nöronal Cox7a (isomer CG9603) eksikliğinde ortaya çıkan lokomotor işlev bozukluğunun tamamen nöral kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. Andjelkovic ve ark. yaptığı çalışma nöronal Cox7a (isomer CG9603) eksikliğinde oluşan hareket bozukluğunu teyit eden ikinci çalışma olmuştur (11). Bizim yaptığımız tırmanma testinde bu grup pozitif kontrol grubu olarak kullanılmış ve sonucunda literatüre uygun şekilde hareket bozukluğu olduğu görülmüştür.

Pan-nöronal COX7a knockdown sonucu oluşan hareket bozukluğunun dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarda oluşturulan knockdown sineklerde görülmemesi, altta yatan patolojinin başka nöron grupları üzerinden etki ediyor olabileceğini düşündürmüştür. Bilgimiz kadarıyla daha önce hiçbir çalışma dopaminerjik ve serotonerjik nöron gruplarında COX7a altbirimi eksikliği oluşturarak hareket bozukluklarını değerlendirmemiştir. Bu çalışma bu anlamda literatürdeki ilk katkıdır.

Daha önce yapılan çalışmalar yaygın COX enzim eksikliğinin sineklerde pupal dönemde letal olabileceğini göstermiştir (10–12,90). Biz de çalışmamızda dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarında COX enzim eksikliği oluşturulmuş sineklerin pupal gelişimlerinin etkilenip etkilenmediğini sınamak istedik. Sonuçta COX enzim eksikliği oluşturulmuş TKKD (sadece dopaminerjik), DDCKD (dopaminerjik ve serotonerjik) ve TRHKD (sadece serotonerjik) gruplarının pupal

dönemden erişkinliğe döneme geçiş oranları ile kontrol grubu arasında ve kendi aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Fernandez-Ayala ve ark. *Drosophila* üzerinde yapmış oldukları çalışmada, kompleks IV'ün COX 6c altbirimini kodlayan “siklope” geninin yokluğu durumunda oluşan COX enzimi eksikliğinin letal olduğunu bildirmişlerdir (10).

Kemppainen ve ark. oluşturmuş oldukları COX6c knockdown sineklerde Cox6c RNA seviyesinin yaklaşık %80 oranında eksikliği sonucu, yavru sineklerin yaklaşık dörtte üçünün öldüğünü görmüşlerdir. Ayrıca pupadan çıkmayı başarabilen sinekler bunu ancak 3 günlük bir gecikmeyle gerçekleştirmişlerdir. COX enziminin tamamen yokluğu ise erken gelişimsel evrede letal bulunmuştur. Diğer bir deneylerinde, *Drosophila* genelinde gen ifadesi sağlayan da-GAL4 aracılı RNAi yöntemi ile COX4, COX5a ve COX6b altbirimlerinin susturulması sonucu erken larva döneminde (L1/L2) öldükleri bulunmuştur. Aynı şekilde COX7a altbiriminin CG9603 isoformunun RNAi yöntemi ve da-Gal4 yardımı ile yaygın olarak susturulması pupal dönemde letal bulunmuştur. Kas dokusunda spesifik olarak COX 5b knockdown oluşturulmuş sineklerde de pupal letalite gözlenmiştir (12).

Zordan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, COX birleşme faktörlerinden Surfl geni susturulmasının Actin5C-Gal4 aracılı yaygın ifadesini larval ve pupal dönemde letal bulunmuş. Elav-Gal4 aracılı nöron spesifik knockdown grubunda bu etki görülmemiştir (90). Kemppainen ve ark. yaptıkları çalışmada COX4, COX5b ve COX6b altbirimlerinin 5 farklı nöron spesifik GAL4 (Elav-GAL4, Nrv2-Gal4, Ok371-Gal4, DDC-Gal4 ve C161-GAL4) aracılı ekspresyonu sonucunda pupal letalite gözlemlenmemiştir (12).

