



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**NÖRONAL TAFAZZİN SİLİNİMİŞ FARELERDE BEYİN
KARDİYOLİPİNOM DEĞİŞİKLİKLERİNİN VE BUNUN
TRAVMATİK BEYİN HASARINA KATKISININ İNCELENMESİ**

Aybike KORKMAZ

**DİSİPLİNLERARASI SINIR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Aysun UZ**

**ANKARA
2024**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NÖRONAL TAFAZZİN SİLİNİMİŞ FARELERDE BEYİN
KARDİYOLİPİNOM DEĞİŞİKLİKLERİNİN VE BUNUN
TRAVMATİK BEYİN HASARINA KATKISININ İNCELENMESİ**

Aybike KORKMAZ

**DİSİPLİNLERARASI SINIR BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof.Dr. Aysun UZ

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Hülya Bayır

**Bu araştırma Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün
NS076511, NS061817 ve NS117000 projeleri ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Nöronal Tafazzin Silinmiş Farelerde Beyin Kardiyolipinom Değişikliklerinin ve Bunun Travmatik Beyin Hasarına Katkısının İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Aybike Korkmaz

Tarih: 20.11.2024

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Sinir Bilimleri Anabilim Dalında

Aybike Korkmaz tarafından hazırlanan

“Nöronal Tafazzın Silinmiş Farelerde Beyin Kardiyolipinom Değişikliklerinin ve Bunun Travmatik
Beyin Hasarına Katkısının İncelenmesi” adlı
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 9 Ocak 2025

İmza

Prof. Dr. Aysun UZ
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Deniz BİLLUR
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza

Prof. Dr. Eyüp Sabri AKARSU
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Pergin ATİLLA
Hacettepe Üniversitesi
Üye

İmza

Prof. Dr. Dilara ZEYBEK
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Nöronal Tafazzin Silinmiş Farelerde Beyin Kardiyolipinom Değişikliklerinin ve Bunun Travmatik Beyin Hasarına Katkısının İncelenmesi

Mitokondriye özgü bir fosfolipid olan kardiyolipin (CL), mitokondrinin enerji üretimi ve metabolik işlevlerinin düzenlenmesi için hayati önem taşır. Beyin kardiyolipinomu, onu diğer dokulardan ayıran, bol miktarda çoklu doymamış yağ asidi zincirleri ile karakterize, benzersiz derecede çeşitli bir kompozisyon sergiler. Ancak, bu çeşitliliğin nasıl sağlandığı ve beyin fonksiyonlarındaki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Tafazzin (TAZ), monolizo-kardiyolipinlerden (MLCL) olgun CL sentezini sağlayan bir yağ asidi transferazdır. TAZ mutasyonlarıyla karakterize Barth Sendromu hastalığı olan bireylerin nörolojik semptomlar gösterdiği bilinmekle birlikte, nöronal TAZ eksikliğinin beyin kardiyolipinomu ve fonksiyonları üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca, CL'in, travmatik beyin hasarı (TBH) sonrası sitokrom c'nin peroksidaz aktivitesini artırarak apoptotik sinyal mekanizmalarına katıldığı ve inflamasyon süreçlerinde önemli bir hedef olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde, MLCL'nin de sitokrom c ile kompleks oluşturup peroksidaz aktivitesine yol açtığı gösterilmiştir. Ancak, nöronal tafazzin eksikliğinin, nöronal kardiyolipinomdaki değişiklikler yoluyla TBH'deki nöroinflamatuvar süreçlere nasıl katkıda bulunduğu bilinmemektedir.

Tafazzin aracılığıyla gerçekleşen nöronal CL yeniden şekillenmesinin, beyin CL çeşitliliğinin oluşmasında önemli bir rol oynadığını ve bu süreçteki değişikliklerin bilişsel işlev bozukluklarına ve beyin hasarına karşı artan duyarlılığa katkıda bulunduğunu varsaydık. Bu hipotezi test etmek amacıyla, CamKIIa ve Cre-Lox sistemini kullanarak bir nöronal TAZ (nTAZ) Knock-Out (KO) fare modeli geliştirdik. LC/MS analizleri, mitokondriyal respirasyon ve kognitif-davranışsal testlerle nöronal kardiyolipinom ve bunun yarattığı fonksiyonel değişiklikler gözlemlenmesi amaçladık. Ayrıca, Kontrollü Kortikal Hasar (KKH) modeli uygulanarak TBH sonrası kardiyolipinom değişiklikleri, apoptotik aktivite, lezyon hacmi ve davranışsal süreçler incelendi.

Çalışmamızda, nTAZ-KO farelerde kortekste PUFA-CL seviyelerinde azalma, sosyal etkileşimde bozulma ve uzaysal hafızada belirgin bir zayıflama tespit edildi. Bununla birlikte, nTAZ eksikliği olan farelerde KKH sonrası MLCL ve okside CL seviyelerinin ve apoptotik aktivitede artış gözlemlendi. Bu farelerin, kontrol gruplarına kıyasla daha büyük lezyon hacimlerine ve azalmış öz bakım skorlarına sahip olduğu bulundu. Bu çalışma, nöronal TAZ'ın beyindeki CL çeşitliliği, düşük MLCL seviyeleri ile kognitif ve davranışsal işlevlerin korumasındaki rolünü ortaya koymaktadır. Ayrıca, TAZ eksikliğinin TBH sonrası patolojik süreçler üzerindeki olumsuz etkilerini göstermesi açısından literatürde bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: Barth sendromu, Kardiyolipin çeşitliliği, Kontrollü kortikal hasar, PUFA

SUMMARY

Examination of Changes in Brain Cardiolipin and Its Contribution to Traumatic Brain Injury in Neuronal Tafazzin Deleted Mice

Cardiolipin (CL), a mitochondria-specific phospholipid, is essential for the regulation and maintenance of mitochondrial energy production and metabolic functions. In the brain, CL exhibits a uniquely diverse composition, characterized by an abundance of polyunsaturated fatty acid chains, distinguishing it from other tissues. However, the mechanisms causing this diversity and its effect in brain function remain unclear. Tafazzin (TAZ), an acyltransferase, facilitates the synthesis of mature CL from monolysocardiolipins (MLCL) and remodels CL fatty acid composition. While individuals with Barth Syndrome, a disease caused by TAZ mutations, are known to exhibit neurological symptoms, the effects of neuronal TAZ deficiency on brain cardiolipin and functions have not been fully elucidated. Furthermore, CL is known to participate in apoptotic signaling by enhancing cytochrome c peroxidase activity following traumatic brain injury (TBI), making it a critical target in inflammation. Similarly, MLCL has been shown to form complexes with cytochrome c, conferring peroxidase activity. However, the contribution of neuronal TAZ deficiency, and the resulting alterations in neuronal cardiolipin, to TBI-induced neuroinflammatory processes has not yet been investigated.

We hypothesize that neuronal CL remodeling mediated by TAZ plays a key role in establishing brain CL diversity and that alterations in this process contribute to cognitive dysfunction and increased vulnerability to brain injury. To test this hypothesis, we developed a neuronal TAZ (nTAZ) Knock-Out (KO) mouse model using the CamKII α and Cre-Lox system. This model was employed to investigate neuronal cardiolipin and its functional implications through LC/MS analysis, mitochondrial respiration assessments, and cognitive-behavioral testing. Additionally, the Controlled Cortical Injury (CCI) model was applied to evaluate TBI-induced changes in cardiolipin, apoptotic activity, lesion volume, and behavioral processes.

In nTAZ-KO mice, reductions in cortical PUFA-CL levels, impaired social interaction, and significant spatial memory deficits were observed. Furthermore, post-CCI analysis revealed elevated MLCL and oxidized CL levels, alongside increased apoptotic activity, in nTAZ-deficient mice. These mice also exhibited larger lesion volumes and reduced self-care scores compared to controls. This study highlights the critical role of neuronal TAZ in maintaining brain CL diversity and low MLCL levels, as well as its importance in cognitive and behavioral functions. Additionally, it provides the first evidence of the adverse effects of TAZ deficiency on pathological processes following TBI, establishing a novel contribution to the literature.

Key Words: Barth syndrome, Cardiolipin diversity, Controlled Cortical Impact, PUFA

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xii

1.GİRİŞ

1.1. Kardiyolipin	1
1.2. Tafazzin	4
1.3. Mitokondriyal Süreçlerde Kardiyolipinin Rolü	5
1.3.1. Mitokondriyal Morfoloji ve Metabolizma	5
1.3.2. Apoptozis ve Kardiyolipinin Oksidasyonu	6
1.4. Kardiyolipinlerde Asil Zincir Kompozisyonunun Önemi	7
1.5. Beyinde Kardiyolipin Dağılımı	8
1.6. Kardiyolipin ve Barth Sendromu	9
1.7. Kardiyolipin ve Travmatik Beyin Hasarı	11
1.8. Tafazzin Eksikliğinin Hayvanlarda Fenotipe Yansıması	12

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hayvanlar	14
2.2. Nöronal Tafazzin Knock-Out Farelerin Geliştirilmesi	14
2.3. Deney Protokolü	15
2.4. Kontrollü Kortikal Hasar Modeli	17
2.5. Örnek Toplama	17
2.6. Lipid Ekstraksiyonu ve Kütle Spektrometrisi Analizi	18
2.7. Lipid Türlerinin Tanımlanması ve Miktarının Belirlenmesi	19
2.8. Mitokondriyal Respirasyonun Değerlendirilmesi	20
2.9. Davranış Testleri	20
2.9.1. Nesting Yuva Yapma Testi	20
2.9.2. Sosyal Etkileşim Testi	21
2.9.3. Morris Su Labirenti Testi	21
2.9.4. Yeni Obje Tanıma Testi	21
2.9.5. Beam Denge Testi	21
2.10. Kaspaz 3/7 Ölçümü	22
2.11. Lezyon Büyüklüğünün Ölçülmesi	22
2.12. İstatistiksel Analiz	

3. BULGULAR

3.1. Beyinde Nöronal Tafazzin Eksikliğinde Gözlenen Fosfolipidom Değişikliklerinin İncelenmesi	24
3.1.1. Kardiyolipinomun Değerlendirilmesi	24
3.1.2. CL Dışındaki Diğer Gliserofosfolipit Çeşitlerinin Değerlendirilmesi	29
3.1.3. Mitokondriyal Respirasyonun ve Apoptozisin Değerlendirilmesi	32
3.1.4. Farelerde Davranışsal ve Kognitif Sürecin Değerlendirilmesi	32
3.2. Nöronal Tafazzin Eksikliğinin Travmatik Beyin Hasarı Sonrasındaki Sürece Etkisinin İncelenmesi	36
3.2.1. Kardiyolipinomun Değerlendirilmesi	36
3.2.2. MLCL ve Perokside CL Türlerinin Değerlendirilmesi	39

3.2.3. Apoptozis ve Lezyon Haciminin Değerlendirilmesi	41
3.2.4. Hayvanlarda Kognitif Sürecin Değerlendirilmesi	41
4. TARTIŞMA	45
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	62



ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Disiplinlerarası Sinir Bilim Doktora Programı'ndaki eğitimim boyunca benden emeğini ve sevgisini esirgemeyen, bilgisi ve tecrübeleriyle iyi bir bilim insanı olmamı destekleyen, güçlü duruşu ile örnek aldığım çok sevgili hocam, tez danışmanım, sayın Prof. Dr. Aysun UZ'a,

Bana uçmayı, bilimsel düşünmeyi ve çok yönlü olmayı öğreten, benden kıymetli vaktini ve sevgisini esirgemeyen, emeğini ödeyemeyeceğim, canım öğretmenim, tez eş danışmanım, idolüm sayın Prof. Dr. Hülya BAYIR'a,

Bana hayatta ve bilimde sorgulayıcılığı öğreten, yeni bakış açıları kazandıran, desteğini esirgemeyen, pamuk kalbi ve eşsiz beyni ile redoks dünyasının efendisi, sayın hocam Prof. Dr. Valerian Kagan'a,

Başta tezim olmak üzere, doktora eğitimim boyunca her daim yanımda olup tecrübelerini ve kıymetli zamanını esirgemeyen, bana koşmayı ve ne zaman yavaşlayacağımı öğreten, kendisinin öğrencisi olmaktan onur duyduğum sayın Prof. Dr. Eyüp AKARSU'ya,

Tez dönemim boyunca destek ve bilgisini esirgemeyen, kendisiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum sayın Prof. Dr. Deniz BİLLUR'a,

Eğitim hayatımda beni ilk kez ayağa kaldıran, en ihtiyacım olduğu anlarda elini omzumda hissettiğim, tecrübesiyle ve kalbiyle hep aydınlığı gösteren, bir tanecik hocam sayın Prof. Dr. Saadet ARSAN'a,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan, çalışma ahlakı ve disiplini adına çok şey öğreten, benden emeklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi'ndeki tüm öğretim üyelerimize,

Pittsburgh Üniversitesi ve Columbia Üniversitesi'nde çalıştığım süre boyunca emek, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen, bu teze ve bilimsel anlamda gelişmeme katkı sağlayan sayın hocalarım Prof.Dr. Patrick Kochanek, Prof. Dr. Robert Clark, Doç. Dr. Dennis Simon ile arkadaşlarım Dr. Tuana Demir, Dr. Sviatlana Samovich, Dr. L.J. Sparvero, Dr. Elizabeth Castellano, Yuan Gao, Carla Jean Johnson, Julie Scott ve tüm üniversite personeline,

Gerek doktora eğitimim boyunca gerek yurtdışı araştırma sürecimde hep yanımda olup sevinçlerime ortak ve üzüntülerime destek olan, çocuk ruhlu arkadaşlarım Uzm.Dr. Bilge Nur Kılınç ve Dr. Elif Yüksel'e, serseri yürekli uzman doktorlarım Gizem Olgun, Eda Süzen, Tutku Parlar, Özge Güzelmansur, İlkyaz Zeybek Türktan, Öznur Ege Akdi, Adil Güzel, Burak Emekli'ye, balım Uzm.Dr. Fadime Gökçe Oğuz Özhan'a,

En yakın arkadaşlarım, destekçilerim, sabır taşlarım, şanslarım, hayallerimin başlangıçları kartal babam Necdet Korkmaz ve sultan annem Tangül Korkmaz'a,

Yüreği benimle atan, çocuk ruhlu ablam Esra Boztepe ve prenses yeğenim Zeynep Boztepe'ye,

Küçük kardeşim, gururum, neşem Gökberk Korkmaz'a sonsuz teşekkür ederim.

Uzm. Dr. Aybike KORKMAZ

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA:	Araşidonik asit
ANT:	ADP/ATP taşıyıcısı
BHTS:	Barth Sendromu
BMP:	Bis(monoasilglisero)fosfat
CAC:	Karnitin/asilkarnitin translokaz
CaMKIIa:	Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II alfa
CDP-DAG:	Sitidin difosfat-diasilgliserol
CL:	Kardiyolipin
CL4:	Tetra linoleil kardiyolipin
CLOx:	Okside olmuş kardiyolipin
CLS:	Kardiyolipin sentetaz
Cre-Car / Cre:	Cre rekombinaz taşıyıcısı
DHA:	Dokosaheksaenoik asit
FFA:	Serbest yağ asidi
FFAox:	Okside olmuş serbest yağ asitler
IMM:	İnternal mitokondriyal membran
iPLA2:	Kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2
KD:	Knock-down
KO:	Knock-out
LA:	Linoleik asit
LPA:	Layzo-Fosfatidik asit
LPC:	Layzo-Fosfatidil kolin
LPE:	Layzo-Fosfatidil etanolamin
LPG:	Layzo-Fosfatidil gliserol
LPI:	Layzo-Fosfatidil inositol
LPS:	Layzo-Fosfatidil serin

MLCL:	Monolayzokardiyolipin
nKO:	Nöron spesifik knock-out
ns:	istatistiksel olarak anlamlı olmayan
nTAZ-KO:	Nöronal Tafazzin- knock out
OMM:	Eksternal mitokondriyal membrane
OPLS-DA:	Ortogonal kısmi en küçük kareler diskriminant analizi
OXPHOS:	Oksidatif fosforilasyon
PA:	Fosfatidik asit
PC:	Fosfatidil kolin
pCL:	Prematür kardiyolipin
PCp:	Fosfatidil kolin plasmalojen
PE:	Fosfatidil etanolamin
PEp:	Fosfatidil etanolamin plasmalojen
PG:	Fosfatidil gliserol
PGP:	Fosfatidilgliserol fosfat
PGS:	Fosfatidilgliserol sentaz
PI:	Fosfatidil inositol
PS:	Fosfatidil serin
PTPMT1:	Protein tirozin fosfataz, mitokondriyal 1
PUFA:	Çok zincirli doymamış yağ aside
ROS:	Reaktif oksijen radikalleri
SFA:	Doymuş yağ asidi
TAMM41:	Translokator kurulumu and idamesi
TAZ:	Tafazzin
UFA:	Tek zincirli doymamış yağ asidi
VIP:	Değişken Önem Noktası
WT:	Wild tip fare, normal C57B6J faresi

α TFP:

Trifonksiyonel proteinin alfa subuniti



ŞEKİLLER

Şekil 1a. Kardiyolipin Yapı ve Alt Grupları	2
Şekil 1b. Kardiyolipin Sentezi ve Yeniden Yapılanması	3
Şekil 2. Nöron spesifik Tafazzin Knock Out farelerin geliştirilmesi.	15
Şekil 3. Naiv hayvan gruplarında kardiyolipin miktarı.	25
Şekil 4. Naiv hayvan gruplarında kardiyolipin türleri ve ve temsili CL'lerin MS2'daki fragmentasyonları	28
Şekil 5. Naiv hayvan gruplarında tüm fosfolipitlerin OPLS-DA analizi-VIP _{pred} değerlerinin gösterilmesi	29
Şekil 6. Naiv hayvan gruplarında matür kardiyolipin dışındaki MLCL ile diğer fosfolipitlerin miktarı ve karşılaştırılması.	30
Şekil 7. Naiv hayvan gruplarında fosfolipit türlerine ait bazı üyelerin miktarı ve karşılaştırılması.	31
Şekil 8. Naiv hayvanların serebral korteksinde mitokondriyal respirasyonun ve apoptozisin ölçümü.	32
Şekil 9. Kognitif çalışmalarının şematik gösterimi ile Nesting ve Beam denge testinin değerlendirilmesi.	33
Şekil 10. Sosyal etkileşim testinin naiv hayvanlarda değerlendirilmesi.	34
Şekil 11. Morris su labirenti testinin naiv hayvanlarda değerlendirilmesi.	35
Şekil 12. Novel obje tanıma testinin naiv hayvanlarda değerlendirilmesi.	36
Şekil 13. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvan gruplarında kardiyolipin miktarı.	37
Şekil 14. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda bazı kardiyolipin türlerinin MS2'deki miktarı.	38
Şekil 15. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvan gruplarında MLCL ile peroksida CL'lerin karşılaştırılması.	39
Şekil 16. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvan gruplarında serbest yağ asidi ve okside yağ asitlerinin karşılaştırılması.	40

Şekil 17. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda apoptozisin ve lezyon hacminin değerlendirilmesi.	41
Şekil 18. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda beam denge testinin değerlendirilmesi.	42
Şekil 19. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda Morris su labirenti testinin değerlendirilmesi.	43
Şekil 20. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda yeni obje tanıma ve nesting testlerinin değerlendirilmesi.	44



GİRİŞ

Tafazzin (TAZ), kardiyolipin (CL) olgunlaşma sürecinde rol oynayan transaçilaz aktivitesine sahip önemli bir enzimdir. Mitokondriyon iç membranında bulunan CL, bu organelin biyoenerji üretiminde ve metabolik fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli bir fosfolipittir. Hücre ve dokular arasında farklı dağılımlar gösteren kardiyolipin, beyinde, özellikle de nöronlarda, en yüksek çeşitliliği sergilemektedir. Bu çeşitliliğin beyinde nasıl sağlandığı ve beyin fonksiyonundaki önemi ise henüz tam olarak bilinmemektedir. TAZ eksikliği, Barth sendromlu hastalarda bilişsel ve davranışsal semptomların ortaya çıkmasına yol açmaktadır; ancak mitokondriyondan zengin olan nöronlardaki TAZ eksikliğinin beyin kardiyolipinomu ile beyin fonksiyonları üzerindeki etkileri bilinmemektedir.

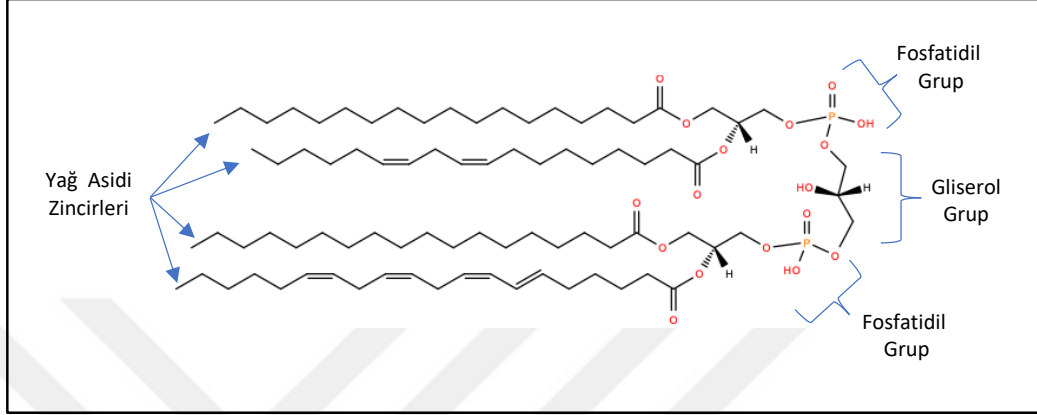
Kardiyolipinlerin işlevleri, mitokondriyon iç zarının dinamik yapısı ve bileşenleriyle yakından ilişkilidir. Beyindeki kardiyolipinler, bol miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içerir ve mitokondriyon iç zarında, elektron transport zincirine yakın bir konumda bulunur. Bu moleküllerin okside formlarının ise apoptoz sürecinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. Kardiyolipin ve monolizo-kardiyolipinler, sitokrom c (cyt c) ile kompleks oluşturarak bu proteine peroksidaz özelliği kazandırır. Bu kompleks, kardiyolipinleri okside eder ve sonucunda cyt c, kompleksten ayrılarak hücre yüzeyine salınarak apoptozun tetiklenmesine yol açar. Yapılan çalışmalarda, kemiricilerin beyinde kontrollü kortikal hasar (KKH) sonrası akut dönemde kardiyolipin düzeylerinde azalma, buna karşın monolizo-kardiyolipin düzeylerinde ve TAZ protein miktarında artış gözlemlenmiştir. Ancak, nöronal TAZ'ın travmatik beyin hasarı (TBH) sonrası beyin kardiyolipinom üzerindeki etkileri ve bu sürecin patolojik süreçlere katkısı tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu çalışmada, nörona spesifik TAZ'ı silinmiş farelerin geliştirilmesi sonrası, naiv fareler ile in vivo TBH modeli ile KKH geliştirilen farelerden elde edilen beyin örneklerinin lipidomik analizinin yapılmış ve mitokondriyal respirasyon ile apoptotik aktivite incelenmiştir. Elde edilen bulgular, bu mutant hayvanlarda gözlemlenen bilişsel ve davranışsal değişimlerle birlikte değerlendirilmiştir.

1. Kardiyolipin

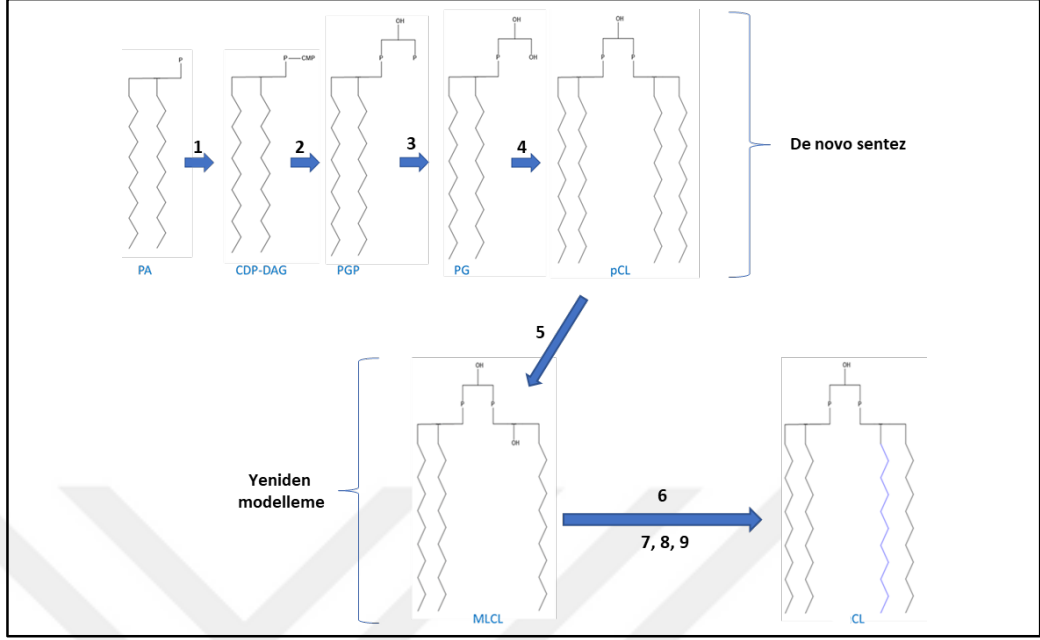
Kardiyolipin, mitokondriyona özel bir fosfolipittir (Van Meer vd., 2018). CL'ler, bir gliserol baş grubuna iki fosfatidil gruba bağlı dört açıl zincirinden oluşan dimerik bir yapıya sahiptir (Şekil 1a), bu da onu iki açıl zincire sahip tipik fosfolipitlerden ayırır. CL'lerdeki dört açıl zincir, farklı kombinasyonlarla çok çeşitli CL izomerleri oluşturabilir ve bu yağ asidi kombinasyonu dokuya spesifiktir (Oemer, G. vd., 2020). Örneğin, beyindeki CL esas olarak çeşitli doymamış yağ asidi kombinasyonlarına sahip CL türlerinden oluşurken, kolondaki

CL'ler çoğunlukla kısa zincirli doymuş yağ asitlerini içerirler. Kalpteki CL havuzu ise çoğunlukla doymamış yağ asidi olan linoleoik asitten 4 tane içeren tek tip CL'den oluşur (Oemer vd., 2020).