Bizim bulgularımız literatürdeki nöron spesifik COX eksikliğinin pupal letalite oluşturmadığı yönündeki bilgi ile uyumlu olmakla birlikte daha önce dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarda COX7a altbiriminin eksikliğinin pupal ölüm oranlarına etkisi literatürde bulunmadığından, bu anlamdaki ilk çalışmadır.

Mitokondriler oksidatif fosforilasyonun merkezi olması yanı sıra hücre içinde reaktif oksijen türlerinin temel oluşum kaynağı olarak kabul edilmektedir. COX inhibisyonunun, *Drosophila* dahil birçok deney hayvanında serbest radikal üretimini

arttırdığı gösterilmiştir (91–93). Yüksek serbest radikal seviyeleri, apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne neden olabilir (94,95). Ömür uzunluğu ve yaşlanmanın mitokondri fonksiyonları ile ilişkisi iyi bilinmektedir (96).

Suthammarak ve ark. *Caenorhabditis elegans* türü nematodlarda COX 4 ve COX5a geni homologlarını RNAi yöntemi ile susturmuşlar ve ömür uzunluklarının anlamlı olarak kısaldığını gözlemlemişlerdir (97).

Liu ve ark. *Drosophila*'da COX6a altbirimi mutasyonunun (levy mutasyonu) ömür uzunluğuna etkisini incelemişler. 29 derece sıcaklıktaki ortamda mutant grubun ortanca yaşam süresi 8 gün kontrol grubunun ortanca yaşam süresi 28 gün olarak bulmuşlar. Aynı deneyi 21 derece sıcaklıkta da gerçekleştirmişler ve bu değerleri sırası ile 51 gün ve 100 gün olarak bulmuşlar (88).

Kemppainen ve arkadaşları COX4, COX5b ve COX6b eksikliğini sadece nöronlarda oluşturarak sineklerin ömür uzunluklarını azaldığını gözlemlemişler. 29 derece sıcaklıktaki ortamda COX 5b eksik sineklerin ortalama yaşam ömrünü 8 gün olarak bulmuşlardır (12).

Biz de gruplarımızın ömür uzunluklarını karşılaştırmak ve oluşturulan enzim eksikliklerinin yaşam süresine olan etkilerini incelemeyi amaçladık. Yaptığımız çalışmada grupların ömür uzunlukları; (ortalama, ortanca ve maksimum ömür) Kontrol [43,52,66], PKD [20,16,50], THKD [42,46,62], TRHKD [47,48,68], DDCKD [49,50,68] şeklinde bulunmuştur. Gruplar arasındaki fark log-rank testi ile değerlendirilmiş ve anlamlı fark olduğu görülmüştür.

Pan-nöronal COX enzim eksikliği oluşturulmuş PKD grubunda yaşam süresinin diğer gruplara göre anlamlı bir biçimde kısa olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Bu sonuç literatürde COX enzim eksikliğinin ömür sürelerini kısalttığı bilgisi ile uyumludur fakat COX7a altbirimi eksikliği ile oluşturulmuş COX enzim eksikliğinin etkilerinin görülmesi açısından bilimiz dahilinde literatürdeki ilk çalışmadır.

Sadece dopaminerjik nöronlarda COX enzim eksikliği oluşturulmuş THKD grubu kontrol grubuna ve PKD harici gruplara göre anlamlı derecede kısa ömür uzunluğu göstermiştir ($p<0.001$). Bu sonuç dopaminerjik nöronlarda oluşturulan COX

eksikliğinin etkilerinin pupal dönemde ve genç sineklerde görülmese de yaşa bağlı olarak ortaya çıkarak ömrü kısaltıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarında COX enzim eksikliği oluşturulmuş DDCKD grubu ile sadece serotonerjik nöronlarında COX enzim eksikliği oluşturulmuş TRHKD grubunun yaşam sürelerinde kontrol grubundan anlamlı bir farkları bulunamamıştır. Bu sonuç pan-nöronal COX eksikliğinde ömürde oluşan kısalmanın serotonerjik nöronlardan kaynaklanmadığına işaret etmektedir.

Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları insanlarda genellikle patolojik ve hatta öldürücüdür fakat şaşırtıcı bir şekilde, bazı organizmalarda mitokondriyal fonksiyon bozukluğu yaşamın uzamasına neden olabilir. ETC'nin enzimlerinin ve enzimlerin birleşmesi için gerekli yardımcı faktörlerin pek çoğunun hasarı *Caenorhabditis elegans* ömrünü uzatabilmektedir (98).

Zordan ve ark. yaptıkları deneyde Elav-GAL4 aracılı nöronal Surf1 eksikliğinde sineklerin ömür uzunluklarında kontrol gruplarına göre anlamlı derecede artma olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuç mitokondriyal fonksiyon bozukluklarının yaşam süresini kısaltabileceği gibi uzatabileceğini de düşündürmektedir.

Deneyimiz sonucunda THKD grubunda görülen etkinin DDCKD grubunda görülmemesi, serotonerjik nöronlarda oluşturulan COX eksikliğinin, sadece dopaminerjik nöronlardaki COX eksikliğine bağlı ortaya çıkan fenotipin oluşmasında engelleyici bir faktör oynuyor olabilir.

Son olarak, çalışmamızın immunfloresan görüntüleme kısmında, Gal4 sinek hatlarının istediğimiz nöron gruplarında gen ifadesini sağladığını sınamak için kullandığımız GAL4 hatları ile hücre nükleuslarında GFP ifadesi sağlayacak UAS-Stinger hatları çaprazlanmıştır. Çapraz sonucu elde edilen sineklerin beyinleri diseke edilerek anti-TH antikor ve anti- GFP antikor ile işaretlenerek sekonder antikorları yardımı ile ikili immun boyanmıştır. Tüm beyin görüntüleri konfokal mikroskopi yardımı ile kesitsel olarak elde edilmiştir. Grupların GFP boyanmış nükleusları ve Anti-TH antikoruna ile olan kolokalizasyonları manuel olarak değerlendirilmiştir.

TH>Stinger grubu TH-Gal4 aracılı dopaminerjik nöronlardaki gen ifadesini doğrular bir biçimde anti-TH antikor ile yüksek oranda kolokalizasyon göstermiştir (%91,4).

DDC>Stinger grubu DDC-Gal4 aracılı dopaminerjik ve serotonerjik nöronlardaki gen ifadesini doğrular bir biçimde anti-TH antikor ile büyük oranda kolokalizasyon göstermekle birlikte (%65,6) dopaminerjik nöronlara spesifik olmadığı için oran TH-Gal4>UAS-Stinger grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

TRH>Stinger grubu TRH-Gal4 aracılı serotonerjik nöronlardaki gen ifadesi özelliği sebebi ile anti-TH antikor ile kolokalizasyon beklenmemektedir. Bu beklentiye doğrular biçimde bu oran (%16,8) diğer gruplardan anlamlı biçimde düşük gözlenmiştir.

İkili immun boyama ve konfokal mikroskopi ile elde ettiğimiz sonuçlar kullandığımız sinek hatlarının beklediğimiz biçimde dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarda gen ifadesinin sağlandığını teyit etmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız tüm nöronlarda oluşturulan COX enzim eksikliğine bağlı oluşan hareket bozukluğunun dopaminerjik nöronlar ve serotonerjik nöronlar aracılığı ile oluşmadığını göstermiştir. Bunun yanında dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarda oluşturulan COX enzim eksikliğinin pupal dönem ölüm oranlarını etkilemediği gösterilmiştir. Nöronlarda oluşturulan COX enzim eksikliğinin ömür uzunluklarına etkilerini incelenmiş pan-nöronal enzim eksikliğinde gözlenen anlamlı kısalmanın serotonerjik nöronlardan kaynaklanmadığı gösterilmiştir. Fakat dopaminerjik nöronlardaki enzim eksikliği ileri yaşlarda kendini gösteren bir kısalmaya sebep oluyor olabilir.