Şekil 1a. Kardiyolipin yapı ve alt grupları (LipidMaps Online Tool, 2007)

Memelilerde CL biyosentezi, sitidin difosfat-diaçilgliserol (CDP-DAG) üreten “Translokator kurulumu ve idamesi” (TAM41) tarafından katalize edilen bir reaksiyonla, sitidin trifosfat ile birleşen fosfatidik asit (PA) ile başlar. Daha sonra CDP-DAG, gliserol fosfatla birleşerek fosfatidilgliserol fosfat (PGP) oluşur. PGP daha sonra fosfatidilgliserole (PG) fosforile edilir. Son olarak PG, CL sentaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonda immatür CL oluşturmak üzere ikinci bir CDP-DAG molekülü ile reaksiyona girer (Lu vd., 2006., Falabella vd., 2021). Prematür CL'ler (pCL) daha sonra yeniden modelleme adı verilen bir süreçte bir dizi değişikliğe uğrar. Yeniden modellemede, pCL'in açıl kısımları, iPLA2, iPLA2 γ , iPLA2-VIA gibi çeşitli fosfolipaz enzimleri yoluyla hidrolize uğrayarak MLCL'ye dönüşür ve MLCL daha sonra olgun CL oluşturmak üzere açıl transferaz yoluyla yeniden açillenir (Schlame, M. ve B. Rustow, 1990, Hsu, vd., 2013, Yoda, vd., 2010. Malhotra, vd., 2009. Mancuso, vd., 2007; Ahmadpour vd., 2020) (Şekil 1b).



Şekil 1b. Kardiyolipin sentezi ve yeniden yapılanması. Enzimler rakamlar ile ifade edilmiştir. 1: TAMM41, 2: PGS1, 3: PTPMT1, 4: CLS, 5: iPLA₂, 6: TAZ, 7: MLCLAT1, 8: ALCAT1, 9: αTFP.

Yeniden açılma sürecinde 4 adet transaçilaz enzimi yer almaktadır ve bu enzimler arasındaki en önemli fark kullandıkları substratlardır. Bu enzimlerden üçü, monolizokardiyolipin açiltransferaz 1 (MLCLAT1) (Taylor vd., 2003), açil-CoA: lizokardiyolipin açiltransferaz 1 (ALCAT1) (Cao vd., 2004) ve trifonksiyonel proteinin alfa subunitidir (αTFP) (Taylor vd., 2012) ve açil-KoA'yı substrat olarak kullanarak remodelleme yapmaktadırlar. Bazı kaynaklar αTFP'yi, yapısal benzerliği nedeniyle MLCLAT1'in alt birimine benzemesi nedeniyle ayrı bir enzim olarak saymamışlardır. Dördüncü transaçilaz enzimi olan tafazzin ise, olgun bir CL oluşturmak için bir fosfatidilkolin (PC) ve/veya fosfatidiletanolamin (PE) açil zincirini MLCL'ye aktarır (Ahmadpour vd., 2020). Tafazzinin transaçilasyon işleminde substrat özgüllüğü bir tartışma konusu olmaya devam etmektedir: bazı çalışmalar tafazzinin linoleik asit gibi belirli yağ asitlerine karşı seçici olabileceğini öne sürerken, diğerleri tafazzinin özgüllüğünün mitokondriyal membranların fiziksel özelliklerine bağlı olduğunu öne sürmektedir (Schlame vd., 2008, Abe vd., 2016, Schlame vd., 2017).

CL'nin yeniden yapılanması, CL'lerin biyolojik fonksiyonlarını yerine getiren matür formlarının oluşmasını sağlamaktadır. Memelilerde CL, mitokondriyal fosfolipit içeriğinin ~%20'sini oluşturur (Colbeau vd., 1971) ve mitokondriyal proteinlerle etkileşimde olup onların stabilizasyonunu ve fonksiyonel regülasyonunu sağlar. Bu nedenle mitokondriyal morfoloji, mitokondriyal füzyon ve fisyon, mitofaji, immünolojik yanıt, apoptozis, ATP

üretimi ve mitokondriyona substrat taşınımında önemli bir rol oynamaktadır. CL biyosentezi ve yeniden yapılanmadaki düzensizlik, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna ve kanser, nörodejeneratif hastalık, kardiyovasküler hastalık, diyabet ve obezite gibi çeşitli patofizyolojik durumlara yol açabilmektedir (Shi Y., 2010; Ahmadpour vd, 2020; Falabella vd., 2021).

Tafazzin, X kromozomunun q kolunda yer alan tafazzin geninden transkripte edilen bir proteindir (Bione vd., 1996). Tafazzinin memeli hücrelerindeki yarı ömrü diğer birçok mitokondriyal proteine göre kısa olup yalnızca 3-6 saat sürmektedir (Xu vd, 2015). Hızlı bir döngüsü olmasına rağmen, TAZ, CL'in yeniden şekillenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu etkisi sayesinde tafazzin, iç membranın eğriliği, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS), süper kompleks oluşumu, oksidatif strese bağlı hasarın onarımı, apoptoz, fisyon ve füzyon dahil olmak üzere mitokondriyonun yapısal veya fonksiyonel birçok yönünü etkiler (Haines ve Dencher, 2002; Schug ve Gottlieb, 2009; Baile vd., 2014; Vernon vd., 2014; Frohman, 2015).

2. Tafazzin

TAZ, monolizokardiyolipini (MLCL), fosfatidilkolin (PC) ve fosfatidiletanolamin (PE) gibi fosfolipitlerden açıl grup transferi yaparak fonksiyonel CL'lerin olgunlaşmasını sağlar (Xu vd., 2006; Schlame, 2013). Özellikle kalp gibi dokularda, linoleik asidi MLCL'ye aktararak olgun CL oluşturma konusunda seçicilik gösterir (Schlame vd., 2017). Bu süreç, kalpteki kardiyolipini, tetralinoleoil kısımlarının baskın olduğu olgun bir bileşiğe dönüştürerek iç mitokondriyal membranda (IMM) tetralinoleoil-kardiyolipini (CL4) zenginleştirir (Houtkooper vd., 2009b).

Ancak, bu özgülüğün linoleik asite mi yoksa diğer çoklu doymamış yağ asitlerine mi ait olduğu hala netleşmemiştir. Schlame ve arkadaşları, tafazzinin herhangi bir açıl özgülüğünü destekleyen bir kinetik özelliğe sahip olmadığını öne sürmektedir (Schlame vd., 2012; Epanand vd., 2015). Öte yandan, bazı çalışmalar tafazzinin PC'yi ana substrat olarak tercih ettiğini öne sürmektedir (Xu vd., 2006, Abe vd., 2016). Abe ve arkadaşları, tafazzinin PC'den MLCL'ye reaksiyonunda açıl özgülüğü sergilediğini ve fonksiyonunun, PC'nin sn-2 pozisyonunda bulunan doymamış açıl PC'nin MLCL'ye transaçilasyonuna odaklandığını öne sürmektedir (Abe vd., 2016). Ancak tafazzinin enzimatik işlevselliğini ve özgülüğünü tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

3. Mitokondriyal Süreçlerde Kardiyolipinin Rolü

3.1. Mitokondriyal Morfoloji ve Metabolizma

Kardiyolipin, konik şekil olarak da adlandırılan ters kama şekliyle karakterize edilen bir moleküler yapıya sahiptir. Bu konfigürasyonda, kardiyolipinin anyonik başı, dört açıl zincirinin enine alanına kıyasla daha küçük bir enine alana sahiptir (Gasanoﬀ vd., 2021). Kardiyolipinin bu ayırt edici konik şekli, mitokondriyal kristaların kavisli membran bölgelerinde lokalize olarak mitokondriyon yapısının şekillenmesinde çok önemli bir rol oynar. CL ayrıca mitokondriyal temas bölgesinin Mic10 alt birimini ve mitokondriyal morfolojinin birincil düzenleyicisi olan krista düzenleme sistemini (MICOS) de regüle eder (Rampelt vd., 2018). MICOS, iç zarı stabilize eder ve respirozomları düzenleyerek onu enerji açısından verimli bir yapıya dönüştürür (Friedman vd., 2015). Dolayısıyla, kardiyolipinin membran bükülmesinde ve mitokondriyal solunumda (OXPHOS) kritik rolünün olabileceği anlaşılmaktadır. Olgun kardiyolipin biyosentezinin bozulması, krista morfolojisindeki değişikliklerle bağlantılı olup, mitokondriyonun genel şeklini ve mitokondriyal proteinlerin lateral organizasyonunu etkilemektedir (Cole vd., 2018; Kasahara vd., 2020).

Mitokondriyon, hücresel metabolizmada çok önemli bir rol oynar ve sitrik asit döngüsü, yağ asidi oksidasyonu, amino asit sentezi ve oksidasyonunun yanı sıra demir-kükürt kümelerinin oluşması ve hem sentezi gibi çeşitli metabolik süreçler için merkez görevi görür (Spinelli ve Haigis, 2018). Bu metabolik süreçler için gerekli molekülleri taşıyan mitokondriyal yapıların düzgün çalışmaları kritik önem taşımaktadır. CL ise, ADP/ATP taşıyıcısı (ANT), fosfat taşıyıcısı (PiC), piruvat taşıyıcısı, trikarboksilat taşıyıcısı ve karnitin/açilkarnitin translokaz (CAC) dahil olmak üzere önemli mitokondriyal substrat taşıyıcılarıyla etkileşime girmekte ve bu yapıları stabilize ederek düzgün çalışmalarını sağlamaktadır (Paradies vd., 2019). Bu görevinin yanı sıra, kardiyolipin aynı zamanda protein taşınmasında ve Ca^{2+} homeostazisinde önemli bir rol oynar (Ghosh vd., 2020; Sacchetto vd., 2019). Çeşitli çalışmalarda kardiyolipin eksikliğinin taşıyıcıların fonksiyon bozukluğu ve taşınanların eksikliği ile ilişkilendirilmesi, kardiyolipin türlerinin hücresel metabolik aktivitedeki öneminin altını çizmektedir.

Mitokondriya, özgün metabolik özellikleri sayesinde memeli hücrelerinin enerji merkezleridir. Elektron Taşıma Zinciri (ETC), mitokondriyonun iç zarında bulunur ve elektronların NADH ve FADH₂'den moleküler oksijene aktarıldığı dört kompleksten (I-IV) oluşmaktadır. Bu elektronlar, mitokondriyon zarları arasında iyonizasyon farkına neden olur ve bu da kemiosmosis üzerinden ATP sentazı aktive ederek ATP üretimini sağlar (Ahmad vd., 2023). Kardiyolipin, IMM'deki solunum protein kompleksleri ve süper komplekslerinin stabilitesi, dolayısıyla fonksiyonel aktivitesi için çok önemlidir (Zhang vd., 2002). Kompleks I, III ve IV'ün kardiyolipinler için spesifik bağlanma bölgelerine sahip olduğu gösterilmiştir

(Jussupow vd., 2019, Pfeiffer vd., 2003). Farklı dokulardan izole edilen mitokondriya üzerinde yapılan çalışmalarda, oksidatif ortamda bu komplekslerin aktivitesinin olumsuz olarak etkilendiği; ortama PC, PE ve peroksida CL ilavesi yapıldığında azalmış aktivite değişmezken, CL içeren lipozomların eklenmesi ile bu komplekslerin normal aktivitesini geri kazandığı gösterilmiştir (Paradies vd., 2001; Paradies vd., 2002). Ayrıca CL'nin sitokrom c oksidaz yoluyla proton translokasyonunda önemli bir role sahip olduğu, onu ETC'ye yaklaştırdığı ve kompleks III'ten kompleks IV'e elektron transferini hızlandırdığı öne sürülmüştür (Musatov vd., 2014). Buna ek olarak CL, IMM'deki kompleks V'e bağlanarak onun aktif olan dimerik formunu desteklemekte, dolayısıyla proton sızıntısını azaltıp ATP oluşumuna yardımcı olmaktadır (Eble vd., 1990, Acehan D vd. 2011, Jonckheere vd., 2012). Ayrıca CL'nin fosfat baş grubu bir proton tuzağı görevi görerek ATP sentaz için proton sağlamak ve zarlar arası boşluktaki (IMS) pH değişikliklerini en aza indirmektedir (Haines ve Dencher, 2002).

3.2.Apoptozis ve Kardiyolipin Oksidasyonu

Apoptozis, çeşitli iç veya dış hücresel olaylar tarafından başlatılan programlanmış bir hücre ölüm yoludur. Nöronal apoptoz, nörogeleşim, nörodejenerasyon ve nöronal hasarda hayati rol oynayan, sıkı bir şekilde kontrol edilen bir süreçtir. Apoptozun yürütülmesinde kardiyolipinin iki önemli rolü vardır; apoptotik kaskadın başlatılması ve kaspaz 8'in aktivasyonu. Dahili veya harici tetiklemeden sonra CL, IMM'nin iç yaprakçığından dış yaprakçığına yer değiştirir ve iki ayrı bağlanma bölgesi aracılığıyla cyt c ile etkileşime girer; fosfat-lizin ve doymamış açıl zinciri-aspartik asit etkileşimleri. Cyt c/CL kompleksi, Cyt c'nin peroksidaz aktivitesi kazanmasını sağlar, bu da peroksida CL (CLOx) ile sonuçlanır. CL'nin peroksida olmasıyla cyt c'nin ona bağlanma afinitesi azalır ve cyt c, eksternal mitokondriyal membranın (OMM) sitoplazmik tarafına salıverilir. Cyt c, apoptotik proteaz aktivasyon faktörü 1'e (APAF1) bağlanarak APAF1'in oligomerizasyonunu ve apoptozom oluşumuna neden olur. Apoptozom, kaspaz 9'u aktive eden bir kaspaz kaskadını başlatarak, kaspaz 3/7'nin aktivasyonu üzerinden hücresel proteinlerin parçalanmasına ve apoptozun tipik özelliklerinin oluşmasına neden olur. Ayrıca CL, diğer apoptotik kaspazları aktive ederek veya BH3-Bcl2 proteinini parçalayarak cyt c'nin mitokondriyondan salıverilmesine neden olan kaspaz 8'in aktivasyonu için gereklidir. Kaspaz-8, Kaspaz-3'ü doğrudan parçalar ve aktive ederek hücre ölümüne yol açar (Gonzalvez ve Gottlieb, 2007).

Model sistemlerde yapılan önceki biyokimyasal deneyler, yalnızca CL'nin değil aynı zamanda MLCL'nin de cyt c ile bir kompleks oluşturabildiğini ve bu kompleksin aynı zamanda çoklu doymamış fosfolipitleri (PUFA-PL) hedefleyen bir peroksidaz olarak da görev yaptığını göstermiştir (Kagan vd., 2023). Normal şartlarda, düşük MLCL seviyeleri ve

CL ile cyt c'nin farklı bölgelerde yoğunlaşması, bu peroksidaz kompleksinin oluşumunu engellemektedir. Kagan vd., TAZ eksikliğinin, MLCL'lerin güçlü birikimine yol açarak intermembranal bölgede MLCL/cyt c komplekslerinin oluşumuna ve ardından PUFA-CL ve PUFA-PL'lerin peroksidasyonuna yol açtığını göstermiştir ki bu lipitler apoptozis, ferroptozis gibi hücre ölüm yollarını aktive etmekte ve okside PUFA-PL'nin hidroliz ürünleri inflamasyon ve koagülopatiye yol açmaktadır (Kagan vd., 2023).

4. Kardiyolipinlerde Açıl Zincir Kompozisyonunun Önemi

Dokuya özgü açıl zincir kompozisyonu olan CL'ler, mitokondriyon iç zarının yaklaşık %15-20'sini oluşturmaktadır (Osman vd., 2011). Memeli kardiyak mitokondrisinde, linoleik asit (LA), toplam CL açıl zincirlerinin yaklaşık %80-90'ını oluştururken (Schlame vd., 2005) bu yüksek derecede açıl zinciri spesifikliği diğer dokularda gözlenmemektedir. Tetralinoleil kardiyolipin (CL4), karaciğerde %55-80, lenfoblastlarda %30, beyinde ise çok daha düşük bir yoğunlukta görülmektedir (Han vd., 2006; Song vd., 2010; Kiebish vd., 2008). Mevcut kompozisyon farklılıklarının yeniden yapılanma sürecinde ortaya çıktığı bilinmekle beraber, temel neden olarak enzim spesifikliğinin yanısıra mevcut serbest yağ asidi havuzunun da önemli olduğu öne sürülmektedir.

CL yağ asidi bileşimindeki bu değişiklikler, mitokondriyal fonksiyondaki değişikliklerle ilişkilidir (Petrosillo vd., 2003 ve Heather vd., 2010). Biyomimetik model çalışmalarda, CL/cytc kompleksinin CL4, (18:1)4CL, ve MLCL ile oluştuğu fakat (22:6)4CL'in bu oluşumu inhibe ettiği gösterilmiştir (Pennington vd., 2018; Sullivan vd., 2018). Başka bir çalışmada ise mitokondriyal kreatin kinaz-CL formasyonunun CL4 ve (18:1)4CL ile oluştuğu fakat (14:0)4CL ile oluşmadığı gözlemlenmiştir (Maniti vd., 2011). *S. cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada ise artmış CL açıl zincir saturasyonunun hasarlanmış oksidatif fosforilasyon ve bozulmuş membran krista yapısına neden olduğu ve bunun normale göre daha küçük boyutta mitokondriyon ile sonuçlandığını tespit edilmiştir (Harner vd., 2014). Ayrıca bazı çalışmalarda, CL kompozisyonundaki değişimi hayvanlarda daha iyi anlayabilmek için hayvanlara spesifik olarak diyet takviyesi/regülasyonu yapılmıştır. Sullivan vd. yaptığı çalışmada, yüksek yağlı diyet verilen farelerde kardiyak ve hepatik kardiyolipidomun yeniden düzenlendiği ve doku bazlı respiratuvar enzim aktivitesinde değişiklikler olduğu rapor edilmiştir (Sullivan vd., 2017). Kontrol diyetiyle karşılaştırıldığında, yüksek yağlı diyet, karaciğerdeki PUFA-CL'lerde belirgin artışa neden olmuş ve bu yeniden yapılanmaya kompleks I ile III solunum enzim aktivitesinin 3,5 kat azaldığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, tafazzin'in karaciğer mRNA seviyelerinin up-regüle edildiğini göstermişlerdir. Bu değişikliklerin ise kardiyak dokuda oluşmadığı rapor edilmiştir. Ayrıca, hayvanlara dokosaheksaenoik asit (DHA, 22:6) diyeti verilen bir

araştırmada kardiyak mitokondriyal fosfolipidomun değiştiği ve (22:6)4CL çeşidinin birikiminin kompleks I, IV ve V aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir (Sullivan vd., 2018).

CL yağ asidi kompozisyonundaki anormallikler, kalp yetmezliği, pulmoner hipertansiyon, akut miyokard iskemisi ve reperfüzyon hasarı ve diyabet gibi birçok hastalıkta rapor edilmiştir (Han vd., 2005; Han vd., 2007; Lesnefsky vd., 2001; Saini-Chohan vd., 2011; Sparagna vd., 2007; Petrosillo vd., 2003). Ayrıca normal CL içeriğinin geri kazanılmasının, miyokardiyal iskei ve reperfüzyon hasarından koruduğı ortaya konmuştur (Petrosillo vd., 2003). Fakat hastalıklar üzerine geliştirilen bu çalışmalar çoğunlukla miyokardiyal kardiyolipinomla ilişkili olup, CL4 üzerinde yoğunlaşmıştır. Beyin gibi CL4 oranı düşük olup çok çeşitli PUFA-CL içeren kardiyolipinomlarda kompozisyon değişikliklerinin fenotipe etkisi soru işareti olarak kalmaktadır.

5. Beyinde Kardiyolipin Dağılımı

Beyin kardiyolipin profili, diğer organ ve dokularla karşılaştırıldığında CL türlerinin bileşimi açısından farklıdır. Beynin, doymamış yağ asidi kompozisyonu bakımından, araşidonik asit (AA, 20:4) ve DHA gibi oksitlenebilir PUFA içeren yağ asitleri açısından zengin, linoleik asit (LA, 18:2) bakımından ise daha fakir olduğu ve CL türlerinin çeşitlilik bakımından geniş bir aralık gösterdiği ortaya konmuştur. Beyne kıyasla, kalp, iskelet kası ve bağırsak gibi diğer dokularda CL türlerinin ana baskın bileşeni linoleik asittir (Kagan vd., 2015; Oemer vd., 2020; Sparvero vd., 2016; Tyurina vd., 2014). Anthonymuthu vd., yağ asidi çeşitliliğine bağlı olarak sıçan beyinde 272'si en az bir PUFA içermek üzere 284 farklı CL türü olduğunu göstermiştir (Anthonymuthu vd., 2019).

Teknolojideki son gelişmelerden olan Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry Imaging (MALDI-IMS) ile birlikte kardiyolipin türlerinin beyinde nasıl dağıldığını araştırmak mümkün hale gelmiştir. Beyindeki CL türlerinin bu çeşitliliği, sıçan, fare ve insan gibi memelilerde görülebilmektedir (Cheng vd., 2008). Amoscato vd., CL'lerin sinyal yoğunluğunun hipokampus ve korteks gibi gri cevher bölgelerinde en yoğun iken, beyaz cevherde en düşük olduğunu ortaya koymuştur. Bu durumda öncelikle kardiyolipinin beyindeki miktarı nöroanatomik farklılık göstermektedir. Buna ek olarak, kortikal ve dantal hipokampus bölgeleri, en az bir PUFA zinciri içeren CL'ler açısından zengin olarak bulunmuştur (Amoscato vd., 2014).

Kardiyolipin kompozisyonu, beyin farklı yapılarında olduğu gibi, beyindeki hücre gruplarında da farklılıklar gösterir. Örneğin, nöronlarda astrositlere göre daha fazla PUFA içeren CL türleri bulunur ve CL çeşitliliği daha fazladır. Nöronlardaki kardiyolipinler,

özellikle linoleik asit ve araşidonik asit açısından zengindir (Kolomiytseva vd., 2010; Tyurina vd., 2014).

Önceki çalışmalar, beynin CL repertuarının, doğum sonrası dönemde nöronal yeniden yapılanma ile zamanla değiştiğini göstermiştir. Beyindeki CL içeriğinin doğum öncesi döneme göre doğum sonrası dönemde arttığı gösterilmiştir. Doğum öncesi dönemde CL moleküllerindeki baskın türler oleik asit (18:1) ve palmitoleik asit (16:1) iken, perinatal dönemde bunların içeriği büyük ölçüde yer değiştirmektedir. Lipit mediatörlerin prekürsörü olan AA ve DHA'nın CL'lerdeki içeriği, doğum sonrası dönemde güçlü bir artış göstermekte ve yetişkin yaşamı boyunca bebeklik dönemine nispeten sabit olarak kalmaktadır (Cheng vd., 2008). Perinatal dönemin, programlanmış hücre ölümü olan apoptozis ile birlikte, major nöronal yeniden yapılanmanın meydana geldiği dönem olduğu unutulmamalıdır (Cheng vd., 2008; Roth ve D'Sa, 2001). Cheng vd., perinatal dönemde CL türlerinde meydana gelen bu değişikliklerin, bu dönemde meydana gelen nöronal yeniden yapılanma sırasında gözlenen apoptotik süreçlerle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. (Cheng vd., 2008). Bu nedenle, CL türlerinin farklı dokulardaki, hatta dokuların farklı alanlarındaki, çeşitli hücrelerdeki ve gelişim evrelerindeki miktar ve türlerdeki bu farklılıkların bir amaca hizmet edebileceğini öne sürmek yanlış olmaz.

6. Kardiyolipin ve Barth Sendromu

Her 140.000 canlı doğumda bir görülen Barth sendromu (BTHS), TAZ mutasyonu ile karakterize ve birçok sistemin etkilenmesiyle ilerleyen bir hastalıktır (Barth vd., 1983; Aprikyan ve Khuchua, 2013; Clarke vd., 2013; Cantlay vd., 1999; Barth Sendromu Vakfı, 2019). Başlangıçta Barth vd. tarafından 1983 yılında (Barth vd., 1983) yalnızca erkekleri etkileyen, tek tip ölümcül bir hastalık olarak tanımlanan bu hastalığın artık yaş dağılımının 0 ile 49 arasında değiştiği ve belirtilerin ergenlik döneminde zirve yaptığı bilinmektedir (Barth vd., 2004). Nötropeni ile birlikte erken kardiyomiyopati ve hipertrofi, hastalığın ayırt edici özelliğidir. Kanda artan MLCL:CL oranı hastalık için tanısaldır ve mitokondriyal biyoenerjetik bozulmasına yol açtığı öne sürülmektedir (Zegallai vd., 2021). Fakat tüm doku ve organlar bu hastalıktan aynı şekilde etkilenmemektedir. Bu durum da hastalık patolojisindeki doku özgüllüğüne dikkat çekmektedir.