Hem bir mitokondriyal hastalık modeli hem de bir nörodejenerasyon modeli olarak değerlendirilebilecek olan pan-nöronal COX eksikliğinde ortaya çıkan fenotipin altında yatan temel yolların öğrenilmesi hem temel bilim açısından hem de insanlarda görülen nörodejenerasyon ile ilerleyen hastalıklarda altta yatan bir yolağın aydınlatılması açısından önem arz etmektedir. Bizim çalışmamız bu süreçte rol sahibi olabilecek dopaminerjik nöronların bu enzim eksikliğine dirençli olabileceğini düşündürmüştür. Görülen fenotip başka nöronlar grupları üzerinden

oluşuyor olabilir. Bunu anlamak için benzeri çalışmalar ile diğer nöron gruplarının etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Pan-nöronal COX enzim eksikliğinde görülen motor bozukluğun hangi moleküler mekanizmalar ve nöronal yollar aracılığı ile oluştuğunun anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Nöronlarda oluşturulan COX enzimi eksikliğinde ortaya çıkan hareket bozukluğunun altında yatan temel nöron grubunun dopaminerjik nöronlar olup olmadığını ve bu enzim eksikliklerinin ömür uzunluğuna etkisini araştırdığımız bu çalışmada:

Araştırmamız pan-nöronal COX7a eksikliğinin hareket bozukluğu oluşturduğunu literatüre uyumlu olarak teyit etmiştir.

Dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarda oluşturulan COX enzim eksikliğinin hareket bozukluğu oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu bulgu literatüre ilk katkıdır.

Dopaminerjik ve serotonerjik nöronlarda oluşturulan COX enzim eksikliğinin pupal ölüm oranlarında artışa sebep olmadığı görülmüş, kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Pan-nöronal COX enzim eksikliği oluşturulan grup (PKD) diğer gruplara göre anlamlı şekilde kısa yaşam ömrüne sahip olduğu görülmüştür.

Sineklerin ömür uzunluklarını ölçtüğümüz deneyde TH-Gal4 aracılı dopaminerjik nöronlarında COX enzim eksikliği oluşturulmuş grup (THKD), PKD grubundan uzun, kontrol grubu ve diğer deney gruplarından anlamlı olarak daha kısa yaşamıştır.

Kullandığımız Gal4 sinek hatlarının UAS-Gal4 yöntemi ile nöron nükleuslarında GFP ifadesi sağlanmış ve anti-TH antikor ile kolokalize olma oranları değerlendirilmiş, RNA interferans yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz COX7a geni susturulmasında nöron gruplarının belirleyicisi olan Gal4 hatları bu sayede teyit edilmiştir.

Nöronlarda oluşturulan COX enzimi eksikliğinde ortaya çıkan hareket bozukluğunun altında yatan temel nöron grubu veya gruplarının aydınlatılması için başta glutamaterjik nöronlar olmak üzere diğer nöron grupları da taranmalı, bu nöronlarda gerçekleşen patofizyolojik süreçlerin anlaşılması için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fernández-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2009;1793:200–211.
2. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, Bie I De, Macmillan C vd. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 1998;20:337–343.
3. Siddiqui MF, Elwell C, Johnson MH. Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Autism Open Access* 2016;6.
4. Castora FJ. Mitochondrial function and abnormalities implicated in the pathogenesis of ASD. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2019;92:83–108.
5. Schapira AHV. The “new” mitochondrial disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:144–149.
6. Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rötig A, Rustin P, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 2002;286:53–63.
7. Rak M, Benit P, Chretien D, Bouchereau J, Schiff M, El-Khoury R vd. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin Sci* 2016;130:393–407.
8. Ng LF, Gruber J, Cheah IK, Goo CK, Cheong WF, Shui G vd. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ extends lifespan and improves healthspan of a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 2014;71:390–401.
9. Hamblet NS, Ragland B, Ali M, Conyers B, Castora FJ. Mutations in mitochondrial-encoded cytochromec oxidase subunits I, II, and III genes detected in Alzheimer’s disease using single-strand conformation polymorphism. *Electrophoresis* 2006;27:398–408.
10. Fernandez-Ayala DJM, Sanz A, Vartiainen S, Kempainen KK, Babusiak M, Mustalahti E vd. Expression of the *Ciona intestinalis* Alternative Oxidase