Kagan vd., BTHS'nin primer patojenik mekanizması olarak MLCL birikiminin yol açtığı anormal MLCL-cyt c peroksidaz komplekslerinin oluşumunu ve böylece çoklu doymamış yağ asidi fosfolipitlerin peroksidasyonunu öne sürmüştür (Kagan vd., 2023). Önerilen peroksidasyon mekanizmasının doku özgüllüğü muhtemelen iki faktörden kaynaklanmaktadır: (1) mitokondriyal yoğunluğun ve TAZ'ın ekspresyonunun dokular

arasında değişmesi ve (2) dokular arası PUFA-fosfolipitlerin çeşitliliğinin ve miktarının farklılık göstermesi. TAZ ekspresyonunun en yüksek seviyeleri kalp/iskelet dokusu, kemik iliği, dalak ve beyinde görülmektedir (İnsan Protein Atlası). Bu, TAZ eksikliğinin bir sonucu olarak bu dokularda MLCL miktarının daha fazla olabileceğini düşündürmektedir. Bununla uyumlu olarak, MLCL:CL oranının yapılan çalışmalarda BTHS'li hastaların fibroblast, lenfosit ve iskelet kası hücrelerinde (0,4-13.8 aralığında) sağlıklı kişilerin hücrelerine (0-0,2 aralığında) göre hem önemli ölçüde arttığı hem de dokuya özgü bir şekilde çeşitlendiği gösterilmiştir (Houtkooper vd., 2009; Van Werkhoven vd., 2006). Bu durum, TAZ'ın eksikliğinin BTHS'de dokuya özgü etkilere yol açabileceğini önermektedir.

Beynin özel bir kardiyolipin kompozisyonuna sahip olması ve yoğun mitokondri içeriği olan hücreleri- nöronları- içermesi göz önüne alındığında, TAZ eksikliğinin nörolojik bulgulara yol açacağı öne sürülebilmektedir. Yapılan çalışmalarda da BTHS hastalarında genellikle kognitif bozukluklar olmak üzere nörolojik komplikasyonların ortaya çıktığı gösterilmiştir (Mazzocco vd., 20017). Bunun yanısıra, çeşitli çalışmalarda BTHS'li hastalarda yalnızlığa eğilim, aşırı yorgunluk hissi, depresyona eğilim, düşük görsel-uzaysal beceriler ve matematiksel beceriler gibi önemli nöropsikolojik ve nörokognitif fenotipler tanımlamıştır (Olivar-Villanueva vd., 2021; Reynolds vd., 2015). Ayrıca, matematiksel becerilerdeki zayıflığın yaşla birlikte kötüleştiği gösterilmiştir (Raches vd., 2012; Mazzocco vd., 2007).

İlginç olarak, BTHS'li bireylerde hastalığın genotipi ile fenotipi arasında bir korelasyon olmadığı görülmektedir (Thompson vd.,2016). Bazı hastalarda öğrenme ve konuşma güçlüğünün görülürken (Mazzocco vd., 2007; (Roberts vd., 2012), bazı hastaların BTHS tanısına rağmen bilişsel bozukluğun olmadığı ortaya konmuştur (Ades vd. 1993). TAZ geninde Barth sendromuna yol açtığı gösterilmiş 160'ın üzerinde mutasyon tanımlanmıştır (Aprikyan ve Khuchua, 2013). Sendromun doğasındaki çok farklı bulgu ve prognoz prezentasyonu, çeşitli mutasyonların neden olduğu farklı enzim aktiviteleriyle açıklanabilir. Hastalığın nadir olma doğası, kognitif bozukluğa yok açan mutasyonların tespit edilmesini zorlaştırmaktadır.

7. Kardiyolipin ve Travmatik Beyin Hasarı

Travmatik beyin hasarı (TBH), morbidite ve mortalite ile sonuçlanan dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur (Flanagan, 2015; Selassie vd., 2003). Yalnızca ABD'de, TBH yılda 200.000'den fazla hastane yatışına ve 50.000'den fazla ölüme neden olmaktadır (Flanagan, 2015). Şiddetli TBH'nin yüksek kötü prognozuna rağmen etkili nöroprotektif tedavilerin varlığı yetersizdir (Rozenbeek vd., 2013).

Mitokondri iç membranının iç yaprakçığındaki CL'in travma sonrası, dış yaprakçığa transloke olmasıyla CL-ilişkili süreçler başlamaktadır. CL, travmatik beyin hasarının patolojisinde üç ana yolda çok önemli rol oynamaktadır:

1. Fosfolipit scramblase-3 ile dış mitokondriyal membrana translokasyonu ve kargo proteini LC3 ile etkileşim yoluyla mitokondriyi mitofajiye yönlendirmesi
2. Cyt c'nin mitokondrinin dış yüzeyine salıverilmesine neden olması ve bunun kaspaz aktivasyonuna yol açarak apoptozisle sonuçlanması
3. CL'in Cyt c/CL kompleksi tarafından peroksitlenmesinden sonra, iPLA2 γ tarafından hidrolize uğrayarak oksitlenmiş çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFAox) serbest bırakması ve bunların beyin hasarı sonrasındaki inflamasyona ve koagülopatiyeye yol açması (Chu vd., 2013; Ji, Tyurina vd., 2012, Dennis ve Norris, 2015; Vangaveti vd., 2010).

Sparvero vd., TBH'nin perikontüzyonel korkteks, ipsilateral hipokampus ve talamusta çoğunluğu PUFA taşıyan çeşitleri olmak üzere CL miktarında azalmaya yol açtığını göstermiştir (Sparvero vd., 2016). Bunun nedenlerinden biri, artan reaktif radikaller sonucu PUFA-CL'lerin okside olması olabilir. Hayvanlarda yapılan başka bir çalışmada, TBH'nin erken dönemlerinde CLox ve MLCL birikiminin olduğu ve iPLA2 γ ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. iPLA2 γ eksikliği olan hayvanlara TBH modeli uygulandığında ise, TBH uygulanmış normal farelere göre, bu hayvanlarda nörodejenerasyonun ve davranışsal defisitinin arttığı tespit edilmiştir. Bununla beraber, TAZ overekspresyonunun hücre germe modeli uygulanan HT22 hücrelerinde, sitotoksiteyi azalttığı bulunmuştur (Chao vd., 2018). Mitokondriyi hedef alan bir nitroksit olan XJB-5-131 tedavisinin CL oksidasyonunu bloke ederek, apoptotik nöron ölümünü azalttığı ve TBH'nin neden olduğu bilişsel işlev bozukluğunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Ji, Kline vd., 2012). Ayrıca azalan PUFA-CL miktarı, mitokondriyal proteinlerin aktivasyon ve stabilizasyonunda bozulmaya yol açabilir. Tüm bahsedilen çalışmalar, CL oksidasyonunun TBH patolojisinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir.

8. Tafazzin Eksikliğinin Hayvanlarda Fenotipe Yansıması

Beyindeki kardiyolipinom ile buna bağlı bilişsel ve kognitif fonksiyonların tafazzin mutasyonlarıyla nasıl etkilendiğini gösteren çalışmalar maalesef yeterli değildir. Bu çalışmalar TAZ-KO veya TAZ-knock down (KD) olarak planlanmakla birlikte belli bir doku ya da hücreye spesifik olmaktan ziyade global tafazzin mutasyonu ile yapılmıştır. Bu çalışmalarda, TAZ-KO farelerde kardiyomyopati, kalp yetmezliği, büyümede yavaşlama, erken neonatal ölüm, azalmış adipoz doku ve yaşla beraber artan egzersiz intolerasyonu gibi bulgular gözlenmiştir (Tomczewski vd., 2023; Wang vd., 2020; Pang vd., 2022). Fakat, bu

Çalışmalarda nörolojik bulgulara yaklaşım sadece periferik kas güçsüzlüğüne yönelik yapılmış, santral sinir sistemi üzerinde bir değerlendirme yapılmamıştır. Oysa Barth sendromlu hastalarda nörolojik bulgu ve semptomlar rapor edilmiştir. Tafazzinin KD edildiği çalışmalara bakıldığında ise, KD farelerde kardiyomyopati, kas güçsüzlüğü, azalmış egzersiz kapasitesi, büyümede yavaşlama, vücut ağırlığında azalma, düşük nötrofil sayısı ve hafıza bozuklukları olduğu gösterilmiştir (Cole vd., 2018; Acehan vd., 2011; Phoon vd., 2012; Spencer vd., 2011). TAZ-KD farelerin beyinlerinde, normal farelere göre CL miktarını azaldığı, bununla birlikte MLCL miktarının, kompleks I aktivitesinin ve reaktif oksijen türlerinin önemli ölçüde arttığı gterilmiştir. Ayrıca TAZ-KD farelerde yeni nesne tanıma testinde hatırlamanın bozulduğu, bu duruma azalan sinaptofizin protein seviyelerinin, hipokampus nöronal CA1 katmanındaki bozulmanın ve artmış mikrogliyal aktivasyonun eşlik ettiği gösterilmiştir (Cole vd., 2018).

Mevcut çalışmalarda olduğu gibi, tafazzinin doku ve hücre spesifitesi göstermeden KO veya KD edilmesi, bu enzimin eksikliğinin beyne spesifik etkilerinin gözlemlenmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca genin KD edildiği çalışmalarda dokuda az miktarda da olsa TAZ olduğu gösterilmiştir. Bu nedenlerle, yalnızca beyne özgü etkilerin gözlenmesini sağlayan TAZ odaklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Tüm bu veriler, beyindeki CL çeşitliliğine neden olan asıl etkenin ve bu çeşitliliğin beyin fonksiyonunu nasıl etkilediğinin tam olarak ortaya konmadığı göstermektedir. Bununla birlikte, nöronal tafazzinin beyin hasarında patolojik süreçteki önemi bilinmemektedir.

Mevcut çalışmadaki hipotezlerimiz aşağıdaki şekildedir:

- 1) Nöronal tafazzin, beyindeki PUFA taşıyan CL'lerin oluşması ile davranışsal ve kognitif fonksiyonlar için esansiyeldir.
- 2) Nöronal tafazzininin yokluğu travmatik beyin hasarı sonrası süreci MLCL miktarını ve apoptozisi arttırarak kötüleştirir.

Bu hipotez doğrultusunda aşağıdaki hedefler amaçlanmıştır:

- 1) Nöronal Tafazzin silinmesiyle beyindeki CL çeşitliliğinin nasıl değiştiğini göstermek
- 2) Kardiyolipinomdaki değişikliklerle, mitokondriyal fonksiyon ve apoptotik değişiklikler arasındaki ilişkiyi gözlemlemek

- 3) Nöronal Tafazzin silinmesinin bilişsel ve davranışsal süreçleri ne şekilde değiştirdiğini gözlemlemek
- 4) Nöronal Tafazzin silinmiş mutantlarda deneysel olarak oluşturulan beyin hasarı sonrasındaki kardiyolipinom bulgularının nasıl değiştiğini göstermek
- 5) Beyin hasarı sonrasındaki kardiyolipinom değişiminin bilişsel ve davranışsal süreç ile lezyon büyüklüğüne etkisini tespit etmek



GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar

Çalışmanın etik izni çalışmanın yapıldığı Pittsburgh Üniversitesi “Institutional Animal Care and Use Committee” tarafından onaylanmıştır. Tüm hayvanlar Jackson Laboratuvarları’ndan (Bar Harbor, ME) temin edilmiştir.

CL tür çeşitliliğinin fare, sıçan ve insan beyni arasında benzer olduğu gösterilmiştir (Cheng vd., 2008). Bu çalışmada, 8-12 haftalık (geç adolesan/erken yetişkin) erkek C57B6J türü fareler ve yine B6J temelinde geliştirilmiş nöronal Tafazzin knock-out (nTAZ-KO) fareler kullanılmıştır. Deney süresince oda sıcaklığı 23°C-24°C arasında tutulmuş ve oda ışığı 12 saat açık (07:00-19:00) 12 saat kapalı (19:00-07:00) şekilde kontrol edilmiştir. Hayvan barınaklarında ölçülen ışık yoğunluğu 20 luks'ten az olacak şekilde ayarlanmış ve hayvanlar, standart laboratuvar yemi ve su ile ad libitum beslenmiştir.

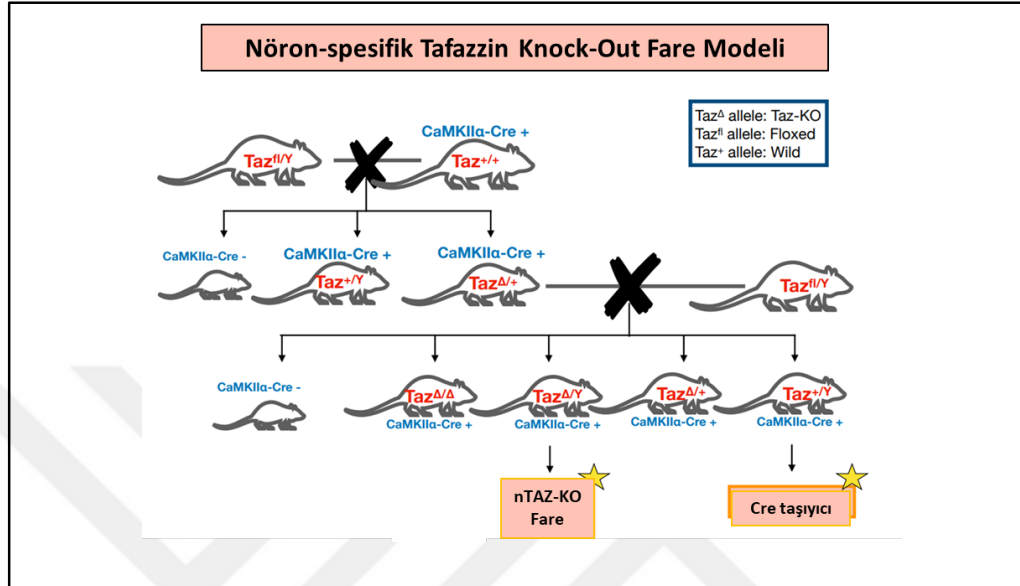
Genotip açısından üç farklı hayvan grubu kullanılmıştır: normal genomlu (WT), CaMK2 α -Cre taşıyıcısı (Cre-Car) ve nTAZ-KO (Deney protokolü, 1. Grup). Bu hayvan gruplarından Cre-Car ve nTAZ-KO olanlara kontrollü kortikal hasar uygulanmış, uygulamadan 4 saat sonra beyin örnekleri alınarak lipidomiks analiz yapılmıştır (Deney Protokolü, 2. Grup).

Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin geliştirilme süreçleri aşağıda anlatılmıştır.

Nöronal Tafazzin knock-out farelerin geliştirilmesi

Floxed tafazzin geni içeren spermler C57BL/6 arka planında üretilen Taz flox erkek fareden (Taz^{f/y}) alınarak tarafımıza gönderilmiştir. Floxlama işlemi, TAZ geninin ekson 5-10 arasındaki iki loxP sekansı arasında gerçekleştirilmiştir (Dr. Strathdee, Cancer Research UK Beatson Enstitüsü). nTAZ-KO modeli, *Tafazzin* geninin nöron spesifik inaktivasyonu için bir promotör olarak kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II alfa (CaMKIIa) rekombinaz geninin promotörüne Cre rekombinaz geni eklenerek geliştirilmiştir. *CaMKIIa*, nöronlara özgü proteinlerden biridir ve hipokampusta ve serebral kortekste yüksek oranda eksprese edilir (Kim H. vd., 2018). İlk olarak, hemizigot Taz^{f/y} genetiğindeki spermin ve normal tip C57BL/6J dişi fareden (Taz^{+/+}) alınan bir oositin in vitro fertilizasyonu kullanılarak bir Taz^{f/+} dişi fare üretilmiştir. Daha sonra, ortaya çıkan dişi fare, nTAZ-KO fareleri ve kontrolleri oluşturmak için Cre-taşıyıcı erkek fare ile çaprazlanmıştır (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). nTAZ-KO olarak hemizigot Cre-taşıyıcı erkek fareler (Taz^{f/y}) kullanırken,

kontrol olarak normal tip Cre-taşıyıcı erkek fareler ve normal genoma sahip erkek fareler kullanılmıştır (Şekil 2).

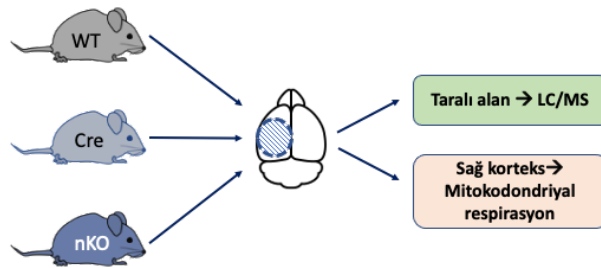


Şekil 2. Nöron spesifik Tafazzin *Knock Out* farelerin geliştirilmesi.

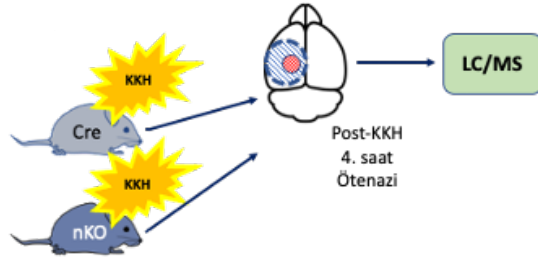
Deney Protokolü

Deneyler 4 çalışma grubuyla tamamlanmış olup her aşamada yapılan çalışmalar aşağıdaki şekilde gösterilmiştir:

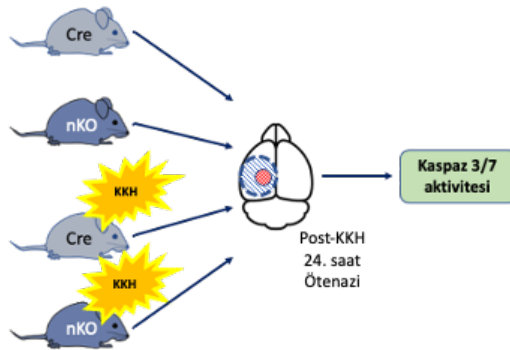
1. Grup: Naiv hayvanlarda lipidomun ve mitokondriyal respirasyonun değerlendirilmesi



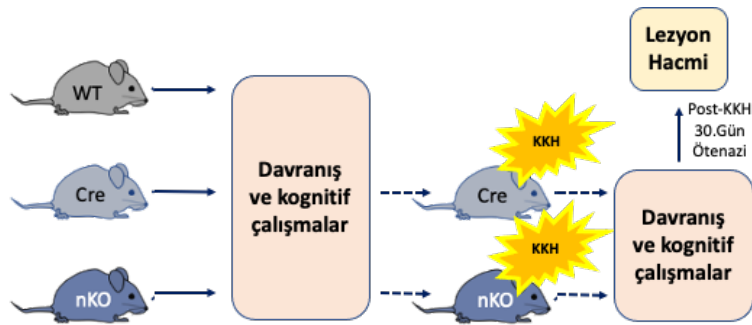
2. Grup: KKH'ye maruz kalmış hayvanlarda lipidomun değerlendirilmesi



3. Grup: Naiv veya KKH oluşturulmuş hayvanlarda Apoptotik aktivitenin ölçülmesi



4. Grup: Kognitif ve davranışsal testlerin yapılması



Deneylerde kullanılmayan dokular diğer çalışmalarda kullanılmak üzere -80 derecede saklanmıştır.

Kontrollü kortikal hasar modeli

Kontrolü Kortikal Hasar (KKH) modeli daha önceki çalışmalarda anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir (Bayir vd., 2007). Özetle, farelere induksiyonu için %3-4 izofluran inhaler olarak uygulanıp, anestezi idamesi N_2O/O_2 (2:1) içinde %2 izofluran ile inhale olarak sağlanmıştır (Parkland Scientific, Florida, ABD). Daha sonra orta hattın 1 mm solunda, sol pariyetal kemik üzerinden 5 mm çapında kraniotomi yapılmış, 3 mm metal pnömatikli impaktör (Pittsburgh Precision Instruments, Pneumatic Powered Controlled Cortical Impact Device, ABD) çarpma hızı 5 ± 0.2 m/sn, penetrasyon derinliği biyokimyasal çalışmalar için 1.2 mm ve davranış çalışmaları için korteksle beraber hipokampusu de hasarlamak için 2.4 mm ve deformasyon süresi 50 milisaniye olarak ayarlanarak açılan kraniotomi bölgesine 1 kez vurulmuştur. KKH'den sonra bölge, kraniotomiyle alınan kemik geri yerleştirilip, dental çimento (Vernon-Benshoff, Albany, NY) ve deri insizyonu (4-0 iplik ile) kapatılmıştır. Sıçanlar solunum desteğinden çıkarılmış ve 1 saatlik izlemi takiben anestezi etkisinden kurtulan hareket etmeye başlayan fareler bir sonraki çalışmaya kadar kafeslerine geri konulmuş, 3-4 farelik gruplar şeklinde muhafaza edilmiştir.

Örnek toplama

Tüm hayvanlar kardiyak perfüzyon ve sonrasında dekapitasyon olmak üzere ikili yöntemle ötenazi edilmiştir. Her deney için belirtilen ötenazi süreleri deney protokolünde belirtilmiştir.

Kardiyak perfüzyon için farelere N_2O/O_2 (2:1) içinde %2 izofluran ile inhale olarak verilerek üst abdomen diafragmaya paralel kesi ile açılmıştır. Dah sonra diafragma kesilerek sol ventriküle perfüzyon iğnesi yerleştirilmiştir. Sağ atrium kesildikten sonra, karaciğerin rengi solana kadar en az 20 ml soğuk heparinize salin enjekte edilmiş ve beyin eksize edilmiştir.

Ötenazi sonrasında naiv hayvanlarda pariyetal korteks merkezli 6 mm çapında dairesel bir alan, KKH'ye uğramış hayvanlarda hasarlı bölgenin kenarından 3 mm genişliğinde sirküler bir alan çizilerek peri-kontüzyonel korteks toplanmıştır. Bu bölgelere lipidomik analiz için sıvı nitrojenle aniden dondurma işlemi uygulanıp, örnekler kullanılabilecek kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklanmıştır.

Lipit ekstraksiyonu ve lipit kromatografisi/kütle spektrometresi analizi

İlgili korteks bölgesinden, tüm lipitler Folch yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen lipitlerin toplam fosfat içeriği, daha önce bildirilen bir yöntem kullanılarak ölçülmüştür (Anthonymuthu vd., 2019). Fosfolipit analizi için, yaklaşık 20 nanomol toplam

fosfata karşılık gelen örneklere, uygun dahili standartlar (son konsantrasyonu 1 µM olmak üzere; fosfatidilkolin (PC) (17: 0/17: 0), fosfatidilgliserol (PG) (17: 0/17: 0), fosfatidilinositol (PI) (16: 0/16: 0), CL (14: 0/14: 0/14: 0/14: 0), fosfatidilserin (PS) (17: 0/17: 0), fosfatidik asit (PA) (17: 0/17: 0), fosfatidiletanolamin (PE) (17: 0/17: 0), MLCL (14:0/14:0/14:0), lyso-fosfatidilkolin (LPC) (17: 1/-), lyso-fosfatidilgliserol (LPG) (17: 1/-), lyso-fosfatidilinositol (LPI) (17: 1/-), lyso-fosfatidilserin (PS) (17: 1/-), lyso-fosfatidik asit (LPA) (17: 0/-), lyso-fosfatidiletanolamin (LPE) (17: 1/-) doğrudan eklenip (Avanti Polar Lipids), LC-MS/MS (Thermo Scientific™ Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ kütle spektrometresine bağlı Thermo HPLC sistemi) kullanılarak analiz edilmiştir. Fosfolipitler, 35 °C’de bir normal faz kolonunda (Luna 3 µm Silika (2) 100 Å, 150 × 1.0 mm, (Phenomenex)), daha önce tarif edildiği gibi 10 mM amonyum format içeren gradyan çözücüler (A ve B) kullanılarak ayrıştırılmıştır. (Sun ve ark., 2021). Çözücü A, izopropanol/heksan/su (285:215:5, v/v/v), çözücü B ise izopropanol/heksan/su (285:215:40, v/v/v) içermektedir. Gradyanlar şu şekildedir: 0–3 dk, %10–37 B; 3–15 dk, %37 B’de sabit; 15–23 dk, %37–100 B; 23–75 dk, %100 B’de sabit; 75–76 dk, %100–10 B; 76–90 dk, %10 B’de dengeleme. Analiz, negative iyon modunda; kapiller voltaj, 3500; kılıf, yardımcı ve süpürme gazları (sırasıyla 35, 17, 0); iyon transfer tüpü sıcaklığı, 300 °C; orbitrap çözünürlüğü, 120,000; tarama aralığı 400–1800 m/z; Rf lens, 40; enjeksiyon süresi, 100 ms; yoğunluk eşiği 4e2 olacak şekilde uygulanmıştır. Veri bağımlı MS2 için 1.2 m/z izolasyon penceresi kullanılmıştır. Çarpışma enerjisi (HCD) 24 olarak sabit olup, orbitrap çözünürlüğü 15,000 ve enjeksiyon süresi 22 ms olarak ayarlanmıştır.

KKH çalışmasında, fosfolipitlerin serbest yağ asitleriyle beraber değerlendirilebilmesi için, ayırma 35 °C’de C30 ters faz kolonu (Accucore 2.6 µm, 2.1 mm × 25 cm, Thermo Scientific) üzerinde, 100 µl/dak akış hızında A ve B çözücülerini kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Negatif iyon modunda, gradyan metodu şu şekilde uygulanmıştır: 0–40 dk, %15–50 B (doğrusal, 5); 40–130 dk, %50–100 B (doğrusal, 5); 130–135 dk, %100 B’de sabit; 135–140 dk, %15 B (doğrusal, 5); 140–150 dk, %15 B’de dengeleme. Diğer parametreler şu şekildedir: kapiller voltaj, 3900; orbitrap çözünürlüğü, 120,000; kılıf, yardımcı ve süpürme gazları (sırasıyla 30, 23, 1); iyon transfer tüpü sıcaklığı, 300 °C; tarama aralığı 150–1800 m/z; Rf lens, 40; enjeksiyon süresi, 100 ms; yoğunluk eşiği 4e2. Veri bağımlı MS2 için 1.2 m/z izolasyon penceresi kullanılmıştır. Çarpışma enerjisi 24, orbitrap çözünürlüğü 15,000 ve enjeksiyon süresi 22 ms’dır. Spektrum, normal faz için 400 ila 1800 m/z ve ters faz için 150 ila 1800 m/z aralığında kaydedilmiştir. İyonlar +1 m/z izolasyon penceresinde izole edilmiştir.

Lipit türlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi

Lipit türlerinin tanımlanması ve miktar tayini, Compound Discoverer v.2.0 yazılımı (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA) kullanılarak, redoks lipidomu için geliştirilen optimize bir çalışma akışı ile gerçekleştirilmiştir. Önceki çalışmalarda belirtildiği gibi, sinyal/gürültü oranı (S/N) 3'ten büyük ve minimum iyon yoğunluğu 5000 olan pik noktaları belirlenmiş ve fosfolipitlerin tüm olası açıl zincir kombinasyonları için oluşturulan fosfolipit hedefli m/z listesine göre araştırılmıştır (Anthonymuthu vd., 2019). Hesaplanan kütlelerin 7 ppm içinde ve CL dahili standart (IS) türlerinin 5 dakika içinde elüe edilen tüm iyonlar tanımlanmış, liste ayrıca her bir lipit sınıfı için tutma süresine (RT) göre filtrelenmiştir. Tanımlanan lipitler, aynı sınıftaki temsili lipitlerin fragmentasyon modelinin MS2'de tanınmasıyla manuel olarak doğrulanmıştır. Elde edilen değerler, dahili standarda normalize edilip, kalibrasyon eğrisi kullanılarak ölçülmüştür.

CL türleri gösterilirken CL(x:y) şeklinde ifade edilmiş olup, x açıl zincirlerdeki toplam karbon sayısını, y ise toplam çift bağ sayısını göstermektedir. CL(a:b/ c:d/ e:f/ g:h) şeklindeki gösterim ise 4 açıl zinciri “/” işaretiyle ayırarak her bir açıl zincirdeki karbon sayısını ve çift bağı göstermek için kullanılmıştır.

Mitokondrial respirasyonun değerlendirilmesi

Sadece naiv hayvanların taze olarak izole edilmiş sağ korteksi, buz soğukluğunda buffer (0.2 M mannitol, 50 mM sukroz, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM sıgır serum albümini, 10 mM Hepes, pH 7.4) içerisinde ultrasonik homojenizatör ile homojenize edilmiş ve 600xg'de santrifüjleme yoluyla temizlenmiştir. Süpernatant daha sonra 10.000 xg'de santrifüj edilerek mitokondri pellet haline getirilmiş, bunlar daha sonra MiR05 mitokondriyal solunum bufferında dağıtılıp yüksek rezolüsyonlu respirometre'de (Oroboros Oxygraph-2 K) değerlendirilmiştir. Substrat ilaveleri olarak önce sitokrom C (10 µM) ve malat (2 mM), ve ardından durum 3 solunumunu uyarmak için 5 mM ADP verilmiştir. Daha sonra, Kompleks I'i uyarmak için 5 mM piruvat ve 10 mM glutamat ve Kompleks I + II'nin birleşik aktivitesini uyarmak için 10 mM süksinat ilave edilmiştir. Ayırıcı karbonil siyanür m-klorofenilhidrazon (1 µM) ile maksimum solunum uyarılmış ve son olarak izole maksimum kompleks II solunumunun belirlenmesini sağlamak için Kompleks I inhibitörü rotenon uygulanmıştır. Oksijen tüketim oranları protein içeriğine göre normalleştirilmiştir.

Davranış testleri:

Fareler, hayvan barınağına ilk ulaşma gününden itibaren 5-7 gün boyunca barınakta müdahale edilmeksizin adaptasyon için tutulmuş, sonra davranış testleri uygulanmaya başlanmıştır.

Nesting Yuva yapma testi

Kendine bakabilme -iyilik hali, nesting testiyle ölçülmüştür. Nesting testinin 1.günü tüm hayvanlar kafeslerde tekli konaklamaya geçilerek, her bir kafese 1 adet pamuk nestlet (Ancare, Bellmore, ABD) konulmuştur. 24 saat sonra, daha önceki çalışmalarda belirtildiği gibi, yuva yapma durumuna 0-5 arası puanlama yapılmıştır (Daecon RMJ, 2006). Buna göre, hiç dokunulmayan neslete 0, neslet ile yapılan kubbeye 5 puan verilmiştir. Nesting testi KKH öncesi ilk test, KKH sonrası ise 28. günde son test olarak tüm hayvanlara uygulanmıştır. Tüm puanlama işlemi hayvan gruplarına kör 2 araştırmacı tarafından yapılmıştır.

Sosyal etkileşim testi

Fareler, 71 cm x 51 cm x 51 cm boyutlarında, üstü açık dörtgen şekilli, ortasında 30 cm uzunluğunda bu şekili ayıran opak duvar olan, her bir dış köşesine yerleştirilmiş boş bir kafesin bulunduğu iki seçenekli bir alana yerleştirilmiştir (Lee EH vd., 2018). Habitasyon gününde farenin serbestçe U şeklindeki iki seçenekli alanda 5 dakika boyunca keşif yapmasına izin verilmiştir. Aynı gün, 4 dk sonrasında yapılan sosyal etkileşim testi için ise denek fare, bir tarafta bir sosyal hedef olan yeni tanıştırılan bir farenin olduğu ve diğer tarafta boş bir kafesin bulunduğu alanda 5 dakika boyunca keşif yapmasına izin verilmiş olup, tüm süreçler video ile kayıt altına alınmıştır. EthoVision Takip Sistemi kullanılarak sosyal hedefli ve boş kafes ile geçirilen toplam süre değerlendirilmiştir. Habitasyonda bir tarafta güçlü bir tercih gösteren fareler (yüzde 65'in üzerinde) protokol gereği deneyden çıkarılmıştır. Sosyal etkileşim; farenin, sosyal hedefin olduğu kafesin çevresinde geçirdiği süre ve bu kafese burnunun ucunu sokarak sosyal hedefle koklaştığı süre ile değerlendirilmiştir.

Morris su labirenti testi

Uzaysal öğrenme ve hafıza, Morris Su Labirenti kullanılarak daha önce rapor edilen yöntemle değerlendirilmiştir (Dixon CE vd., 1999). Farelerin uzak ipuçları arasındaki mekansal ilişkileri öğrenme yeteneklerini değerlendirmek için suyun yüzeyinin 1 cm altına

yerleştirilen 60 cm yüksekliğindeki bir platform ile 90 cm çapında bir havuz kullanılmıştır. Naiv hayvanlar (her grup için n = 10) 5 günlük gizli platform testi ile öğrenme sürecine sokulmuş olup, sonrasında prob ve görünür platform testlerine tabi tutulmuştur. Prob testinde platform tamamıyla havuzdan çıkarılmış olup, görünür platform testinde platform su yüzeyinin 1 cm yukarısına çıkarılmıştır. Gizli platform ve görünür platform testinde, her gün hayvan havuzun doğu, batı, kuzey ve güney yönlerinden bırakılarak maksimum 90 saniye olacak şekilde yüzdürülmüştür. Prob testinde ise, hayvan önceden platformun olduğu bölgenin karşı noktasından havuza bırakılıp 60 saniye boyunca gözlenmiştir. KKH sonrasında, fareler (her grup için n = 10) gizli platformu bulma testi için 10-14. günlerde testlere tabi tutulmuş olup, post-KKH testinde platformun yeri pre-KKH testine göre değiştirilmiştir. Prob ve görünür platform denemeleri 15-16. günlerde gerçekleştirilmiştir. Deney boyunca 2.5 × 2.5 m boyutundaki sessiz bir odada yer alan havuzda görsel ipuçları ve aydınlatma sabit tutulmuştur. Kontrol grubuna da aynı işlemler aynı günler içinde uygulanmıştır.

Yeni obje tanıma testi

71 cm x 51 cm x 51 cm boyutlarında, üstü açık, opak bir dikdörtgen plastik konteyner kullanılmıştır. Test sırasında her bir fareye farklı renk ve şekilde iki nesne verilmiştir. Alıştırma aşamasında (habitasyon, açık alan testi) her bir fare, serbestçe keşfetmesi ve alışması için nesne bulunmayan konteynere tek başına yerleştirilmiş ve toplamda 5 dakika süreyle kayıt yapılmıştır. Alıştırma sürecinden 24 saat sonra, fare 10 dakika boyunca aynı konteynerde, iki aynı karakterde alıştırma nesnesiyle birlikte tutulmuştur. Fare, daha sonra konteynerden alınarak koloniye geri konulmuş ve 24 saat sonra, 10 dakikalık bir sürede yeni ve eski objeyle test tekrarlanmıştır. Tüm süreçler video kaydı ile belgelenmiştir. EthoVision Takip Sistemi kullanılarak, yeni ve eski objeyle geçirilen toplam süre değerlendirilmiştir. 2. gündeki cisim başına keşif süresi 20 saniyenin altında olan fareler çalışma dışı bırakılmıştır. Tercih indeksi hesaplanarak rapor edilmiştir.

$$\text{Tercih indeksi} = A / (B + A) \times 100 (\%)$$

A: Yeni cisimde geçirilen süre, B: Bilinen cisimde geçirilen süre

Beam denge testi

Motor fonksiyon, daha önce tarif edildiği gibi, bir denge kirişi kullanılarak değerlendirilmiştir (Dixon CE vd., 1999). Fareler (her grup için n = 10), üç ardışık denemede 60 saniye boyunca 1.5 cm genişliğinde ve 90 cm yüksekliğindeki yuvarlak ahşap

bir kırışte durmak için 0. günde eğitime tabi tutulmuşlardır. Fareler daha sonra 1-7. günler arasında deneysel gruptan habersiz bir gözlemci tarafından test edilmiş ve her gün üç denemeden geçirilerek kırış üzerinde dengede kaldıkları ortalama süre kaydedilmiştir. 1.gün sonuçları temel değerler olarak alınmış olup, 2. günde farelere KKH uygulanmış ve 3-7. günlerde KKH sonrası ölçümler yapılmıştır.

Kaspaz 3/7 ölçümü

Kaspaz 3/7 aktivitesi, önceden tanımlandığı şekilde Caspase-Glo 3/7 deney kiti (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak ölçülmüştür (Ji J et al.,2012). Beyin dokusu sonikasyonla parçalanarak homojenize edilmiş, protein miktarı Bio-Rad protein ölçüm kiti (Bio-Rad Laboratories, ABD) ile üretici firmanın belirttiği gibi ölçülerek ve 50 µL örnekte 20 µg protein bulunacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş örnekler, 1 saat boyunca Caspase Glo deney kiti reaktifıyla (1:1 oranında) inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, luminesans sinyali mikro plaka (Danatech ML 1000, Dynatech Labs, ABD) plaka okuyucu kullanılarak ölçülmüş ve mg protein başına ortalama luminesans hesaplanmıştır.

Lezyon büyüklüğünün ölçülmesi

Lezyon ölçümü, KKH sonrası 30. günde yapılmıştır. Davranış testlerinin tamamlanmasının ardından farelere yeniden anestezi uygulanmış ve yukarıda belirtildiği gibi perfüze edilmiştir. Beyin, sükröz çözeltisinde kriyo-korumaya tabi tutulmuş ve sıvı nitrojende dondurulmuştur. Bir kriyotom kullanılarak beyinden her 500 mikronda bir, 10 mikron kalınlığında seri koronal kesitler alınmış ve lam üzerine alındıktan sonra hematoksilin ve eosin (H&E) ile boyanmıştır. Lezyon hacmi, daha önce tarif edildiği gibi fare gruplarına kör bir değerlendirici tarafından analiz edilmek üzere görüntü analiz yazılımı (MCID; Imaging Research, Saint Catherines, Ontario, Kanada) kullanılarak değerlendirilmiştir (Whalen vd., 1999). Kısaca, alınan kesitteki ipsilateral hemisfer alanı, kontralateral hemisfer alanından çıkarılmış, sonra bu alana bölünerek hemisferik doku kaybı hesaplanmış ve kesitlerin alan ortalamaları alınarak, kesit toplam uzunluğu ile çarpılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen değer hacim olarak rapor edilmiştir.

İstatiksel analiz

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 10, OriginPro 2023b (OriginLab) ve SIMCA 18 (UMETRICS) yazılımları kullanılarak yapılmıştır. Tüm veriler, ortalama $\pm$ standart sapma ile sunulmuş olup, sadece Morris su testinin gizli platform alt testi ortalama $\pm$ standart hata

olarak verilmiştir. Tüm çalışmalarda, gruplara önce Grubbs'ın outlier testi, ardından Shapiro-Wilk normalite testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki lipid miktar değişimi ve diğer ilişkiler, dağılım normalse parametrik testler (1 yönlü ANOVA veya Student t testleri) kullanılarak, dağılım normal değilse non-parametrik testlerle (Kruskal-Wallis veya Mann-Whitney U testleri) karşılaştırılmıştır. Lipid türlerinin bireysel olarak gruplar arası değişimini göstermek için heatmap seçilmiş olup, Average Linkage-Pearson analizi ve Z skoru kullanılmıştır (heatmapper.ca). Aynı grubun farklı zamanlarda yapılan davranış çalışmalarının analizlerinde ise parametrik bir test olan Tekrarlı Ölçümler için ANOVA kullanılmıştır. ANOVA testleri sonrasında çoklu karşılaştırma analizi olarak Bonferroni testi seçilmiş olup, düzeltilmiş p değeri rapor edilmiştir. Normal dağılıma sahip olmayan tekrarlı ölçümlü grupların ikili analizlerinde, bağımlı gruplarda çoklu Wilcoxon testi, bağımsız gruplarda ise çoklu Mann-Whitney U testi kullanılmış ve düzeltilmiş p değeri rapor edilmiştir. Gruplar arasındaki farkı sağlayan lipid çeşitlerini tanımlayabilmek için Ortogonal Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (OPLS-DA) uygulanmış ve Prediktif Değişken Önem Noktası (VIPpred) analizi yapılmıştır. p değeri 0.05'ten küçük ise anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

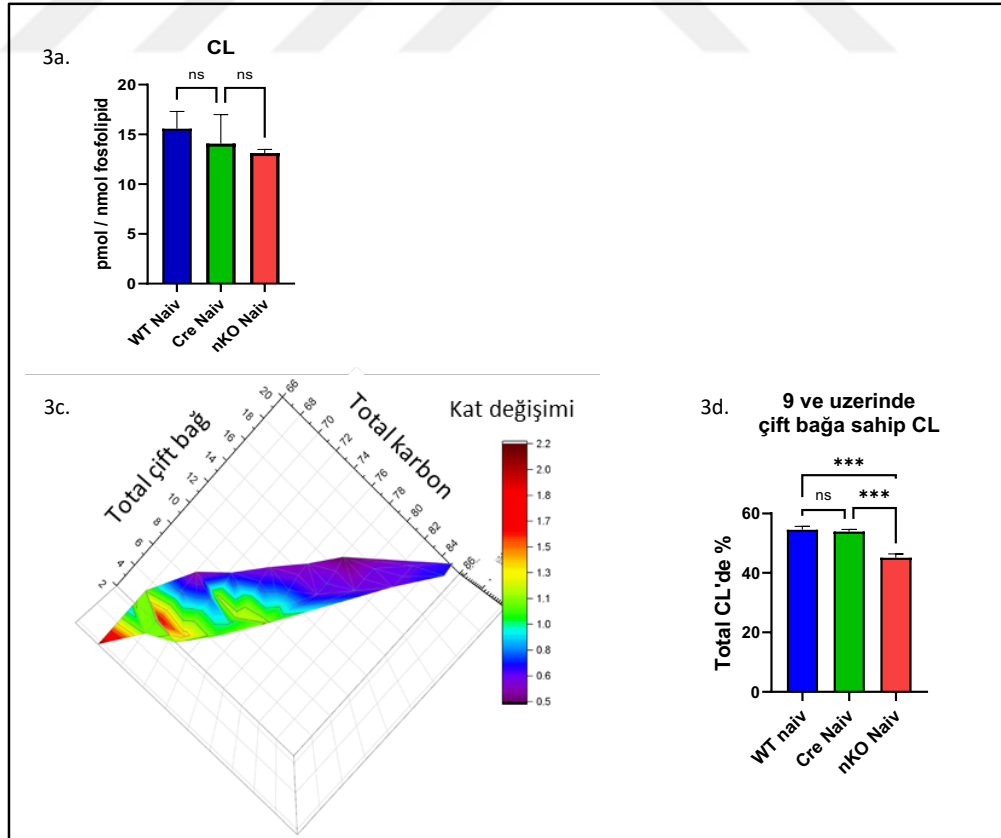
Beyinde nöronal Tafazzin eksikliğinde gözlenen fosfolipidom değişikliklerinin incelenmesi

1. Kardiyolipidomun Değerlendirilmesi

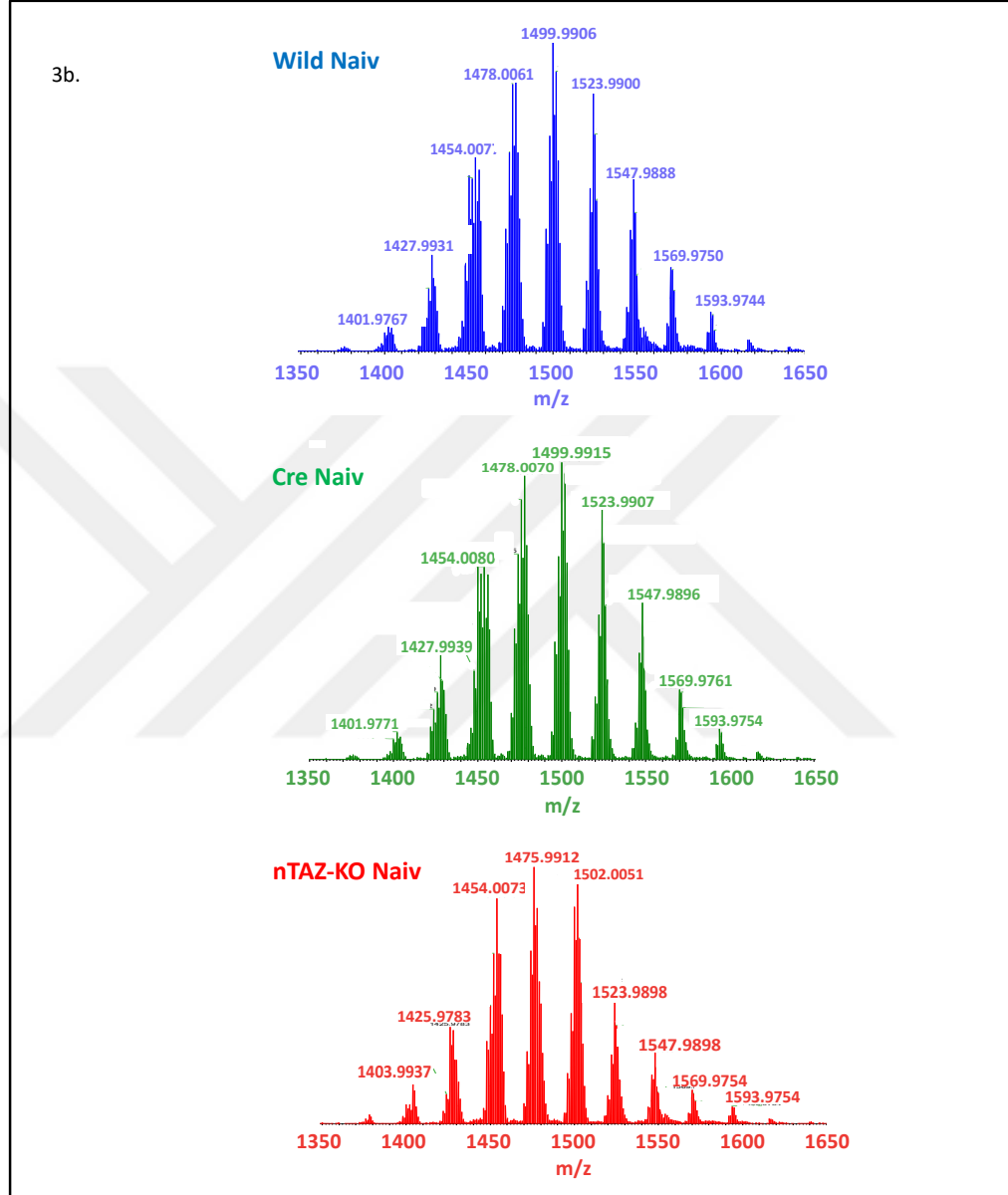
Lipidomiks çalışmalarına naiv normal (WT), naiv Cre taşıyıcı ve naiv nTAZ-KO olan fareler alınmış olup sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

WT naiv fare korteksinde toplamda 46 adet farklı ana CL türü tanımladık. Tüm türlere bakıldığında bunların sadece 4 tanesi yüzde yüz oranında PUFA içermeyen CL'den oluştuğunu gördük.

Lipidomiks analizinde, farelerden alınan kortekste toplam kardiyolipin miktarında WT, Cre taşıyıcı ve nTAZ-KO hayvanları arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemekle (Şekil 3a) birlikte, spektrumda daha yüksek kütleli ve çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeren kardiyolipin çeşitleri KO grupta azalmıştır (Şekil 3b). Spektrumla uyumlu olarak, nTAZ-KO grubunda özellikle 9 ve üzerinde çift bağ taşıyan kardiyolipinlerde istatistiksel olarak belirgin



azalma gözlemledik (Şekil 3c, 3d). Tüm bu analizlerde, normal genom taşıyan farelerle Cre taşıyıcı fareler arasında bir fark tespit etmedik.