- (AOX) in *Drosophila* Complements Defects in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab* 2009;9:449–460.
11. Andjelković A, Oliveira MT, Cannino G, Yalgin C, Dhandapani PK, Dufour E vd. Diiron centre mutations in *Ciona intestinalis* alternative oxidase abolish enzymatic activity and prevent rescue of cytochrome oxidase deficiency in flies. *Sci Rep* 2015;5:18295.
 12. Kempainen KK, Rinne J, Sriram A, Lakanmaa M, Zeb A, Tuomela T vd. Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 2014;23:2078–2093.
 13. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 1981;91:227–255.
 14. Kingsbury BF. Cytoplasmic fixation. *Anat Rec* 1912;6:39–52.
 15. Keilin D. On Cytochrome, a Respiratory Pigment, Common to Animals, Yeast, and Higher Plants. *Proc R Soc B Biol Sci* 2006;98:312–339.
 16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. Garland Science 2002
 17. Dihanich M. The biogenesis and function of eukaryotic porins. *Experientia* 1990;46:146–153.
 18. Ylikallio E, Suomalainen A. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med* 2012;44:41–59.
 19. Chan DC. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell* 2006;125:1241–1252.
 20. Rossier MF. T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell Calcium* 2006;40:155–164.
 21. Green DR. Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin. *Cell* 1998;94:695–698.
 22. Nicholls DG. Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Rev Bioenerg* 1979;549:1–29.

23. Kumari A. Beta Oxidation of Fatty Acids. In: Kumari A, editor. *Sweet Biochemistry*. Academic Press 2018: 17–19.
24. Noji H, Yoshida M. The rotary machine in the cell, ATP synthase. *J Biol Chem* 2001;276:1665–1668.
25. Sazanov LA. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015;16:375–388.
26. Clason T, Ruiz T, Schägger H, Peng G, Zickermann V, Brandt U vd. The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J Struct Biol* 2010;169:81–88.
27. Diaz F, Kotarsky H, Vineta F, Moraes CT. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011;16:197–204.
28. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1–13.
29. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K vd. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 1996;272:1136–1144.
30. Grossman LI, Lomax MI. Nuclear genes for cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1997;1352:174–192.
31. Diaz F. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2010;1802:100–110.
32. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:870–879.
33. Niyazov DM, Kahler SG, Frye RE. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Mol Syndromol* 2016;7:122–137.
34. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW vd. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* 2008;63:35–

- 39.
35. Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 1999;52:1255–1264.
36. Loeffen JLCM, Smeitink JAM, Trijbels JMF, Janssen AJM, Triepels RH, Sengers RCA vd. Isolated complex I deficiency in children: Clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat* 2000;15:123–134.
37. Fassone E, Rahman S. Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet* 2012;49:578–590.
38. Legros F, Chatzoglou E, Frachon P, Ogier de Baulny H, Laforêt P, Jardel C vd. Functional characterization of novel mutations in the human cytochrome b gene. *Eur J Hum Genet* 2001;9:510–518.
39. Mourmans J, Wendel U, Bentlage HA, Trijbels JM, Smeitink JA, de Coo IF vd. Clinical heterogeneity in respiratory chain complex III deficiency in childhood. *J Neurol Sci* 1997;149:111–117.
40. Indrieri A, van Rahden VA, Tiranti V, Morleo M, Iaconis D, Tammaro R vd. Mutations in COX7B Cause Microphthalmia with Linear Skin Lesions, an Unconventional Mitochondrial Disease. *Am J Hum Genet* 2012;91:942–949.
41. Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M vd. A Mutation of COX6A1 Causes a Recessive Axonal or Mixed Form of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Am J Hum Genet* 2014;95:294–300.
42. Massa V, Fernandez-Vizarra E, Alshahwan S, Bakhsh E, Goffrini P, Ferrero I vd. Severe Infantile Encephalomyopathy Caused by a Mutation in COX6B1, a Nucleus-Encoded Subunit of Cytochrome C Oxidase. *Am J Hum Genet* 2008;82:1281–1289.
43. Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, Bie I De, Macmillan C vd. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 1998;20:337–343.

44. Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M vd. Mutations of SURF-1 in Leigh Disease Associated with Cytochrome c Oxidase Deficiency. *Am J Hum Genet* 1998;63:1609–1621.
45. Diaz F. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2010;1802:100–110.
46. Jaksch M, Ogilvie I, Yao J, Kortenhaus G, Bresser H-G, Gerbitz K-D vd. Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 2000;9:795–801.
47. Valnot I, Osmond S, Gigarel N, Mehaye B, Amiel J, Cormier-Daire V vd. Mutations of the SCO1 Gene in Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Deficiency with Neonatal-Onset Hepatic Failure and Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 2000;67:1104–1109.
48. Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC vd. Mutations in COX15 Produce a Defect in the Mitochondrial Heme Biosynthetic Pathway, Causing Early-Onset Fatal Hypertrophic Cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2003;72:101–114.
49. Mayr JA, Havlickova V, Zimmermann F, Magler I, Kaplanova V, Jesina P vd. Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 subunit. *Hum Mol Genet* 2010;19:3430–3439.
50. Yalçınkaya BH, Genç S, Çatak J, Özilgen M, Yılmaz B. Mitochondrial Energy Production. In: Dinçer I, editör. *Comprehensive Energy Systems*. 2018: 95–125.
51. Muller HJ. Genetic Variability, Twin Hybrids and Constant Hybrids, in a Case of Balanced Lethal Factors. *Genetics* 1918;3:422–499.
52. Muller HJ. Artificial transmutation of the gene. *Science (80-)* 1927;66:84–87.
53. Lloyd TE, Taylor JP. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1184:e1-20.
54. Stephenson R, Metcalfe N. *Drosophila melanogaster*: a fly through its history

and current use. *J R Coll Physicians Edinb* 2013;43:70–75.

55. Bellen HJ, Tong C, Tsuda H. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:514–522.
56. Nobel Prizes. <http://www.animalresearch.info/en/medical-advances/nobel-prizes/>. Erişim tarihi:16 Nisan 2019
57. *Drosophila* life cycle and fly anatomy. <https://www.cherrybiotech.com/scientific-note/drosophila-life-cycle-and-fly-anatomy>. Erişim tarihi:27 Mayıs 2019
58. Bernards A, Hariharan IK. Of flies and men — studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:274–278.
59. Nichols CD. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol Ther* 2006;112:677–700.
60. Greenspan RJ, van Swinderen B. Cognitive consonance: complex brain functions in the fruit fly and its relatives. *Trends Neurosci* 2004;27:707–711.
61. Greenspan RJ, Dierick HA. “Am not I a fly like thee?” From genes in fruit flies to behavior in humans. *Hum Mol Genet* 2004;13:R267–R273.
62. Zheng Z, Lauritzen JS, Perlman E, Robinson CG, Nichols M, Milkie D vd. A complete electron microscopy volume of the brain of adult *Drosophila melanogaster*. *Cell* 2018;174:730-743.e22.
63. Friggi-Grelin F, Coulom H, Meller M, Gomez D, Hirsh J, Birman S. Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *J Neurobiol* 2003;54:618–627.
64. Yamamoto S, Seto ES. Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: an overview of genes, drugs and behavioral paradigms. *Exp Anim* 2014;63:107–119.
65. Riemensperger T, Isabel G, Coulom H, Neuser K, Seugnet L, Kume K vd.

- Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:834–839.
66. Pendleton RG, Rasheed A, Sardina T, Tully T, Hillman R. Effects of tyrosine hydroxylase mutants on locomotor activity in *Drosophila*: A study in functional genomics. *Behav Genet* 2002;32:89–94.
 67. Draper I, Kurshan PT, McBride E, Jackson FR, Kopin AS. Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: An anatomic and functional analysis. *Dev Neurobiol* 2007;67:378–393.
 68. Kong EC, Woo K, Li H, Lebestky T, Mayer N, Sniffen MR vd. A pair of dopamine neurons target the D1-like dopamine receptor dopr in the central complex to promote ethanol-stimulated locomotion in *Drosophila*. *PLoS One* 2010;5:e9954.
 69. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J vd. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet* 2014;23:5866–5878.
 70. Spradling AC, Rubin GM. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science (80-)* 1982;218:341–347.
 71. Rubin GM, Spradling AC. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science (80-)* 1982;218:348–353.
 72. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 1993;118:401–415.
 73. Sonnenfeld MJ. GAL4/UAS Expression System. In: *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2009: 1662–1666.
 74. Jahn TR, Malzer E, Roote J, Vishnivetskaya A, Imarisio S, Giannakou M vd. Modeling Serpin Conformational Diseases in *Drosophila melanogaster*. *Methods Enzymol* 2011;499:227–258.
 75. Farrell RE. RNAi: Take a RISC – Role the Dicer. In: Farrell RE, editör. *RNA*

Methodologies. Academic Press 2010: 539–560.

76. Feng Y, Ueda A, Wu CF. A modified minimal hemolymph-like solution, HL3.1, for physiological recordings at the neuromuscular junctions of normal and mutant *Drosophila* larvae. *J Neurogenet* 2004;18:377–402.
77. Roote J, Prokop A. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. *G3 (Bethesda)* 2017;3:353–358.
78. Pete Geiger. An introduction to fruit flies. <http://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>. Erişim tarihi:12 Mayıs 2019
79. Bartholomew NR, Burdett JM, VandenBrooks JM, Quinlan MC, Call GB. Impaired climbing and flight behaviour in *Drosophila melanogaster* following carbon dioxide anaesthesia. *Sci Rep* 2015;5:15298.
80. Gargano JW, Martin I, Bhandari P, Grotewiel MS. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 2005;40:386–395.
81. Nichols CD, Becnel J, Pandey UB. Methods to Assay *Drosophila* Behavior. *JoVE* 2012;61:3795.
82. Torres D, Muñoz S, Romero D, Álvarez M. Construction of an NLaz:Gal4 driver for controlled gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Rev Clínica* 2011;4:45–47.
83. Khan NA, Govindaraj P, Meena AK, Thangaraj K. Mitochondrial disorders: challenges in diagnosis & treatment. *Indian J Med Res* 2015;141:13–26.
84. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *Am J Hum Genet* 2008;83:254–260.
85. Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet* 2012;379:1825–1834.
86. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of

- mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 1962;41:1776–1804.
87. Foriel S, Willems P, Smeitink J, Schenck A, Beyrath J. Mitochondrial diseases: *Drosophila melanogaster* as a model to evaluate potential therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;63:60–65.
 88. Liu W, Gnanasambandam R, Benjamin J, Kaur G, Getman PB, Siegel AJ vd. Mutations in cytochrome c oxidase subunit VIa cause neurodegeneration and motor dysfunction in *Drosophila*. *Genetics* 2007;176:937–946.
 89. Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:942–946.
 90. Zordan MA, Cisotto P, Benna C, Agostino A, Rizzo G, Piccin A vd. Post-transcriptional silencing and functional characterization of the *Drosophila melanogaster* homolog of human Surf1. *Genetics* 2006;172:229–241.
 91. Ferguson M, Mockett RJ, Shen Y, Orr WC, Sohal RS. Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* 2005;390:501–511.
 92. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT. Intracellular Signaling by Reactive Oxygen Species during Hypoxia in Cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998;273:11619–11624.
 93. Smith TS, Bennett JP. Mitochondrial toxins in models of neurodegenerative diseases. I: In vivo brain hydroxyl radical production during systemic MPTP treatment or following microdialysis infusion of methylpyridinium or azide ions. *Brain Res* 1997;765:183–188.
 94. Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* 2003;9:196–205.
 95. Beal MF. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2000;23:298–304.
 96. Sun N, Youle RJ, Finkel T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell*

2016;61:654.

97. Suthammarak W, Yang Y-Y, Morgan PG, Sedensky MM. Complex I function is defective in complex IV-deficient *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2009;284:6425–6435.
98. Munkácsy E, Rea SL. The paradox of mitochondrial dysfunction and extended longevity. *Exp Gerontol* 2014;56:221–233.