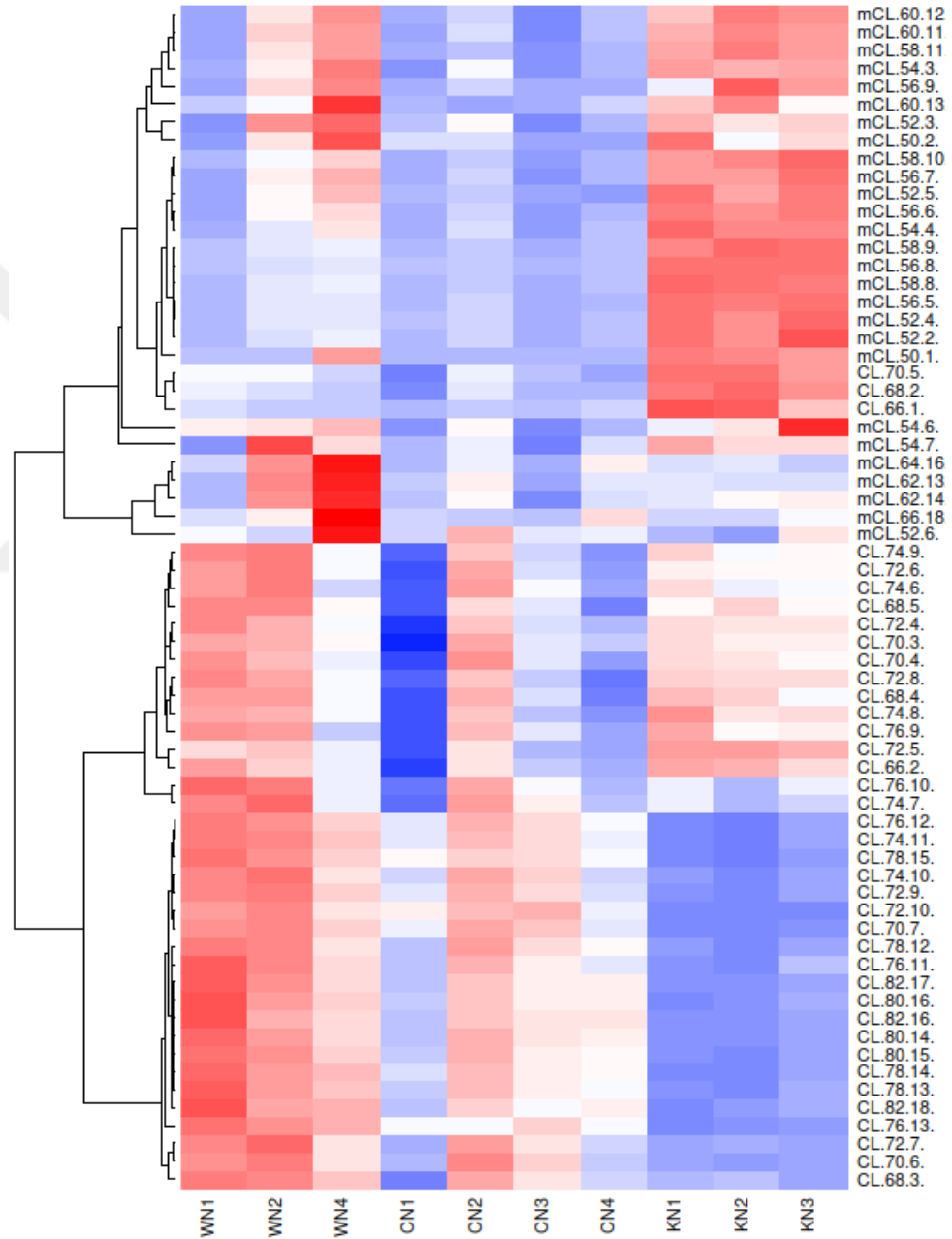
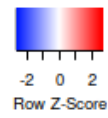


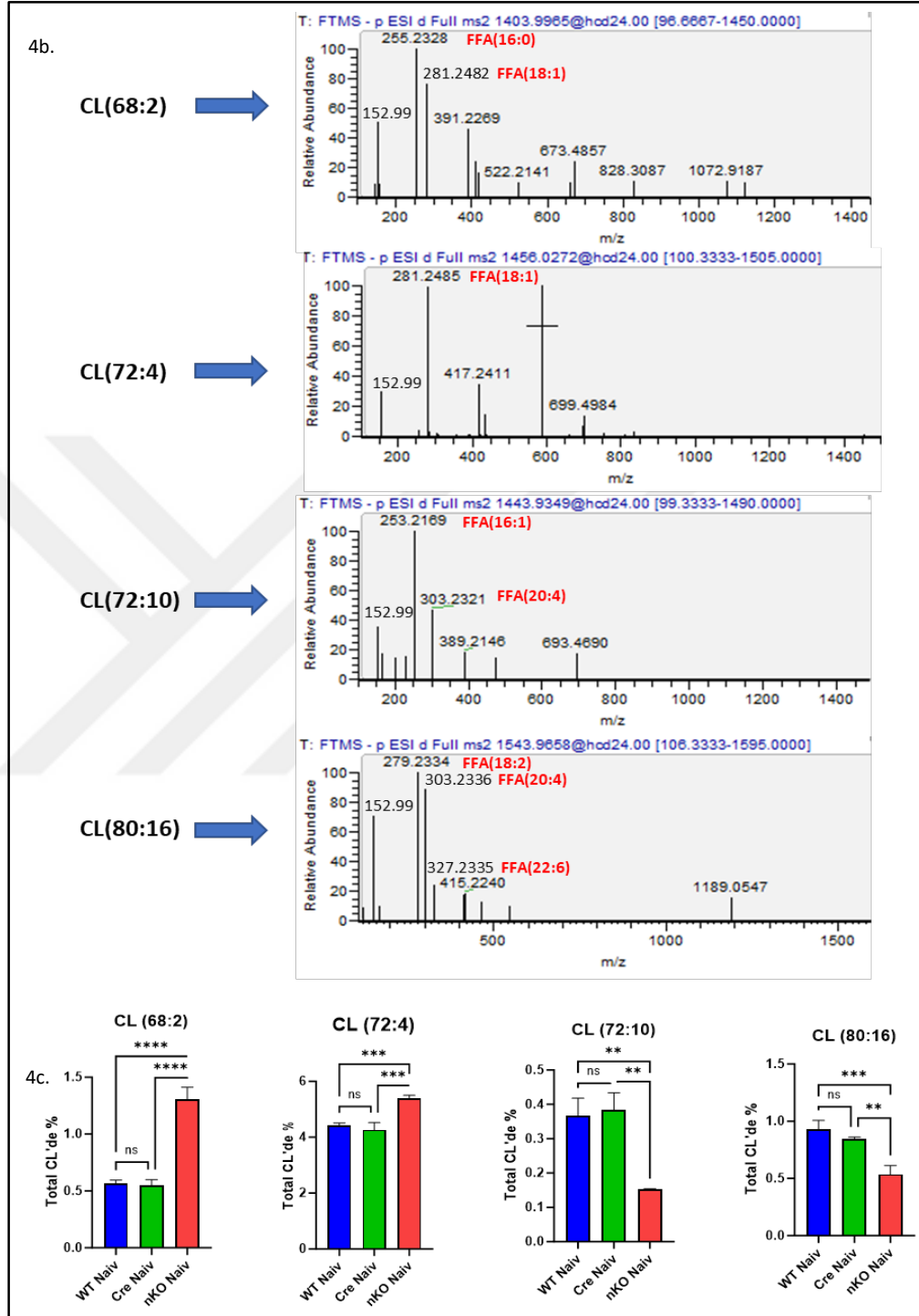
Şekil 3. Naiv hayvan gruplarında kardiyolipin miktarı. a. WT, Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin korteksindeki kardiyolipin miktarının karşılaştırılması (pmol/nmol fosfolipit). b. Kardiyolipin dağılımının kütle spektrumunda gösterilmesi. Spektrumdaki kardiyolipinom, iki örnek karşılaştırılması yapılabilmesi için internal standart maksimum yoğunluğa sahip olacak şekilde standardize edilmiştir. Kardiyolipinom görünümünü göstermek için temsilen 3 gruptan 1'er örnek rastgele olarak seçilmiştir. c. Tüm kardiyolipin çeşitlerinin nTAZ-KO farelerde Cre-Car farelere göre değişimi. Total çift bağ ve total karbon sayısı verilmiş olup kat değişimi renk ile ifade edilmiştir. d. Dokuz ve üzerinde çift bağa sahip olan kardiyolipin miktarlarının gruplar arası karşılaştırılması (pmol/nmol fosfolipit). (* $p < 0.05$, ANOVA, Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi, ortalama $\pm$ standart sapma, $n=3-4$ /grup)

Tespit edilen tüm kardiyolipinler Şekil 4a’da gruplar arasındaki miktarlarının değişimi gösterildi. Bu CL’lerden her biri kendi içinde farklı kompozisyonlara sahip çeşitli izomerlerden oluşabilirler. Uzun zincirli PUFA içeren CL’lerin kesin olarak etkilendiğini gösterebilmek için MS2 analizlerine bakıldı ve tüm açıl zincir kompozisyonları incelendi.

MS2 analizlerinde pür veya püre yakın kardiyolipinler, başka bir deyişle, sadece tek tip yağ asidi kompozisyonu olan kardiyolipinler tespit edildi. Bunların öncelikle kompozisyonları analiz edilerek CL(68:2) nin CL(16:0/ 18:1/ 16:0/ 18:1); CL(72:4)’ün CL(18:1/ 18:1/ 18:1/ 18:1); CL(80:16) ‘nın (16:0/ 22:6/ 20:4/ 22:6) ve CL(72:10)’un (16:1/ 20:4/ 16:1/ 20:4) kompozisyonunda olduğu gösterildi (Şekil 4b). Bu CL çeşitlerinin analizleri yapıldığında kontrol gruplarına göre CL(68:2) ve CL(72:4)’ün nTAZ-KO hayvanlarda arttığı; buna karşılık CL(72:10) ve CL(80:16) çeşitlerinin belirgin olarak azaldığı bulundu (Şekil 4c).

4a.

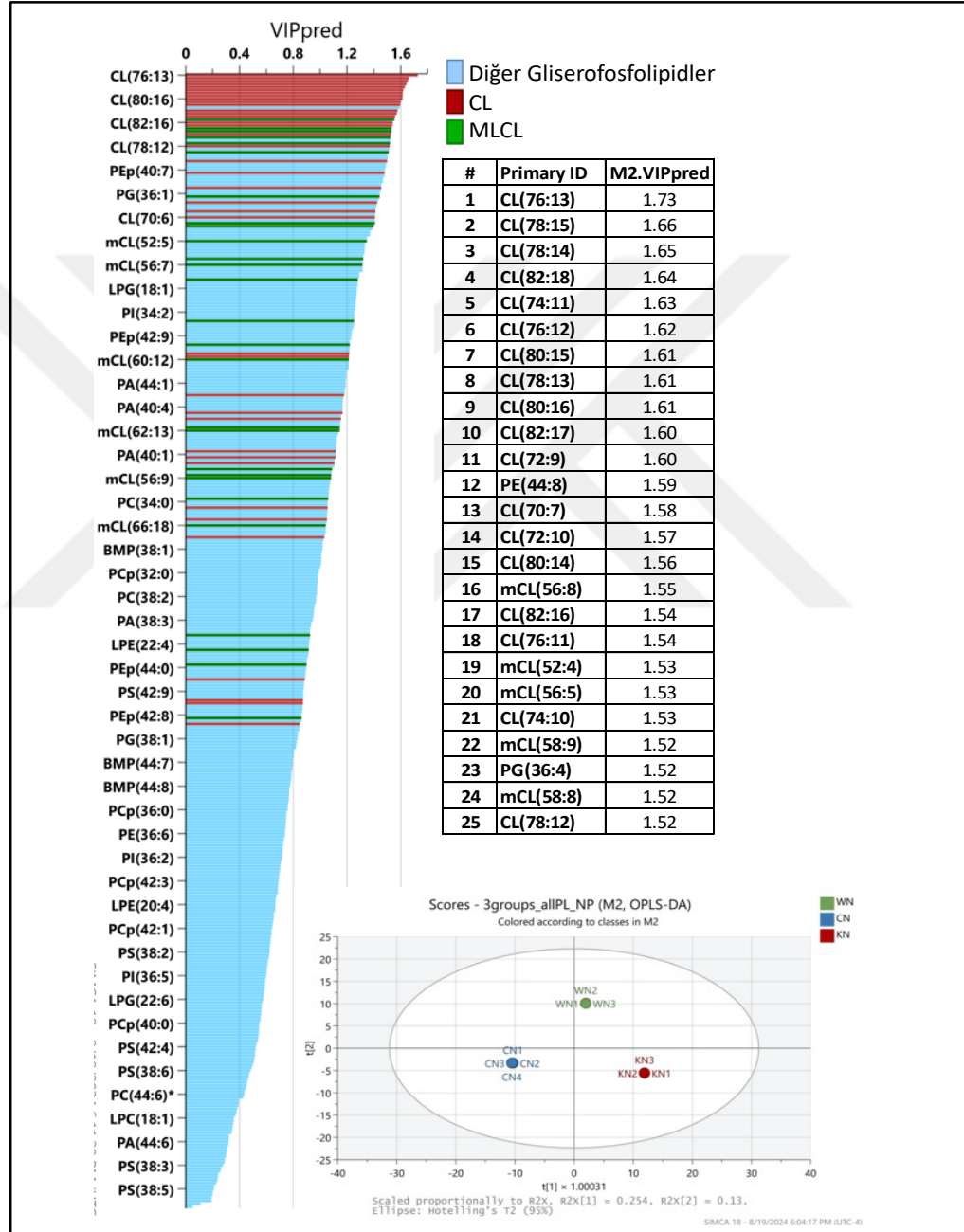




Şekil 4. Naiv hayvan gruplarında kardiyolipin türleri ve ve temsili CL'lerin MS2'daki fragmentasyonları a. MLCL ve CL türlerinin miktarlarının (pmol/nmol fosfolipit) gruplar arası değişimlerinin Z skoru heatmap'te gösterimi (Avarage linkage-Pearson testi). b. CL(68:2), CL(72:4), CL(80:16) ve CL(72:10)'un MS2 fragmentasyonunun gösterilmesi. c. CL(68:2), CL(72:4), CL(80:16) ve CL(72:10)'un gruplardaki miktarlarının gösterilmesi (* $p < 0.05$, ANOVA, Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi, ortalama±standart sapma, $n = 3-4$ /grup)

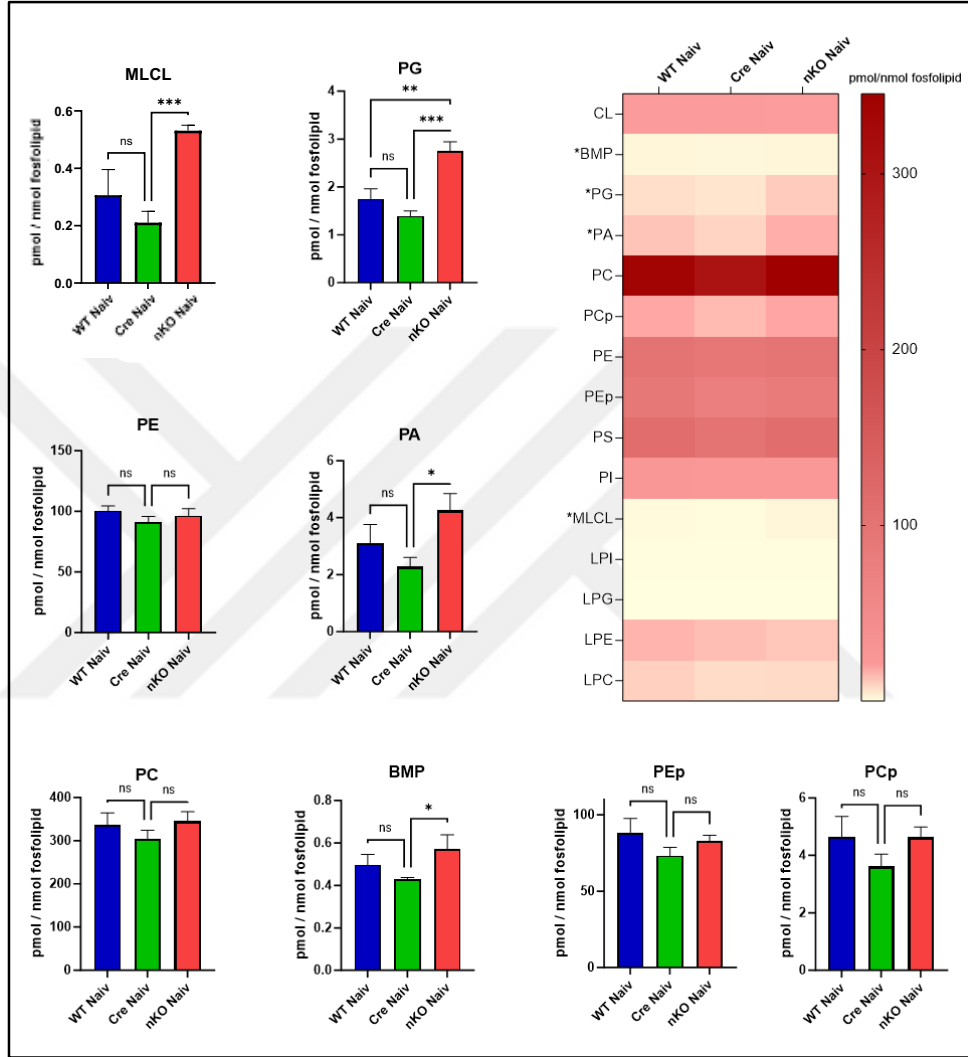
2. CL Dışındaki Diğer Gliserofosfolipit Çeşitlerinin Değerlendirilmesi

Tüm nötral fosfolipit grupları ele alındığında, yapılan OPLS-DA analizinde VIP_{pred} değeri en yüksek 25 fosfolipitin 14'ü PUFA-CL türlerinden, 6'sı MLCL türlerinden olmuştur (Şekil 5).



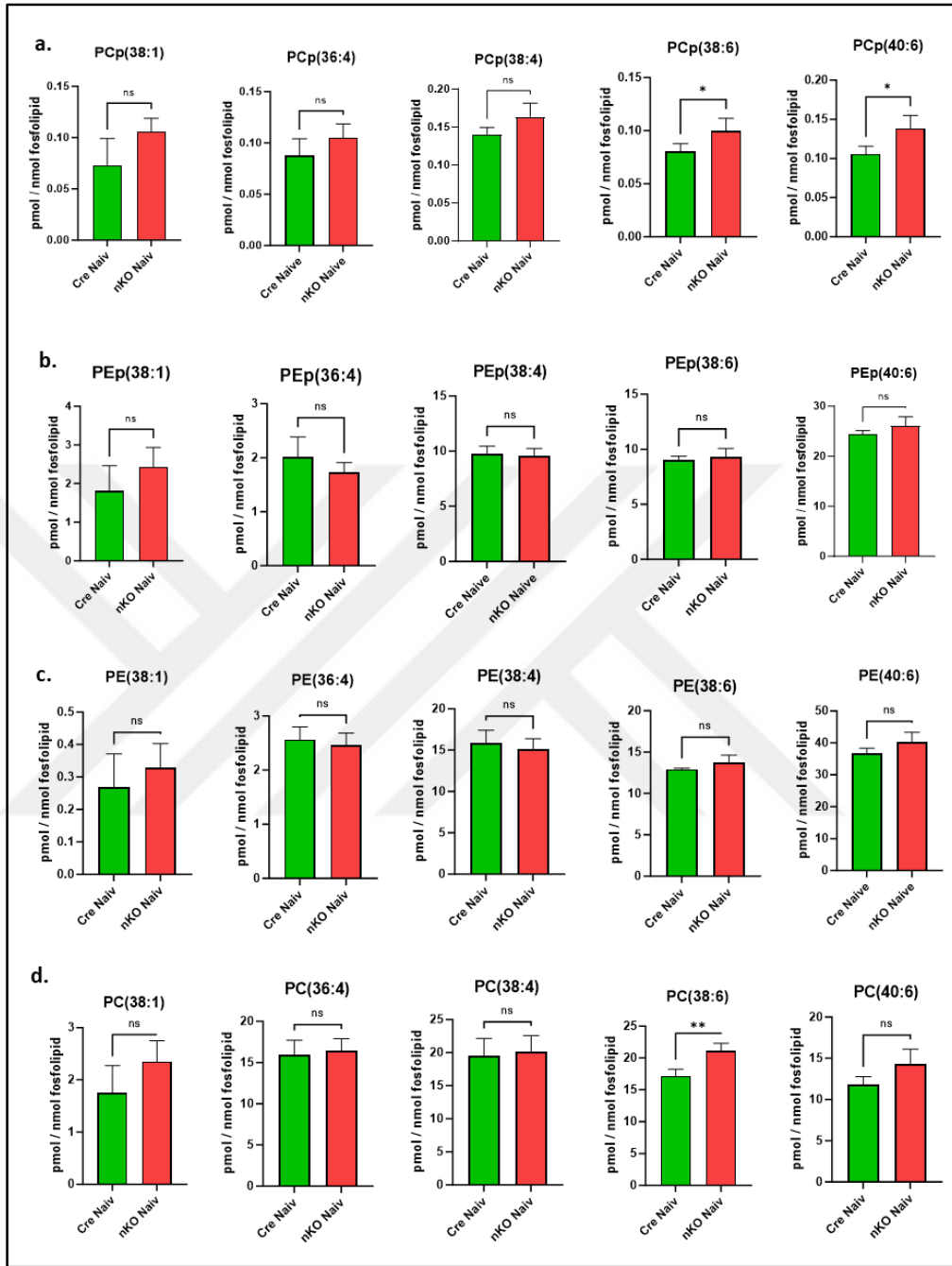
Şekil 5. Naiv hayvan gruplarında tüm fosfolipitlerin OPLS-DA analizi ve VIP_{pred} değerlerinin gösterilmesi (R2X:0.961, R2Y:1, Q2:0.697). Grafiğe LC/MS'te tüm tespit edilen nötral gliserofosfolipitler dahil edilmiş olup, tabloda en yüksek 25 VIP_{pred} değerine sahip olan fosfolipitler sıralanmıştır.

nTAZ-KO fare beyinlerinde, kontrol gruplarına göre PG, PA, BMP ve MLCL artarken PE, PC, PE plasmalojen (PEp) ve PC plasmalojen (PCp) türlerinde istatistiksel bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4a, 6).



Şekil 6. Naiv hayvan gruplarında matür kardiolipin dışındaki MLCL ile diğer fosfolipitlerin miktarı ve karşılaştırılması. WT, Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin kortekslerindeki PG, PA, BMP, MLCL, PE, PC, PEp ve PCp miktarı karşılaştırılmıştır. HeatMap'te fosfolipid miktarı renk ile kodlanmıştır (pmol/nmol fosfolipit, * $p < 0.05$, ANOVA, Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi, ortalama±standart sapma, $n=3-4$ /grup).

Gliserofosfolipidlerden PE, PEp, PC, PCp türlerinin bazı üyelerine bakıldığında özellikle FFA(22:6) gibi PUFA taşıyan PC ve PCp türlerinde artış olduğu görülmüştür (Şekil 7).

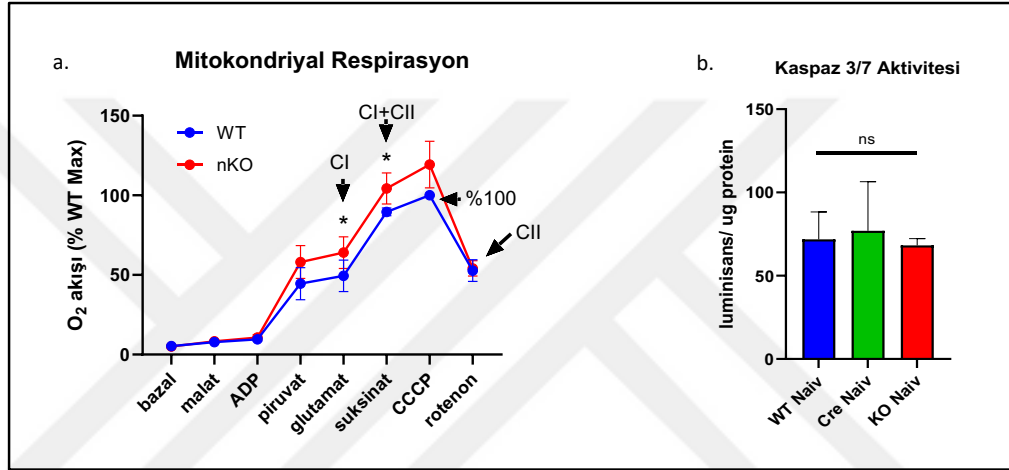


Şekil 7. Naiv hayvan gruplarında fosfolipit türlerine ait bazı üyelerin miktarı ve karşılaştırılması. Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin korteksindeki PEP(38:1), PEP(36:4), PEP(38:4), PEP(38:6), PEP(40:6), PE(38:1), PE(36:4), PE(38:4), PE(38:6), PE(40:6), PCp(38:1), PCp(36:4), PCp(38:4), PCp(38:6), PCp(40:6), PC(38:1), PC(36:4), PC(38:4), PC(38:6) ve PC(40:6) miktarları karşılaştırılmıştır. (pmol/nmol fosfolipit, * $p < 0.05$, t test, ortalama±standart sapma, $n = 3-4$ /grup).

3. Mitokondriyal Respirasyonun ve Apoptozisin Değerlendirilmesi

Cre taşıyıcı ve nTAZ-KO farelerde kardiyolipinomda bir farklılık görülmemesi sebebiyle analiz WT ve nTAZ-KO gruplarında yapılmıştır. nTAZ-KO hayvan beyinlerinde kompleks I aktivitesinde artış görülmüş olup; bazal veya maksimum respirasyon ile kompleks II aktivitesinde değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 8a).

Apoptozisin değerlendirilmesinde normal, Cre taşıyıcı ve nTAZ-KO olan fareler alınmış olup gruplar arasında kaspaz 3/7 aktivitesi açısından farklılık bulunmamıştır (Şekil 8b).

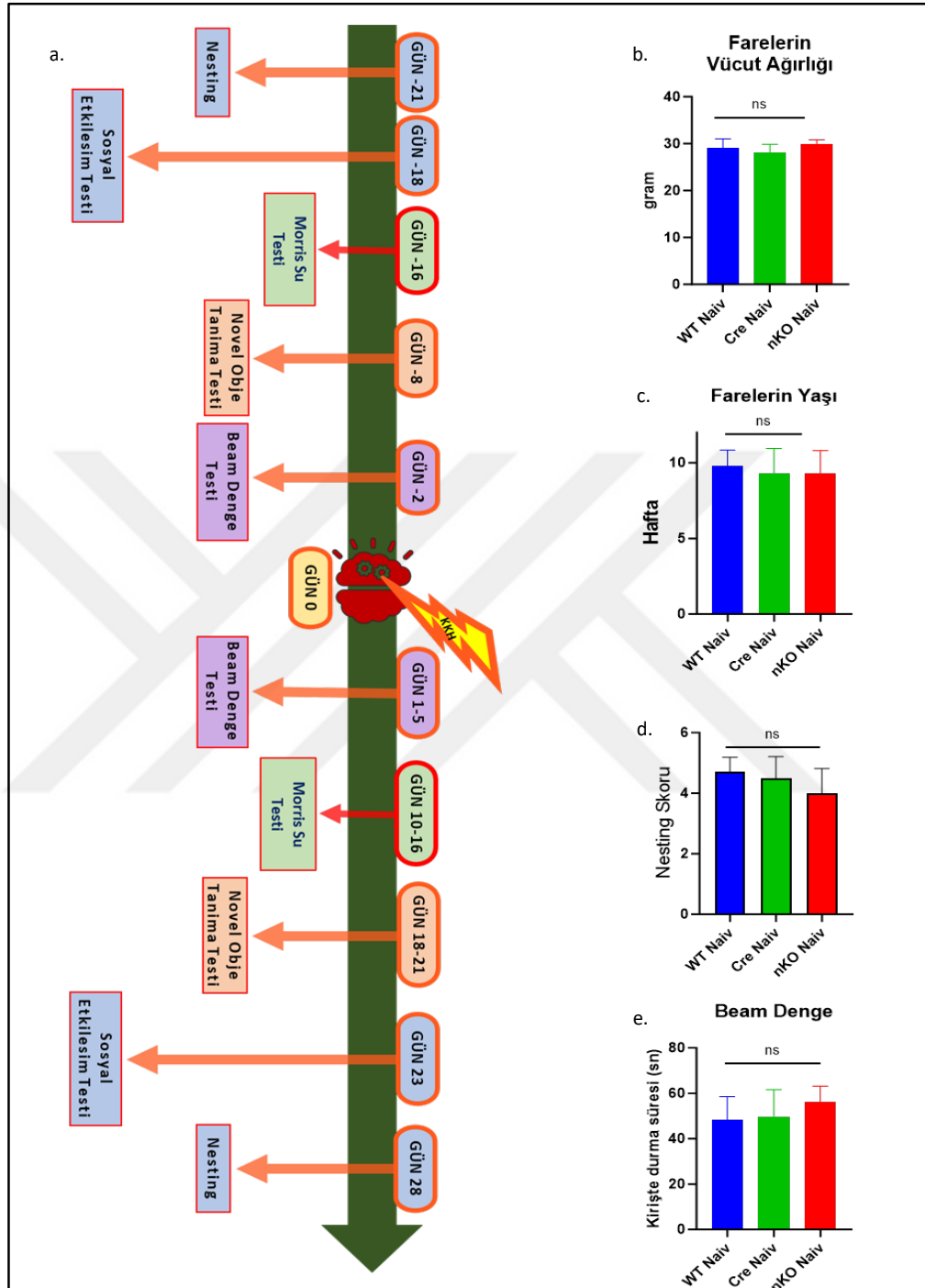


Şekil 8. Naiv hayvanların serebral korteksinde mitokondriyal respirasyonun ve apoptozisin ölçümü. a. Sağ serebral kortekste mitokondriyal respirasyonun O₂ akışı ile normal grup farelere göre ölçümü. (CI: kompleks 1, CII: kompleks 2) (*p<0.05, t-test, Ortalama±standart sapma, n=5/grup). b. Kaspaz 3/7 aktivitesinin kortekte gösterilmesi (*p<0.05, ortalama±standart sapma, ANOVA, Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi, n=4/grup).

4. Farelerde Davranışsal ve Kognitif Sürecin Değerlendirilmesi

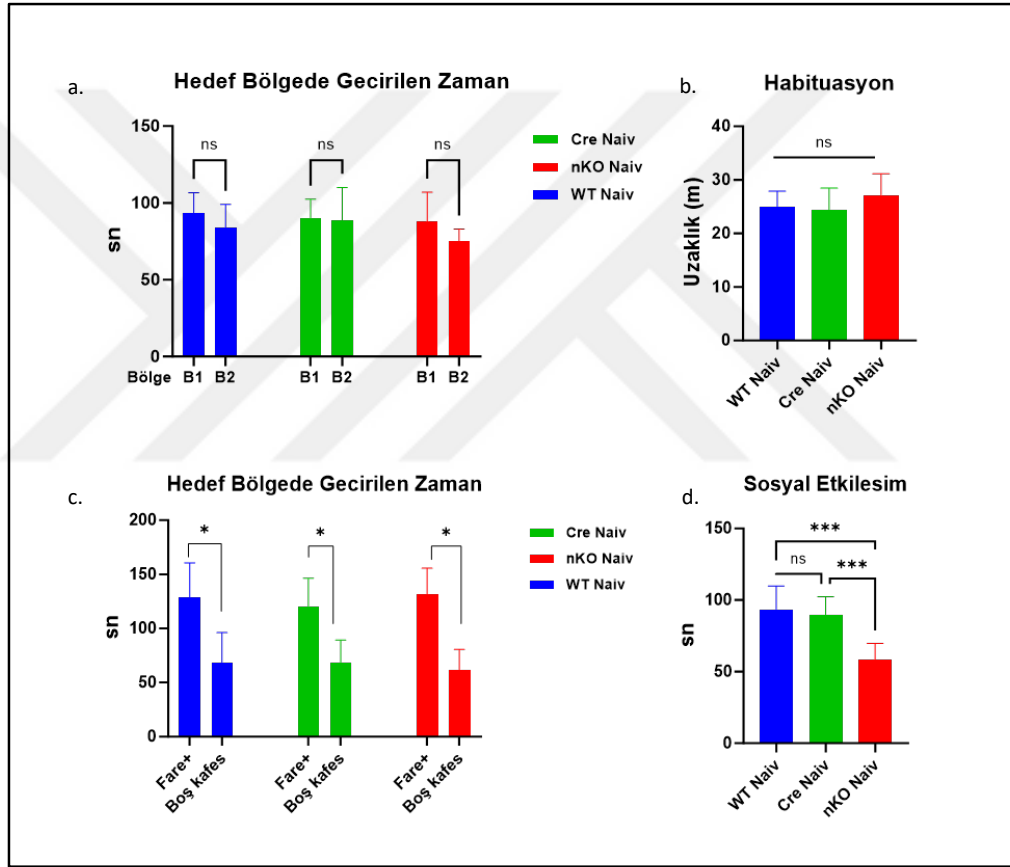
Davranış çalışmalarına naiv normal, naiv Cre taşıyıcı ve nTAZ-KO olan fareler alınmış olup, tüm farelere aşağıdaki testler gruplara-kör üç çalışmacı tarafından uygulanmıştır: nesting, sosyal etkileşim, Morris su testi, yeni obje tanıma ve beam denge testleridir. Bu testlerin tümüne her üç gruptan da 10 fare dahil edilmiştir. Davranışsal çalışmaların zamansal olarak nasıl uygulandığı şekilde gösterilmiştir (Şekil 9a). Sonuçlar aşağıdaki şekilde bulunmuştur:

Davranışsal çalışmalara başlamadan önce hayvanların genel durum değerlendirmesinde, gruplar arasında farelerin kilosu ve yaşı açısından farklılık bulunmamıştır (Şekil 9b,c). Gruplar arasında nesting skorlamasında farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 9d). Beam denge testinde gruplar arasında giriş üzerinde durma sürelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 9e).



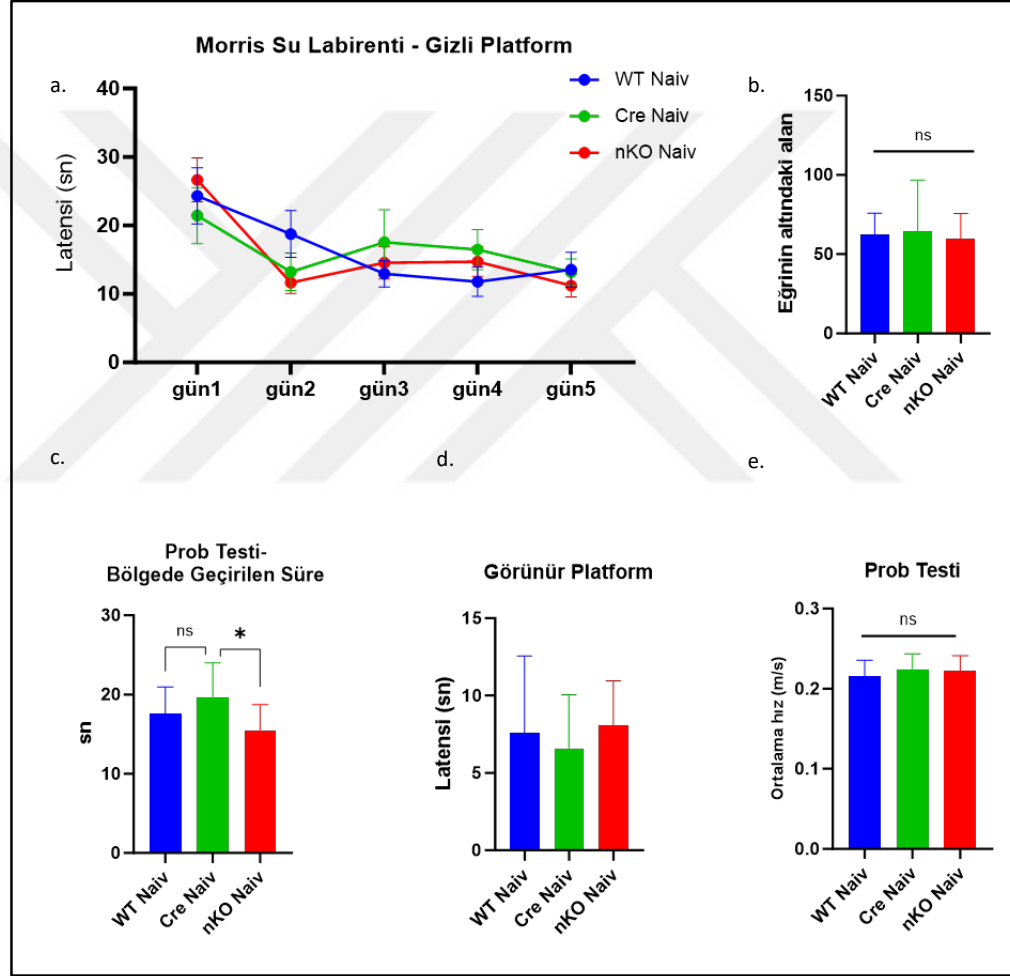
Şekil 9. Kognitif çalışmalarının şematik gösterimi ile Nesting ve Beam denge testinin değerlendirilmesi. a. Tüm kognitif çalışmaların zamansal planlanması. Kognitif çalışmalar KKH öncesi ve sonrası olarak gösterilmiş olup KKH günü, gün 0 olarak alınmıştır. b. Farelerin kognitif çalışma öncesi vücut ağırlıklarının karşılaştırılması (gram). c. Farelerin yaşlarının kognitif çalışmalar öncesi karşılaştırılması (hafta-yaş). d. WT, Cre-Car ve nTAZ-KO farelerde nesting skorlamasının değerlendirilmesi. e. WT, Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin Beam denge testinde giriş üstünde dengede durma sürelerinin karşılaştırılması (* $p < 0.05$, ortalama±standart sapma, ANOVA, Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi, $n=10$ /grup).

Sosyal etkileşim testinde 3 gruba ait hayvanlarda da habitasyon testinde farenin bir alanı diğer alana göre seçtiği görüldüyse, bu hayvanlar bu çalışmanın ileri değerlendirilmesine alınmamıştır (Şekil 10a). Habitasyon süresince farelerin aldığı yol eşit olarak görülmüştür (Şekil 10b). Bununla birlikte, sosyal etkileşim testinde tüm gruplarda hedef farenin olduğu kafesin çevresinde boş kafese göre daha çok vakit geçirdiği gözlenmiştir (Şekil 10c). Fakat bu hayvanların birbiriyle koklaşma süresine bakıldığında nTAZ-KO hayvanlarda belirgin azalma saptanmıştır (Şekil 10d).



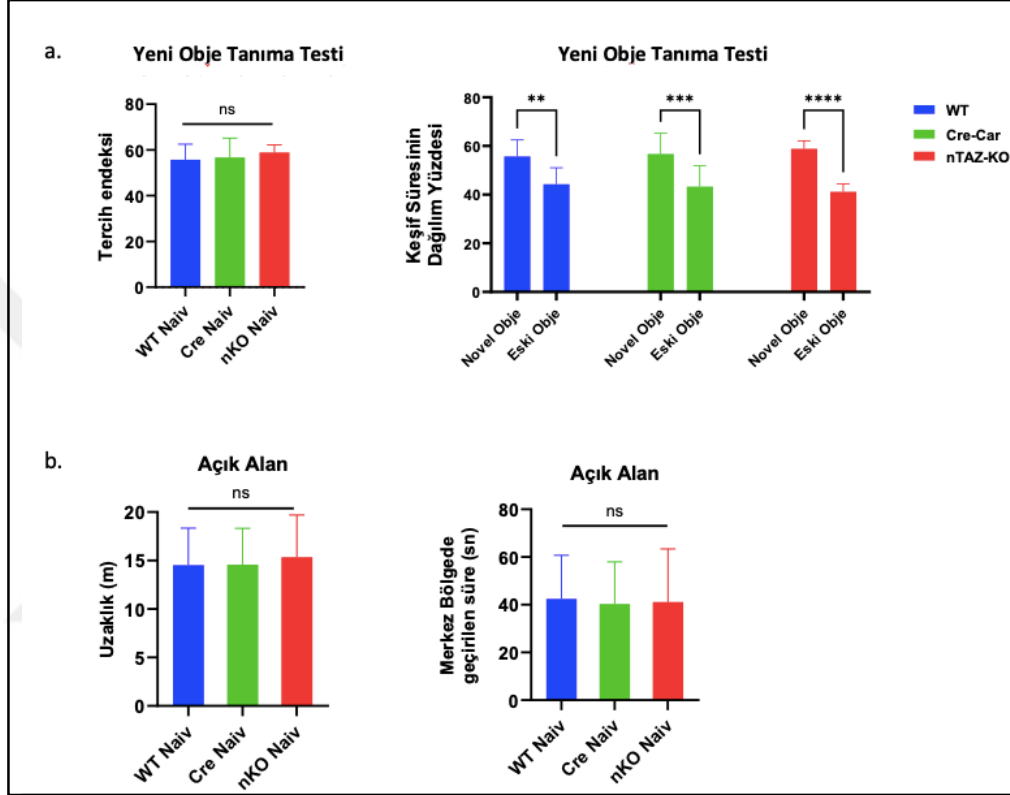
Şekil 10. Sosyal etkileşim testinin naiv hayvanlarda değerlendirilmesi. a. Yabancı farelerin konacakları kafes ile boş kafes etrafında geçirilen süre b. Habitasyon testinde farelerin yürüdükleri toplam süre c. Yabancı farenin çevresinde geçirilen süre ile boş kafesin çevresinde geçirilen süre. d. Yabancı fare ile etkileşim süresi (* $p < 0.05$, ortalama±standart sapma, ANOVA ve çoklu eşleştirilmiş t testi, düzeltilmiş p değeri rapor edilmiştir, ortalama±standart sapma, $n=8$ /grup)

Morris su labirenti testinin saklı platform testinde 3 grup arasında öğrenme açısından istatistiksel açıdan farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 11a,b). Prob testinde ise hafıza ölçülmüş olup, nTAZ-KO grubunda saklı platform testinde platformun olduğu bölgede geçirilen süre daha az görülmüştür (Şekil 11c). Görünür platform testinde ise farelerin görme ve kas aktiviteleri değerlendirilmiş olup platforma ulaşma sürelerinde farklılık bulunmamıştır (Şekil 11d). Farelerin yüzme hızı değerlendirildiğinde gruplar arasında yine farklılık olmadığı görülmüştür (Şekil 11e).



Şekil 11. Morris su labirenti testinin naiv hayvanlarda değerlendirilmesi. a,b. Saklı platform testinde farelerin havuza bırakıldıktan sonra platforma ulaşma süresi ve eğri altında kalan alanın karşılaştırması (Ortalama±standart hata, n=10/grup). c. Prob testinde hedef bölgede geçirilen süre. d. Görünür platform testinde farelerin platformu bulma süresi. e. Prob testinde farelerin yüzme hızları (* $p < 0.05$, ortalama±standart sapma, ANOVA-Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi veya Kruskal Wallis- Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi, n=10/grup).

Yeni obje tanıma testinde, her üç gruptaki hayvanlar da yeni objeyle ilgilenmeye daha fazla eğilim göstermesine rağmen istatistiksel açıdan gruplar arası obje seçiminde farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 12a). Ayrıca açık alan testinde, farelerin hareket mesafesi ve merkez alanda zaman geçirme açısından da gruplar benzer sonuçlar vermektedir (Şekil 12b).



Şekil 12. Yeni obje tanıma testinin naiv hayvanlarda değerlendirilmesi. a. Yeni obje tanıma testinde yeni obje tercih indeksinin ve keşif süresinin dağılımının incelenmesi. b. Açık alan testinde farelerin aldığı mesafe ile merkez bölgede geçirilen sürenin değerlendirilmesi. (* $p < 0.05$, ortalama±standart sapma, ANOVA-Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi veya Kruskal Wallis-Dunn'in çoklu karşılaştırma testi, $n=8-9$ /grup).

Nöronal Tafazzin eksikliğinin travmatik beyin hasarı sonrasındaki sürece etkisinin incelenmesi

1. Kardiyoipidomun Değerlendirilmesi

Lipidomiks çalışmalarına KKH'ye maruz kalmış Cre (Cre-KKH) ve KKH'ye maruz kalmış nTAZ-KO (KO-KKH) olan fareler alınmış olup sonuçlar aşağıda belirtilmiştir:

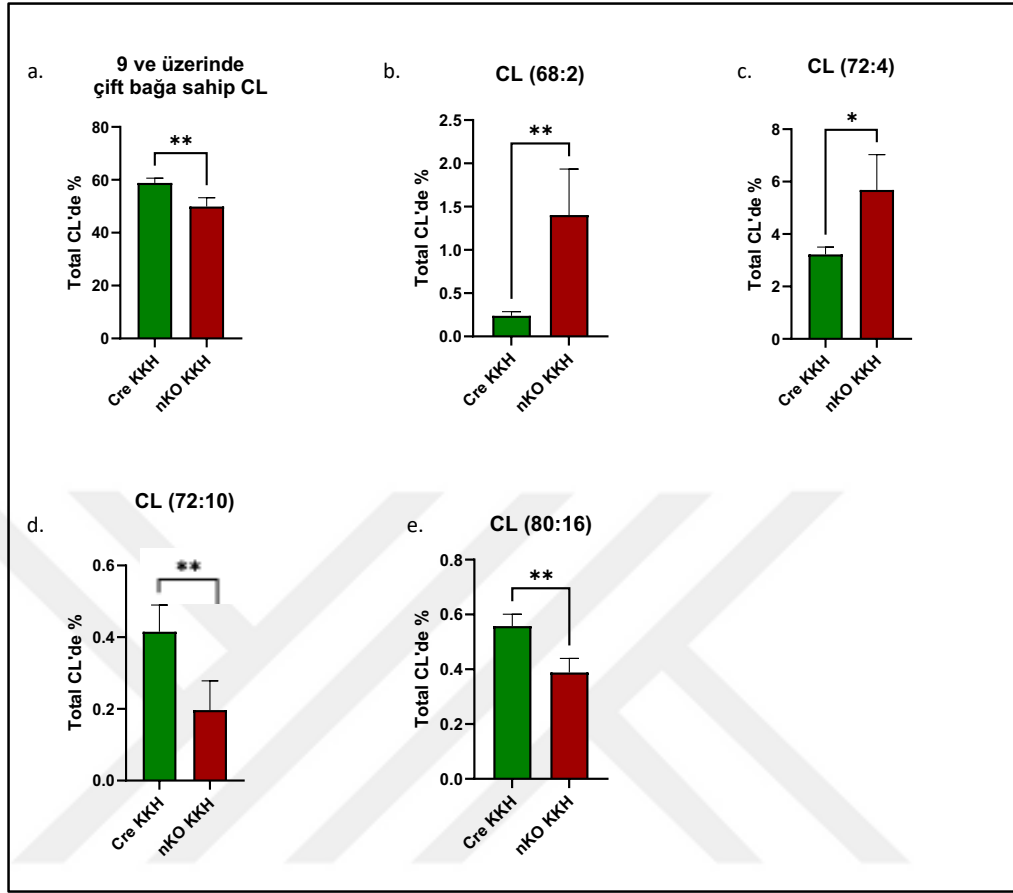
Lipidomiks analizinde, KKH sonrası KO grubunda Cre grubuna göre %25 civarında kardiyoipin miktarında bir azalma tespit edilse de bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 13a).



Şekil 13. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvan gruplarında kardiyolipin miktarı. a. Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin KKH sonrası perikontüzyonel korteksteki kardiyolipin miktarının karşılaştırılması (pmol/nmol fosfolipit) (* $p < 0.05$, ortalama $\pm$ standart sapma, t test, $n=3-4$ /grup).

Ayrıca naiv hayvanlarda da tespit edildiği gibi, KO-KKH farelerde Cre-KKH farelere göre, PUFA-CL'lerde azalma gözlenmektedir (Şekil 14a).

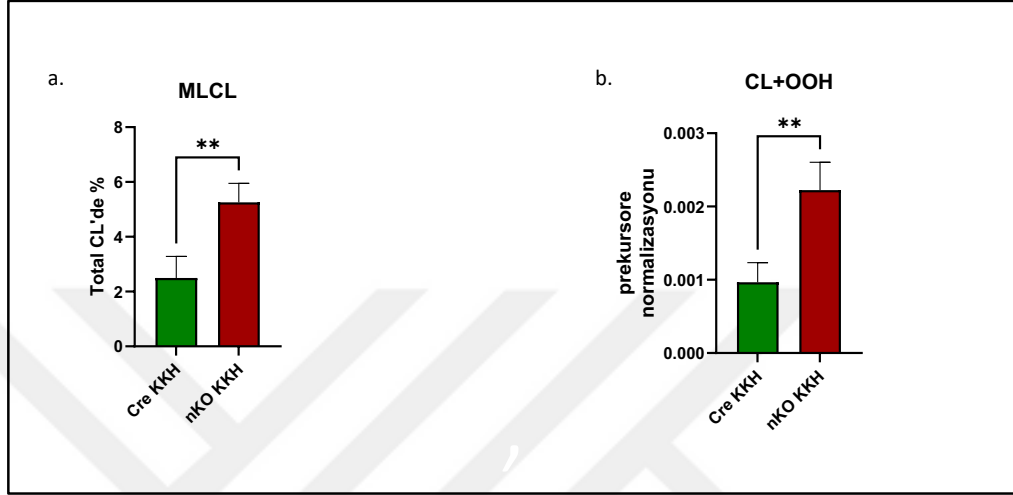
PUFA-CL'lerdeki azalmanın doğruluğunu teyit etmek için MS2 analizleri yapılmıştır. MS2 analizlerinde ise pür veya püre yakın kardiyolipinler tespit edilmiş, bu CL çeşitlerinin analizleri yapıldığında CL(68:2) ve CL(72:4)'ün KKH'ye uğramış nTAZ-KO hayvanlarda arttığı; buna karşılık CL(72:10) ve CL(80:16) çeşitlerinin Cre-KKH grubuna göre belirgin azaldığı saptanmıştır (Şekil 14 b-e).



Şekil 14. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvan gruplarında bazı kardiyolipin türlerinin MS2'daki miktarı. CL(68:2), CL(72:4), CL(80:16) ve CL(72:10)'un gruplardaki miktarlarının gösterilmesi (* $p < 0.05$, ortalama $\pm$ standart sapma, t test, $n=4$ /grup).

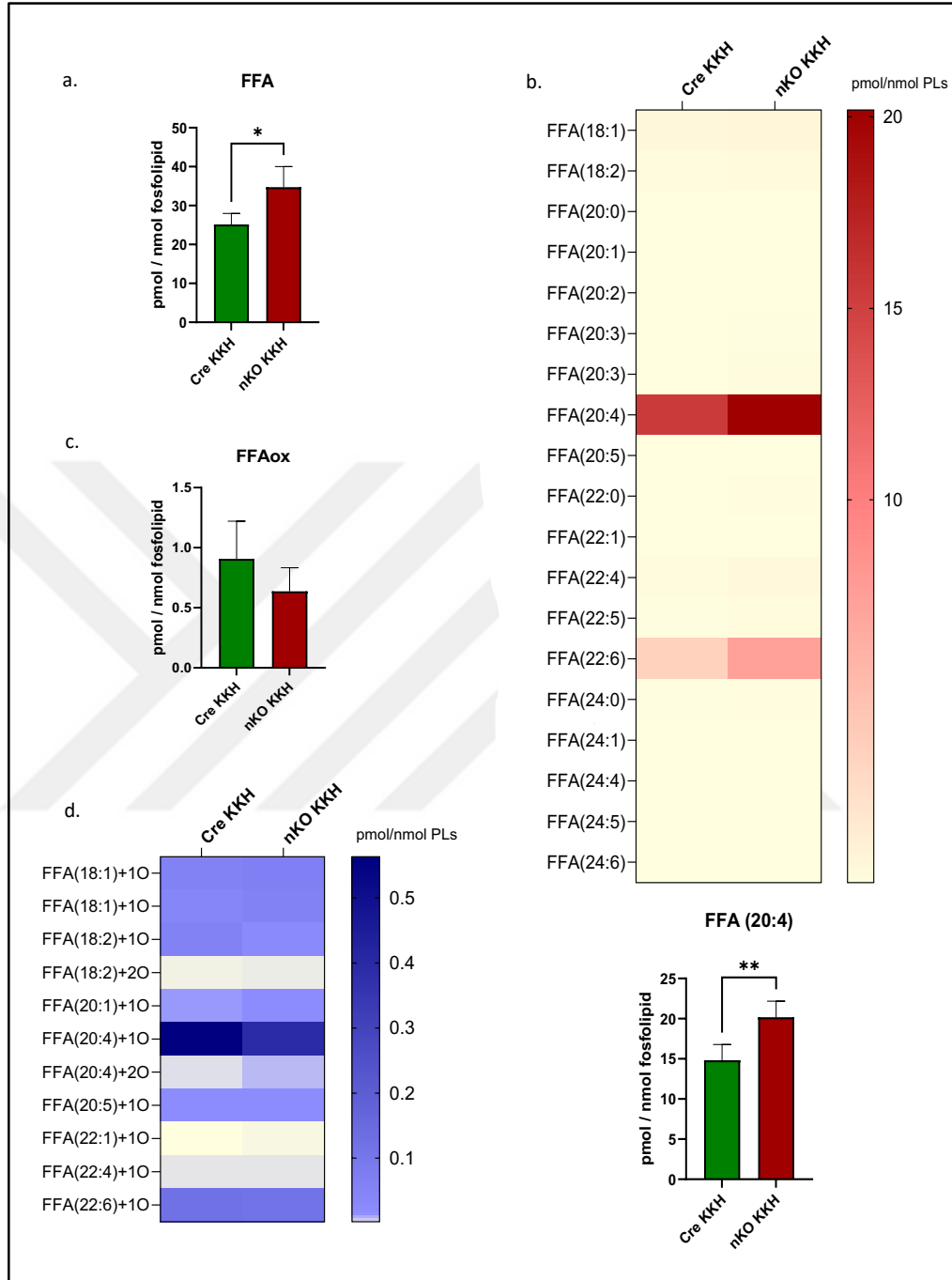
2. MLCL ve Perokside CL Türlerinin Değerlendirilmesi

nTAZ-KO fare beyinlerinde, KKH sonrası Cre farelere göre MLCL’de (Şekil 15a) ve perokside CL’de (Şekil 15b) artış gözlenmiştir.



Şekil 15. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvan gruplarında MLCL ile perokside CL’lerin karşılaştırılması. a. Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin perikontüzyonel korteksindeki MLCL miktarı KKH öncesi ve sonrası karşılaştırılmıştır (pmol/nmol fosfolipit). b. Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin pariyetal korteksindeki perokside CL’nin ana iyona oranı KKH öncesi ve sonrası karşılaştırılmıştır. (* $p < 0.05$, ortalama $\pm$ standart sapma, t test, $n=4$ /grup).

Serbest yağ asit miktarında KO farelerde KKH sonrası yükselme görülürken, bunun temel olarak AA ve DHA kaynaklı olduğu saptanmıştır (Şekil 16a,b). KO-KKH’li hayvanlarda Cre-KKH’li hayvanlara göre AA oranında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir. Okside olmuş yağ asitlerinde KKH sonrası iki genetik grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 16c,d).

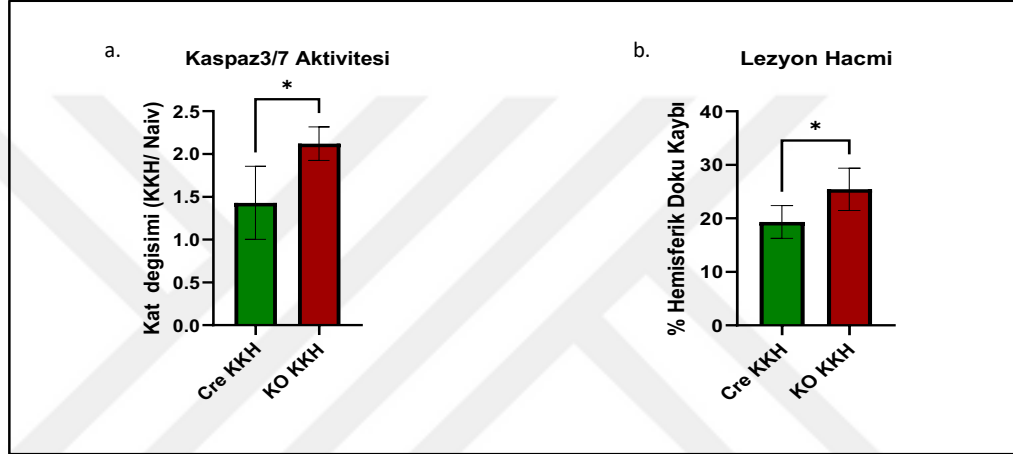


Şekil 16. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvan gruplarında serbest yağ asidi ve okside yağ asitlerinin karşılaştırılması. a,b. Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin korteksindeki total FFA miktarı ve bireysel FFA miktarları KKH öncesi ve sonrası karşılaştırılmıştır. c,d. Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin kortekslerindeki FFAox'lar karşılaştırılmıştır. (pmol/nmol fosfolipit, *p<0.05, ortalama±standart sapma, t test, n=3-4/grup).

3. Apoptozis ve Lezyon Hacminin Değerlendirilmesi

Apoptozis ve lezyon hacminin değerlendirme çalışmalarına Cre-KKH ve KO-KKH fareler alınmıştır. Kaspaz 3/7 aktivitesi KKH sonrası 24. saatte yapılan incelemede KO grupta kontrol gruba göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 17a).

KKH sonrası 31. günde yapılan lezyon volümü incelemesinde, hemisferik lezyon kaybının KO'larda kontrol fare beyinlerine göre yaklaşık olarak %25 daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 17b).

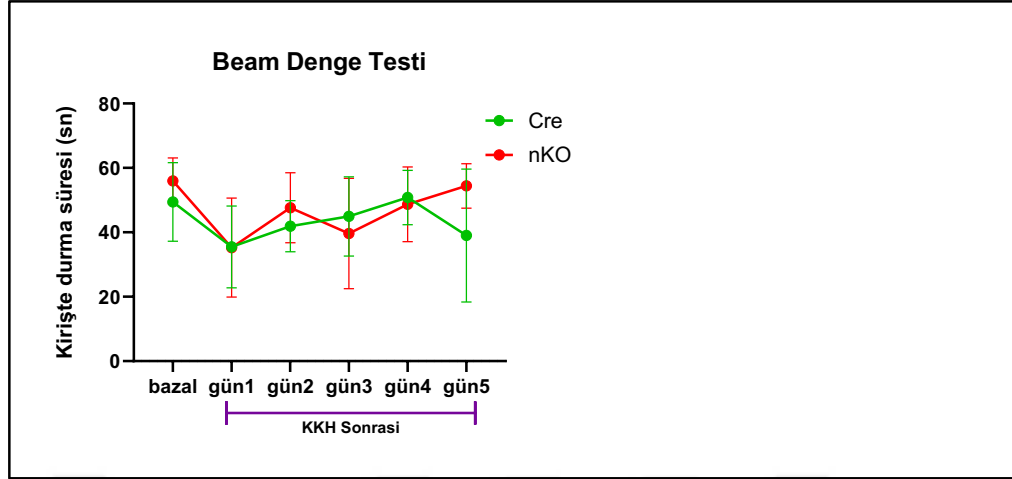


Şekil 17. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda apoptozisin ve lezyon hacminin değerlendirilmesi. a. Perikontüzyonel kortekste KKH sonrası 24. saatteki farelerde kaspaz3/7 aktivitesinin naiv gruplarına göre artışı. b. Kontüzyonel hemisferdeki doku kaybının KKH sonrası 30.günde karşılaştırılması (* $p < 0.05$, t test, ortalama $\pm$ standart sapma, $n = 4-5$ /grup).

4. Hayvanlarda Davranışsal ve Kognitif Sürecin Değerlendirilmesi

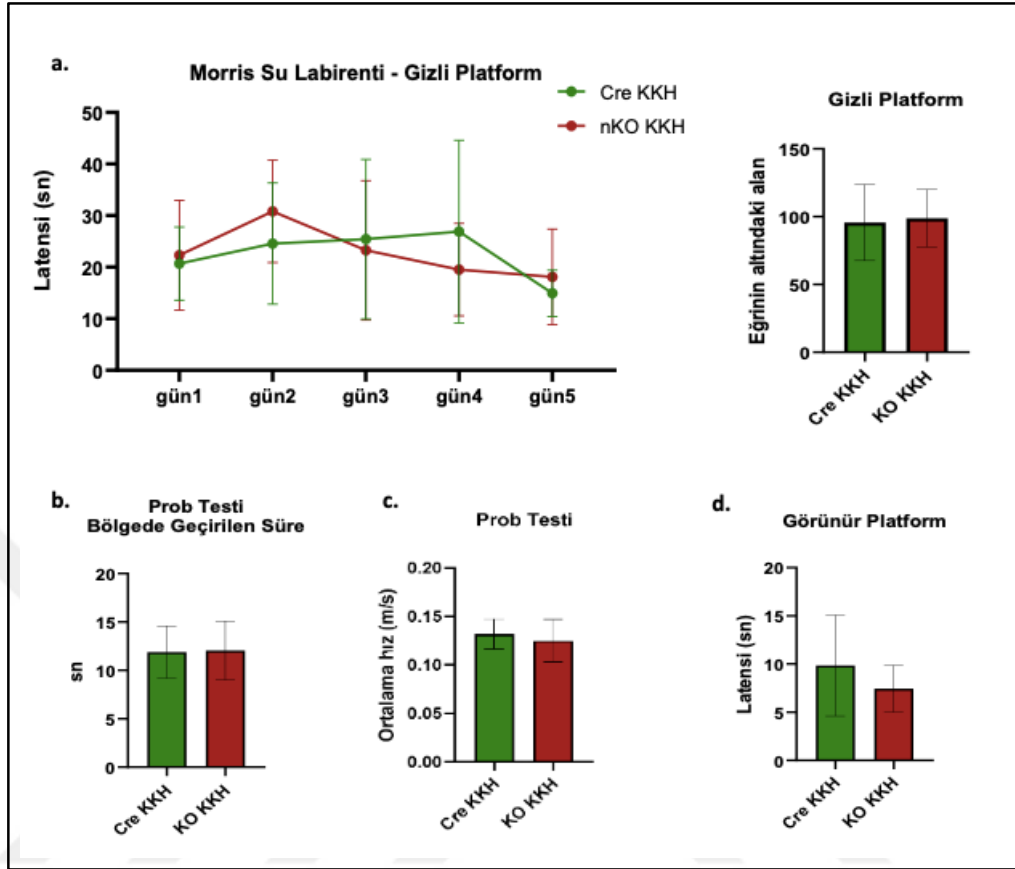
Davranış çalışmalarında yer alan naiv Cre-Car ve nTAZ-KO olan farelere KKH uygulanmış olup, uygulama sonrası testler yeniden tekrarlanmıştır. Bu çalışmalar nesting, sosyal etkileşim, Morris Su Labirenti testi, yeni obje tanıma ve beam denge testleridir. Bu testlerin tümüne her iki gruptan da 10 fare dahil edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki şekilde bulunmuştur:

Beam denge testinde KKH sonrası gruplar arasında beam üzerinde durma sürelerinde farklılık görülmemiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda beam denge testinin değerlendirilmesi. a. Cre-Car ve nTAZ-KO farelerin Beam denge testinde giriş üstünde dengede durma süreleri (* $p < 0.05$, tekrarlayan ölçümlü ANOVA, Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi, ortalama $\pm$ standart sapma, $n=10$ /grup).

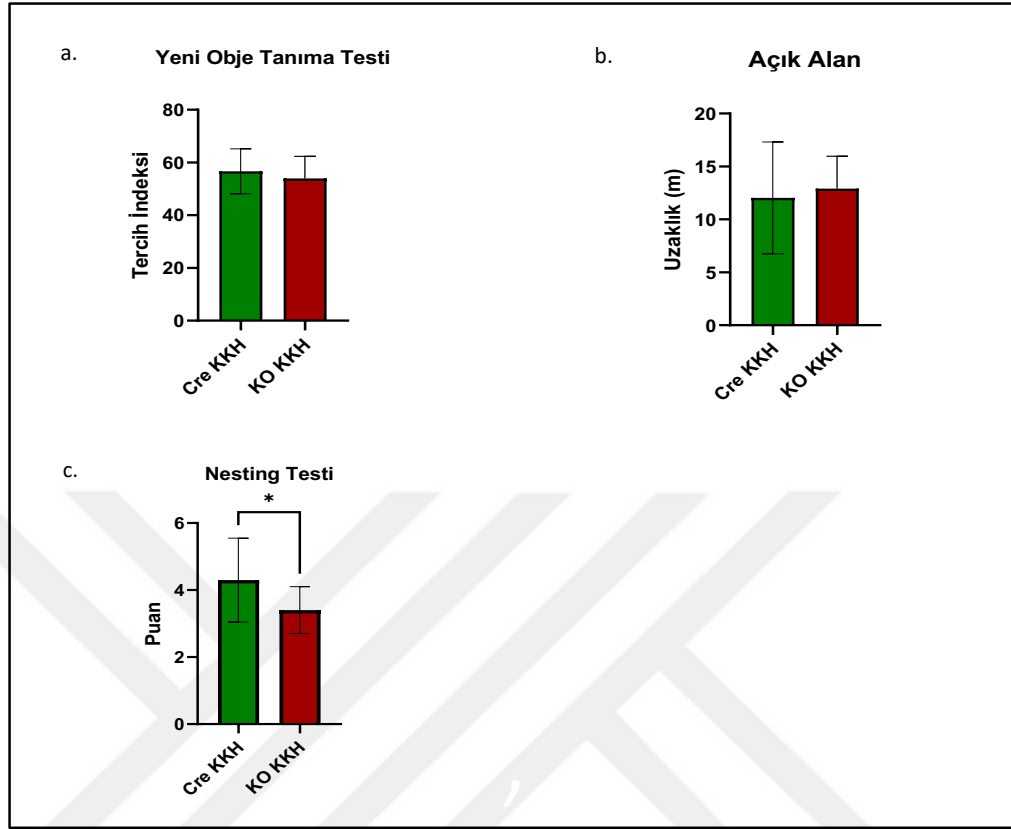
Morris su labirenti testinin saklı platform testinde 2 grup arasında öğrenme açısından istatistiksel açıdan farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 19a). Prob testinde ise yeni öğrenilen bilginin hatırlanması ölçülmüş olup, KKH sonrasında Cre ve KO grubunda platformun olduğu alanda geçirilen sürede ve yüzme hızlarında farklılık görülmemiştir (Şekil 19b,c) Görünür platform testinde, farelerin görme ve kas aktiviteleri değerlendirilmiş olup platforma ulaşma sürelerinde farklılık bulunmamıştır (Şekil 19d).



Şekil 19. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda Morris su labirenti testinin değerlendirilmesi. a. Saklı platform testinde farelerin havuza bırakıldıktan sonra platforma ulaşma süresi (Ortalama±standart hata, n=10/grup). b. Prob testinde hedef bölgede geçirilen süre. c. Prob testinde farelerin ortalama yüzme hızları d. Görünür platform testinde farelerin platformu bulma süresi. (*p<0.05, t test, Ortalama±standart sapma, n=10/grup).

Sosyal etkileşim testinde KKH sonrası her iki grupta da 6-7 farede 1. bölgenin 2. bölgeden daha çok tercih edildiği görülmüştür. Bu nedenle sosyal etkileşim testinin post-KKH sürecinde değerlendirilemeyeceği sonucuna varılmıştır.

Yeni obje tanıma testinde, gruplar arası obje seçiminde ve kat edilen yürüme mesafesinde farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 20a,b). Gruplar arasında nesting testi değerlendirildiğinde ise KKH'ye maruz kalmış KO farelerin öz-bakım puanlarının kontrol grubuna göre düştüğü görülmüştür (Şekil 20c).



Şekil 20. Kontrollü kortikal hasara uğramış hayvanlarda yeni obje tanıma ve nesting testlerinin değerlendirilmesi. a. Yeni obje tanıma testinde yeni obje tercih indeksi. b. Açık alan testinde farelerin aldığı mesafe. c. Cre-Car ve nTAZ-KO farelerde KKH sonrası nesting skorları (* $p < 0.05$, t testi, Ortalama $\pm$ standart sapma, $n = 8-10$ /grup).

TARTIŞMA

Tafazzin, mitokondriyon iç membranında bulunan CL'lerin olgunlaşma sürecinde, dolayısıyla CL açıl zincir kompozisyonunda önemli bir rol oynar. Mitokondriyondaki proteinlerin stabilizasyonu ve normal fonksiyonu için gerekli olan CL'lerin, mitokondriyanın bolca bulunduğu nöronlarda da önemli bir yere sahip olduğu ön görülmektedir. TAZ eksikliği ile karakterize Barth Sendromlu hastalarda bilişsel ve davranışsal semptomlar gözlemlenmesi bu ön görüşü desteklemektedir. Nöronal TAZ'ın beyin kardiyolipinomundaki ve fonksiyonundaki önemini ortaya koymak amacıyla yaptığımız bu çalışmada, ilk olarak nöron spesifik TAZ knock-out fareler geliştirilmiştir. Daha sonra normal genetikli ve CaMKIIa-Cre rekombinaz taşıyan fareler çalışmaya dahil edilerek Cre'nin lipidomiks ve kognitif fonksiyon açısından bir fark yaratmadığı ortaya konmuştur. Nöronal TAZ eksikliği sonucu beyindeki PUFA, özellikle DHA taşıyan CL'lerin azaldığı ve bu azalmaya MLCL, PG, PA türleriyle birlikte DHA taşıyan PC ve PCp türlerinde artışın eşlik ettiği tespit edilmiştir. Lipidomideki bu değişiklikler Kompleks I'de artmış mitokondriyal respirasyon, farelerde azalmış sosyal etkileşim ve uzaysal hafızada hasarla sonuçlanmıştır. Bu verilere ek olarak, santral sinir sistemine verilen KKH gibi ek bir stresle beraber, PUFA taşıyanlar ağırlıklı olmak üzere, CL değerlerinde belirgin azalma olduğu ve MLCL miktarı ve peroksida CL oluşumunda artış olduğu saptanmıştır. Bu artışa yükselmiş araşidonik asit seviyesi, artmış apoptotik aktivite ve daha büyük doku kaybı eşlik etmiştir. Ayrıca KKH sonrasında, nKO hayvanlarda daha düşük iyilik hali skoru görülmüştür. Tüm bu veriler, nöronal TAZ'ın beyinde kardiyolipinom çeşitliliğinde ve beyin fonksiyonlarında önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın birincil amacı nöronal TAZ'ın beyin kardiyolipinom çeşitliliğindeki önemini göstermektir. Kardiyolipinin yeniden şekillenmesinde tafazzinin belirli yağ açıl zincirlerine enzimatik özgüllüğü halen tartışmalı bir konu olsa da, çeşitli çalışmalarda TAZ'ın eksikliğinde CL4'de ciddi azalma olduğu bu nedenle TAZ'ın LA'e özgül olduğu ifade edilmiştir (Xu vd., 2003). Ancak bu çalışmaların CL4'ün ağırlıklı tür olduğu kalp ve karaciğer gibi dokularda gösterilmiş olması ve beyinde TAZ KO edildiğinde tüm PUFA taşıyan CL'lerin azalması, bu tezin doğru olmadığını göstermektedir (Cole vd., 2018). Ayrıca Abe vd., lipozomal membranlarda tafazzin aracılı transaçilasyonun, PC'lerdeki 18:2 gruplarda 16:1 gruplara ve 16:0 gruplara göre daha hızlı meydana geldiğini göstermiştir (Abe vd., 2016). Çalışmamız da göstermiştir ki, nTAZ'ın silinmesi beyinde PUFA taşıyan CL'lerde belirgin eksikliğe kısa zincirli SFA taşıyan CL'lerde ise ciddi artışa neden olmaktadır. Burada akla gelen ilk soru nTAZ'ın bu değişikliğe nasıl yol açtığıdır. Çalışmanın ana ilgisi nTAZ eksikliği olduğundan ALCAT1 ve MLCLAT1 gibi diğer transaçilasyon

enzimleri burada değerlendirilmemiştir. ALCAT1, MLCLAT1 ve α -TFP, MLCL'nin yeniden açillenmesinde açıl zincir donörü olarak açıl-KoA'yı kullanan transferaz enzimleridir ve fosfolipitleri substrat olarak kullanmazlar (Cao vd., 2004; Taylor vd., 2004). Bu transaçilazların, MLCL'leri linoleoil-KoA, oleil-KoA ve palmitoil-KoA ile açilleştirdiği, PUFA içeren açıl-KoA kullansa da bunların asıl tercihleri olmadığı bildirilmiştir (Robinson, 1993; Klingenberg, 2009; Li vd., 2010; Cao vd., 2004). Dolayısıyla çalışmamızda korteksteki uzun zincirli PUFA taşıyan CL'lerin azalmasının, diğer enzimlerdeki değişikliklerden bağımsız olarak nTAZ ve nöronlardaki mevcut açıl kompozisyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Buna göre nTAZ'ın sadece PUFA'ya spesifik olduğu söylenememekle beraber, nöronlarda olgun CL'ye PUFA taşınmasından sorumlu olduğu çalışmamız verileriyle gösterilmiştir. Ayrıca çalışmamızda, nTAZ'daki kardiyolipinom değişikliklerine sadece DHA taşıyan PC ve PCp'lerde artış eşlik etse de, tek başına bu sonuçla nTAZ'ın DHA'yı PC'den aldığını söylemek zordur. Literatürde, PE'nin de TAZ için substrat olduğu, fakat nöronal TAZ'ın ana substrat olarak PC türlerini kullanmaya yöneldiği gösterilmiştir (Xu vd., 2006).

Çalışmamızda beyindeki CL'lerin %95'inden fazlasının PUFA taşıdığı tespit edilmiştir. Beyin CL'lerinin yapılarında AA ve DHA gibi daha yüksek miktarlarda PUFA'lar bulunması, onu kalp, karaciğer, böbrek gibi diğer dokulardan farklı kılmaktadır (Amoscato vd., 2014). Beynin daha yüksek radikal temizleme kapasitesinin, elektron transport zinciri komplekslerinin yakınında bulunan CL'lerdeki yüksek PUFA konsantrasyonlarından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Starkov vd., 2014; Cole vd., 2018). nTAZ-KO durumunda uzun zincirli PUFA taşıyan CL'lerde %50'ye varan azalmanın, hücrelerinin %25-35'i nöronlardan oluşan kortekste görülmesi nöronlardaki PUFA-CL'nin ileri derecede azaldığına işaret etmektedir. TAZ'ın özellikle nöronlarda daha aktif bir görev aldığını düşündürmektedir (Tyurina vd., 2014). Yapılan çalışmalarda PUFA-CL'lerin, özellikle yüksek seviyelerde DHA içeren CL'lerin, mitokondriyal membran akışkanlığının artmasına bağlı olarak protein-lipit etkileşimlerinin bozulmasına ve elektron transport zincirindeki kompleks aktivitesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Cortie vd., 2012, Sullivan vd., 2017; Sullivan vd., 2018). Ayrıca başka bir çalışmada, artmış CL açıl zincir saturasyonunun hasarlanmış oksidatif fosforilasyon ve bozulmuş membran krista yapısına neden olduğu gösterilmiştir (Harner vd., 2014). Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, DHA taşıyanlar daha belirgin olmak üzere, nöronlarda PUFA-CL'lerin azalmasıyla kompleks I aktivitesinin arttığını göstermiş bulunmaktayız. CL'nin dokuya özgü açıl zincir bileşimi, ETC'deki Kompleks I'in, dolayısıyla nöronal mitokondriyonun uygun işlevinin sağlanmasında önemlidir.

Nöral kardiyolipinom kompozisyonunun bilişsel fenotip üzerindeki potansiyel mekanizmalarını değerlendirmek amacıyla farelere iyilik hali, uzaysal hafıza/öğrenme, yeni obje tanıma, denge ve sosyal etkileşimi değerlendiren testleri uyguladık. Literatürde Barth sendromlu bireylerde okumayla ilgili becerilerin tüm ölçümlerinde yaşa uygun performansa sahip olmalarına rağmen, matematik ve görsel uzaysal görevlerdeki performanslarının önemli ölçüde daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Hatta matematikte zorlanan Barth Sendrom'lu (BTHS) erkek çocukların, matematik performansının altında yürütücü işlevdeki bozukluğun yatabileceği öne sürülmüş, BTHS'deki düşük performansın matematik öğrenme güçlüğü ile değil de matematiğin kullanımında zorlukla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Raches vd., 2012). Ayrıca, sağlıklı yaşlılarına kıyasla BTHS'li çocukların daha fazla içselleştirici semptomlar ve sosyal sorunlar yaşadıkları, yaşam kalitelerinin daha düşük olduğu ve yalnızlık ile distress skorlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. (Jacob vd., 2017; Storch vd., 2009). Fakat bu bulgu ve semptomların primer olarak nöronlardan mı kaynaklandığı yoksa tekrarlayan kardiyak sorunlara ya da hastalık psikolojisine sekonder mi olduğu bilinmemektedir. Biz, nöronal TAZ'ı silinmiş farelerin uzaysal hafızasının ve yabancı farelerle olan sosyal etkileşiminin etkilendiği fakat yaşam kalitesini ölçen nesting aktivitesinin etkilendiği gözlemledik. Bu sonuç, BTHS'li çocukların sosyal ve matematiksel alanda özel bir desteğe ihtiyacı olduğunu vurgulamaktadır. Ayrıca, Cole ve ark., TAZ KD farelerde motor fonksiyon normal kalırken, yeni nesne tanıma testlerinde önemli hafıza eksikliği olduğunu göstermiştir (Cole vd., 2018). Biz çalışmamızda motor fonksiyonu normal olarak değerlendirip yeni obje tanıma testinde gruplar arası bir farklılık saptamadık. Literatürde de, Barth sendromlu hastalarda matematiksel alan dışında öğrenmede bir zorluk rapor edilmemiştir. TAZ KD ve nTAZ KO çalışmalarındaki bu farkın altında yatan iki nedeni olabilir. Birinci olarak, prenatal dönemde KO edilen TAZ geni sonrası, farede kompensatuvar mekanizmalar gelişmiş olabilir. İkinci olarak, TAZ KD edildiğinde tüm hücreler etkilendirken, bizim çalışmamızda sadece nöronal TAZ etkilendirilmiştir.

Nöronal apoptoz; nörogeleşim, nörodejenerasyon ve nöronal hasarda hayati rol oynayan, sıkı bir şekilde kontrol edilen bir süreçtir. CL gibi MLCL'nin de cyt c ile kompleks yaparak cyt c'ye peroksidaz aktivitesi kazandırarak apoptozisi tetiklediği bilinmektedir (Kagan vd., 2023; Gonzalvez ve Gottlieb, 2007). Çalışmamızda nTAZ-KO grupta CL'lerin miktarı azalmasına rağmen MLCL'nin artışıyla orantılı olarak peroksidaz aktivitesinin arttığı görülmektedir. Bu da MLCL-cyt c kompleksinin nöronlarda da görüldüğünü destekler niteliktedir. Kaspaz 3/7 aktivitesi ise naiv hayvanlarda bir değişiklik göstermezken, KKH sonrasında nTAZ-KO grubunda bu artışın daha fazla olduğu ve bu artışa daha büyük lezyonun eşlik ettiği görülmüştür. Naiv hayvanlardaki değişmeyen apoptotik aktivite, MLCL-cytc kompleksinin peroksidaz aktivitesinin görülebilmesi için ortamda H₂O₂ gibi

radikallerin olması gerektiğine işaret etmektedir. Nitekim, Kagan vd.'nin yaptığı hücresel deneylerde de MLCL-cytc peroksidaz aktivitesinin ortamda H_2O_2 varlığında arttığı gösterilmiştir (Kagan vd., 2023). Bununla birlikte nKO-KKH grubunda DHA içeren CL miktarlarında daha ileri bir düşüş gözlenmiştir. Yapılan biomimetik model çalışmalarında, CL/cytc kompleksinin CL4 ve MLCL ile oluştuğu fakat $(22:6)_4CL$ 'in bu yapının oluşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu nedenler nKO hayvanlarda KKH sonrası DHA içeren CL'lerin azalmasının MLCL veya CL-cytc komplekslerinin engellenmesini zorlaştırdığı söylenebilir. Tüm bu verilerle birlikte, araştırmamızda KKH öncesi dönemde özbakım değerleri benzer bulunan iki gruptan, KKH sonrasında nTAZ-KO hayvanlarda nesting skorunda gerileme olduğunu gösterdik. KKH sonrasındaki bu sonuç, KO hayvanların normalde iyilik halini koruyabildiğini fakat santral sinir sistemini ek strese sokan bir olayda bu iyilik halini devam ettiremediğini göstermektedir. Datamız tüm bulgularıyla, TAZ eksikliğinin KKH'nin sonuçlarını kötüleştirdiğinin göstermekte ve nTAZ'ın KKH'de koyucu bir rol alabileceğine işaret etmektedir. Bu sonuçla uyumlu olarak, Chao vd. da HT22 hücrelerde yaptıkları hücre germe modeli deneyinde TAZ-KO'unun hücre sitotoksitesini arttırdığını, TAZ'ın overeksprese edilmesininse bunu azalttığını göstermişlerdir (Chao vd., 2018). Çeşitli nedenlerle Barth sendromlu çocuklarda artan oksidatif stresin, kronik süreçte bu peroksidaz komplekslerini artırarak beyin fonksiyonlarında deformasyona yol açabileceği söylenebilmekle beraber bu alanda ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bunun yanı sıra AA ile 4-HNE öncüsü olan perokside AA, nKO-KKH grubunda yükselmiştir. KKH'daki iPLA₂ artışına rağmen TAZ'ın olmayışı, KKH'daki PUFA salınımını arttırabileceğini düşündürmektedir (Chao vd., 2018). PUFA ve PUFAox'lar KKH sonrası pro-inflamatuvar mediatörleri oluşturmakta ve hücre hasarına yol açmaktadırlar (Lamade vd., 2020). Özellikle 4-HNE birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkili olarak bulunmuştur (Zarkovic, 2003). Çalışmamızda plan döneminde temel odağımız CL olmasından dolayı, buna göre düzenlediğimiz LCMS methodumuzla, 4-HNE gibi PUFAox alt ürünleri tespit edilememiş olsa da redoks tepkimeleri vesilesiyle bu yapıların oluşması kaçınılmazdır. Bu durum tekrar nTAZ'ın KKH'deki koruyucu rolüne dikkat çekmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız, nTAZ eksikliğinin, beyin lipit kompozisyonunda önemli değişikliklere yol açtığını ve bu değişikliklerin bilişsel ve davranışsal fonksiyonlar ile mitokondriyal fonksiyonlar üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır. Bu değişiklikler, beyinde uzun zincirli PUFA-CL'lerde belirgin azalma, mitokondriyal respirasyonda artma, sosyal etkileşim ve uzaysal hafızada zayıflama olarak ortaya konmuştur. Çalışmamız, bildiğimiz kadarıyla, nöronal tafazzinin beyin kardiyolipinomu, kognitif ve davranışsal fonksiyonlar ile travmatik beyin hasarı üzerindeki etkisini inceleyen ilk ve tek çalışmadır. TAZ eksikliği ile karakterize Barth Sendromlu bireylerde gözlemlenen bilişsel ve davranışsal semptomların, nöronal TAZ kaybıyla ilişkisinin önerilmesi, bu alandaki literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır. Ayrıca, KKH sonrası nTAZ-KO grubunda PUFA-CL'deki azalma ve MLCL'de, apoptotik aktivede ve lezyon hacminde artış ile iyilik halinde bozulma tespit edilmiştir. Bu durum, oksidatif koşullarda nTAZ eksikliğinin merkezi sinir sisteminde nöronal hasarı arttırabileceğini göstermektedir.

Araştırmamızda, TAZ'ın astrosit gibi glial hücrelerdeki eksikliğinin etkileri incelenmemiştir. Barth sendromu ya da travmatik beyin hasarı gibi durumlara bir çok hücre çeşidinin dahil olması nedeniyle; özellikle, glial hücrelerdeki TAZ kaybının, beyin kardiyolipinom ve fonksiyonunu nasıl etkilediğinin araştırılması literatüre katkı sağlayabilir. Ayrıca, kardiyolipidom üzerinde diğer transasilasyon enzimlerinin etkisini anlamak, TAZ'ın biyolojik işlevini daha derinlemesine kavramamıza yardımcı olabilir. Çalışmamızda, Barth sendromlu hastalarda gözlemlenen bilişsel ve davranışsal bulguların, özellikle nTAZ eksikliğinden kaynaklanabileceğini ve bu semptomların kardiyovasküler etkilerden bağımsız olabileceğini gösterdik. Ancak bu bulgular, kesin bir sonuca varabilmek için daha kapsamlı klinik çalışmalara ihtiyaç duymaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, bu hastaların eğitimsel ve sosyal destek gereksinimlerinin belirlenmesini sağlayabilir.

Sonuç olarak, nöronal TAZ'ın beyin kardiyolipinomundaki rolü, bu alandaki bilгимizi derinleştirmekte ve nöronlardaki lipit metabolizmasının fizyolojik ve patolojik süreçlerindeki önemini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abe, M., Hasegawa, Y., Oku, M., Sawada, Y., Tanaka, E., Sakai, Y., & Miyoshi, H. (2016). Mechanism for Remodeling of the Acyl Chain Composition of Cardiolipin Catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* Tafazzin. *The Journal of biological chemistry*, 291(30), 15491–15502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718510>
- Acehan, D., Malhotra, A., Xu, Y., Ren, M., Stokes, D. L., & Schlame, M. (2011). Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophysical journal*, 100(9), 2184–2192. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.031>
- Ahmad M, Wolberg A, Kahwaji CI. Biochemistry, Electron Transport Chain. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526105/>
- Ahmadpour, S. T., Mahéo, K., Servais, S., Brisson, L., & Dumas, J. F. (2020). Cardiolipin, the Mitochondrial Signature Lipid: Implication in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8031. <https://doi.org/10.3390/ijms21218031>
- Akeo, K., Hiramitsu, T., Kanda, T., Yorifuji, H., & Okisaka, S. (1996). Comparative effects of linoleic acid and linoleic acid hydroperoxide on growth and morphology of bovine retinal pigment epithelial cells in vitro. *Current eye research*, 15(5), 467–476. <https://doi.org/10.3109/02713689609000758>
- Amoscato, A. A., Sparvero, L. J., He, R. R., Watkins, S., Bayir, H., & Kagan, V. E. (2014). Imaging mass spectrometry of diversified cardiolipin molecular species in the brain. *Anal Chem*, 86(13), 6587–6595. <https://doi.org/10.1021/ac5011876>
- Anthonymuthu, T. S., Kenny, E. M., Hier, Z. E., Clark, R. S. B., Kochanek, P. M., Kagan, V. E., & Bayir, H. (2019). Detection of brain specific cardiolipins in plasma after experimental pediatric head injury. *Exp Neurol*, 316, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.04.007>
- Anthonymuthu, T. S., Kenny, E. M., Lamade, A. M., Gidwani, H., Krehel, N. M., Misse, A., Gao, X., Amoscato, A. A., Straub, A. C., Kagan, V. E., Dezfulian, C., & Bayir, H. (2019). Lipidomics Detection of Brain Cardiolipins in Plasma Is Associated With Outcome After Cardiac Arrest. *Crit Care Med*, 47(4), e292–e300. <https://doi.org/10.1097/ccm.0000000000003636>
- Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., Mihara, K., & Ishihara, N. (2017). Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nature cell biology*, 19(7), 856–863. <https://doi.org/10.1038/ncb3560>
- Bayir, H., Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y., Viner, R., Ritov, V., Amoscato, A. A., Zhao, Q., Zhang, X. J., Janesko-Feldman, K. L., Alexander, H., Basova, L. V., Clark, R. S., Kochanek, P. M., & Kagan,

- V. E. (2007). Selective early cardiolipin peroxidation after traumatic brain injury: an oxidative lipidomics analysis. *Ann Neurol*, 62(2), 154-169. <https://doi.org/10.1002/ana.21168>
- Cao, J., Liu, Y., Lockwood, J., Burn, P., & Shi, Y. (2004). A novel cardiolipin-remodeling pathway revealed by a gene encoding an endoplasmic reticulum-associated acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) in mouse. *The Journal of biological chemistry*, 279(30), 31727–31734. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402930200>
- Chakraborty, K., Raundhal, M., Chen, B. B., Morse, C., Tyurina, Y. Y., Khare, A., Oriss, T. B., Huff, R., Lee, J. S., St Croix, C. M., Watkins, S., Mallampalli, R. K., Kagan, V. E., Ray, A., & Ray, P. (2017). The mito-DAMP cardiolipin blocks IL-10 production causing persistent inflammation during bacterial pneumonia. *Nat Commun*, 8, 13944. <https://doi.org/10.1038/ncomms13944>
- Chao, H., Anthonymuthu, T. S., Kenny, E. M., Amoscato, A. A., Cole, L. K., Hatch, G. M., Ji, J., Kagan, V. E., & Bayır, H. (2018). Disentangling oxidation/hydrolysis reactions of brain mitochondrial cardiolipins in pathogenesis of traumatic injury. *JCI Insight*, 3(21). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97677>
- Chao, H., Lin, C., Zuo, Q., Liu, Y., Xiao, M., Xu, X., Li, Z., Bao, Z., Chen, H., You, Y., Kochanek, P. M., Yin, H., Liu, N., Kagan, V. E., Bayır, H., & Ji, J. (2019). Cardiolipin-Dependent Mitophagy Guides Outcome after Traumatic Brain Injury. *J Neurosci*, 39(10), 1930-1943. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3415-17.2018>
- Cheng, H., Mancuso, D. J., Jiang, X., Guan, S., Yang, J., Yang, K., Sun, G., Gross, R. W., & Han, X. (2008). Shotgun lipidomics reveals the temporally dependent, highly diversified cardiolipin profile in the mammalian brain: temporally coordinated postnatal diversification of cardiolipin molecular species with neuronal remodeling. *Biochemistry*, 47(21), 5869-5880. <https://doi.org/10.1021/bi7023282>
- Chu, C. T., Ji, J., Dagda, R. K., Jiang, J. F., Tyurina, Y. Y., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Yanamala, N., Shrivastava, I. H., Mohammadyani, D., Wang, K. Z. Q., Zhu, J., Klein-Seetharaman, J., Balasubramanian, K., Amoscato, A. A., Borisenko, G., Huang, Z., Gusdon, A. M., Cheikhi, A., . . . Kagan, V. E. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol*, 15(10), 1197-1205. <https://doi.org/10.1038/ncb2837>
- Colbeau, A., Nachbaur, J., & Vignais, P. M. (1971). Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 249(2), 462–492. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(71\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(71)90123-4)
- Cole, L. K., Kim, J. H., Amoscato, A. A., Tyurina, Y. Y., Bay R, H., Karimi, B., Siddiqui, T. J., Kagan, V. E., Hatch, G. M., & Kauppinen, T. M. (2018). Aberrant cardiolipin metabolism is associated with cognitive deficiency and hippocampal alteration in tafazzin knockdown mice.

- Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease, 1864(10), 3353–3367.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.022>
- Cortie, C. H., & Else, P. L. (2012). Dietary docosaehaenoic Acid (22:6) incorporates into cardiolipin at the expense of linoleic Acid (18:2): analysis and potential implications. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 15447–15463. <https://doi.org/10.3390/ijms131115447>
- Dennis, E. A., & Norris, P. C. (2015). Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 15(8), 511–523. <https://doi.org/10.1038/nri3859>
- Eble, K. S., Coleman, W. B., Hantgan, R. R., & Cunningham, C. C. (1990). Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*, 265(32), 19434–19440.
- Falabella, M., Vernon, H. J., Hanna, M. G., Claypool, S. M., & Pitceathly, R. D. S. (2021). Cardiolipin, Mitochondria, and Neurological Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 32(4), 224–237. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.01.006>
- Fahy E., Sud M., Cotter D. and Subramaniam S. LIPID MAPS® online tools for lipid research, *Nucleic Acids Research* 35, 2007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm324>.
- Flanagan S. R. (2015). Invited Commentary on "Centers for Disease Control and Prevention Report to Congress: Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation". *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 96(10), 1753–1755.
<https://doi.org/10.1016/j.apmr.2015.07.001>
- Friedman, J. R., Mourier, A., Yamada, J., McCaffery, J. M., & Nunnari, J. (2015). MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *eLife*, 4, e07739. <https://doi.org/10.7554/eLife.07739>
- Gasanoff, E. S., Yaguzhinsky, L. S., & Garab, G. (2021). Cardiolipin, Non-Bilayer Structures and Mitochondrial Bioenergetics: Relevance to Cardiovascular Disease. *Cells*, 10(7), 1721.
<https://doi.org/10.3390/cells10071721>
- Ghosh, S., Basu Ball, W., Madaris, T. R., Srikantan, S., Madesh, M., Mootha, V. K., & Gohil, V. M. (2020). An essential role for cardiolipin in the stability and function of the mitochondrial calcium uniporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(28), 16383–16390. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000640117>
- Gonzalvez, F., & Gottlieb, E. (2007). Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12(5), 877–885.
<https://doi.org/10.1007/s10495-007-0718-8>
- Haines, T. H., & Dencher, N. A. (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS letters*, 528(1-3), 35–39. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03292-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03292-1)

- Han, X., Yang, J., Cheng, H., Yang, K., Abendschein, D. R., & Gross, R. W. (2005). Shotgun lipidomics identifies cardiolipin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction. *Biochemistry*, 44(50), 16684–16694. <https://doi.org/10.1021/bi051908a>
- Han, X., Yang, K., Yang, J., Cheng, H., & Gross, R. W. (2006). Shotgun lipidomics of cardiolipin molecular species in lipid extracts of biological samples. *Journal of lipid research*, 47(4), 864–879. <https://doi.org/10.1194/jlr.D500044-JLR200>
- Harner, M. E., Unger, A. K., Izawa, T., Walther, D. M., Ozbalci, C., Geimer, S., Reggiori, F., Brügger, B., Mann, M., Westermann, B., & Neupert, W. (2014). Aim24 and MICOS modulate respiratory function, tafazzin-related cardiolipin modification and mitochondrial architecture. *eLife*, 3, e01684. <https://doi.org/10.7554/eLife.01684>
- Houtkooper, R. H., Rodenburg, R. J., Thiels, C., van Lenthe, H., Stet, F., Poll-The, B. T., Stone, J. E., Steward, C. G., Wanders, R. J., Smeitink, J., Kulik, W., & Vaz, F. M. (2009). Cardiolipin and monolysocardiolipin analysis in fibroblasts, lymphocytes, and tissues using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a diagnostic test for Barth syndrome. *Analytical biochemistry*, 387(2), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.032>
- Horvath, S. E., & Daum, G. (2013). Lipids of mitochondria. *Progress in lipid research*, 52(4), 590–614. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
- Hsu, Y. H., Dumlao, D. S., Cao, J., & Dennis, E. A. (2013). Assessing phospholipase A2 activity toward cardiolipin by mass spectrometry. *PloS one*, 8(3), e59267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059267>
- Jacob, M. L., Johnco, C., Dane, B. F., Collier, A., & Storch, E. A. (2017). Psychosocial functioning in Barth syndrome: Assessment of individual and parental adjustment. *Children's Health Care*, 46(1), 66-92. <https://doi.org/10.1080/02739615.2015.1124768>
- Ji, J., Baart, S., Vikulina, A. S., Clark, R. S., Anthonymuthu, T. S., Tyurin, V. A., Du, L., St Croix, C. M., Tyurina, Y. Y., Lewis, J., Skoda, E. M., Kline, A. E., Kochanek, P. M., Wipf, P., Kagan, V. E., & Bayır, H. (2015). Deciphering of mitochondrial cardiolipin oxidative signaling in cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35(2), 319-328. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.204>
- Ji, J., Kline, A. E., Amoscato, A., Samhan-Arias, A. K., Sparvero, L. J., Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y., Fink, B., Manole, M. D., Puccio, A. M., Okonkwo, D. O., Cheng, J. P., Alexander, H., Clark, R. S., Kochanek, P. M., Wipf, P., Kagan, V. E., & Bayır, H. (2012). Lipidomics identifies cardiolipin oxidation as a mitochondrial target for redox therapy of brain injury. *Nat Neurosci*, 15(10), 1407-1413. <https://doi.org/10.1038/nn.3195>

- Ji, J., Tyurina, Y. Y., Tang, M., Feng, W., Stolz, D. B., Clark, R. S., Meaney, D. F., Kochanek, P. M., Kagan, V. E., & Bayir, H. (2012). Mitochondrial injury after mechanical stretch of cortical neurons in vitro: biomarkers of apoptosis and selective peroxidation of anionic phospholipids. *J Neurotrauma*, 29(5), 776-788. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1602>
- Jiang, Z., Shen, T., Huynh, H., Fang, X., Han, Z., & Ouyang, K. (2022). Cardiolipin Regulates Mitochondrial Ultrastructure and Function in Mammalian Cells. *Genes*, 13(10), 1889. <https://doi.org/10.3390/genes13101889>
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A., & Rodenburg, R. J. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of inherited metabolic disease*, 35(2), 211–225. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9382-9>
- Jussupow, A., Di Luca, A., & Kaila, V. R. I. (2019). How cardiolipin modulates the dynamics of respiratory complex I. *Science advances*, 5(3), eaav1850. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav1850>
- Kagan, V. E., Tyurina, Y. Y., Mikulska-Ruminska, K., Damschroder, D., Vieira Neto, E., Lasorsa, A., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A., Amoscato, A. A., Samovich, S. N., Souryavong, A. B., Dar, H. H., Ramim, A., Liang, Z., Lazcano, P., Ji, J., Schmidtke, M. W., Kiselyov, K., Korkmaz, A., Vladimirov, G. K., ... Greenberg, M. L. (2023). Anomalous peroxidase activity of cytochrome c is the primary pathogenic target in Barth syndrome. *Nature metabolism*, 5(12), 2184–2205. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00926-4>
- Kagan, V. E., Bayir, H. A., Belikova, N. A., Kapralov, O., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Stoyanovsky, D. A., Wipf, P., Kochanek, P. M., Greenberger, J. S., Pitt, B., Shvedova, A. A., & Borisenko, G. (2009). Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med*, 46(11), 1439-1453. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004>
- Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V., Vlasova, I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D. A., Kurnikov, I. V., & Borisenko, G. G. (2005). Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol*, 1(4), 223-232. <https://doi.org/10.1038/nchembio727>
- Kagan, V. E., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Mohammadyani, D., Angeli, J. P., Baranov, S. V., Klein-Seetharaman, J., Friedlander, R. M., Mallampalli, R. K., Conrad, M., & Bayir, H. (2015). Cardiolipin signaling mechanisms: collapse of asymmetry and oxidation. *Antioxid Redox Signal*, 22(18), 1667-1680. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6219>
- Kamer, K. J., Grabarek, Z., & Mootha, V. K. (2017). High-affinity cooperative Ca²⁺ binding by MICU1-MICU2 serves as an on-off switch for the uniporter. *EMBO reports*, 18(8), 1397–1411. <https://doi.org/10.15252/embr.201643748>

- Kasahara, T., Kubota-Sakashita, M., Nagatsuka, Y., Hirabayashi, Y., Hanasaka, T., Tohyama, K., & Kato, T. (2020). Cardiolipin is essential for early embryonic viability and mitochondrial integrity of neurons in mammals. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(1), 1465–1480.
<https://doi.org/10.1096/fj.201901598R>
- Kiebish, M. A., Han, X., Cheng, H., Chuang, J. H., & Seyfried, T. N. (2008). Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *Journal of lipid research*, 49(12), 2545–2556.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M800319-JLR200>
- Kim, K. W., Mutter, R. W., Cao, C., Albert, J. M., Freeman, M., Hallahan, D. E., & Lu, B. (2006). Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signaling. *J Biol Chem*, 281(48), 36883–36890.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M607094200>
- Klingenberg M. (2009). Cardiolipin and mitochondrial carriers. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(10), 2048–2058. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.06.007>
- Kolomiitseva, I. K., Markevich, L. N., Ignat'ev, D. A., & Bykova, O. V. (2010). Lipids of nuclear fractions from neurons and glia of rat neocortex under conditions of artificial hypobiosis. *Biochemistry (Mosc)*, 75(9), 1132–1138. <https://doi.org/10.1134/s0006297910090063>
- Lamade, A. M., Anthonymuthu, T. S., Hier, Z. E., Gao, Y., Kagan, V. E., & Bayır, H. (2020). Mitochondrial damage & lipid signaling in traumatic brain injury. *Experimental neurology*, 329, 113307. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113307>
- Lesnefsky, E. J., Slabe, T. J., Stoll, M. S., Minkler, P. E., & Hoppel, C. L. (2001). Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280(6), H2770–H2778.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2770>
- Li, J., Romestaing, C., Han, X., Li, Y., Hao, X., Wu, Y., Sun, C., Liu, X., Jefferson, L. S., Xiong, J., Lanoue, K. F., Chang, Z., Lynch, C. J., Wang, H., & Shi, Y. (2010). Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell metabolism*, 12(2), 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.07.003>
- Lopez-Fabuel, I., Le Douce, J., Logan, A., James, A. M., Bonvento, G., Murphy, M. P., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2016). Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(46), 13063–13068.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1613701113>

- Lu, B., Xu, F. Y., Jiang, Y. J., Choy, P. C., Hatch, G. M., Grunfeld, C., & Feingold, K. R. (2006). Cloning and characterization of a cDNA encoding human cardiolipin synthase (hCLS1). *Journal of lipid research*, 47(6), 1140–1145. <https://doi.org/10.1194/jlr.C600004-JLR200>
- Mahajan, M., Bharambe, N., Shang, Y., Lu, B., Mandal, A., Madan Mohan, P., Wang, R., Boatz, J. C., Manuel Martinez Galvez, J., Shnyrova, A. V., Qi, X., Buck, M., van der Wel, P. C. A., & Ramachandran, R. (2021). NMR identification of a conserved Drp1 cardiolipin-binding motif essential for stress-induced mitochondrial fission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(29), e2023079118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023079118>
- Mancuso, D. J., Sims, H. F., Han, X., Jenkins, C. M., Guan, S. P., Yang, K., Moon, S. H., Pietka, T., Abumrad, N. A., Schlesinger, P. H., & Gross, R. W. (2007). Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2gamma leads to alterations in mitochondrial lipid metabolism and function resulting in a deficient mitochondrial bioenergetic phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 282(48), 34611–34622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707795200>
- Maniti, O., Cheniour, M., Lecompte, M. F., Marcillat, O., Buchet, R., Vial, C., & Granjon, T. (2011). Acyl chain composition determines cardiolipin clustering induced by mitochondrial creatine kinase binding to monolayers. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(4), 1129–1139. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.01.005>
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(10), 634–646. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>
- Murray, T. E., Wenzel, T. J., Simtchouk, S., Greuel, B. K., Gibon, J., & Klegeris, A. (2022). Extracellular Cardiolipin Modulates Select Immune Functions of Astrocytes in Toll-Like Receptor (TLR) 4-Dependent Manner. *Mediators of inflammation*, 2022, 9946439. <https://doi.org/10.1155/2022/9946439>
- Musatov, A., & Robinson, N. C. (2014). Bound cardiolipin is essential for cytochrome c oxidase proton translocation. *Biochimie*, 105, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.07.005>
- Oemer, G., Koch, J., Wohlfarter, Y., Alam, M. T., Lackner, K., Sailer, S., Neumann, L., Lindner, H. H., Watschinger, K., Haltmeier, M., Werner, E. R., Zschocke, J., & Keller, M. A. (2020). Phospholipid Acyl Chain Diversity Controls the Tissue-Specific Assembly of Mitochondrial Cardiolipins. *Cell reports*, 30(12), 4281–4291.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.115>
- Olivar-Villanueva, M., Ren, M., Schlame, M., & Phoon, C. K. L. (2023). The critical role of cardiolipin in metazoan differentiation, development, and maturation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 252(6), 691–712. <https://doi.org/10.1002/dvdy.567>

- Osman, C., Voelker, D. R., & Langer, T. (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *The Journal of cell biology*, 192(1), 7–16. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006159>
- Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2019). Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells*, 8(7), 728. <https://doi.org/10.3390/cells8070728>
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., & Ruggiero, F. M. (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*, 286(1), 135–141. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00814-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00814-9)
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., & Ruggiero, F. M. (2001). Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion*, 1(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/s1567-7249\(01\)00011-3](https://doi.org/10.1016/s1567-7249(01)00011-3)
- Pennington, E. R., Sullivan, E. M., Fix, A., Dadoo, S., Zeczycki, T. N., DeSantis, A., Schlattner, U., Coleman, R. A., Chicco, A. J., Brown, D. A., & Shaikh, S. R. (2018). Proteolipid domains form in biomimetic and cardiac mitochondrial vesicles and are regulated by cardiolipin concentration but not monolysocardiolipin. *The Journal of biological chemistry*, 293(41), 15933–15946. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004948>
- Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., Di Venosa, N., & Paradies, G. (2003). Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(6), 714–716. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0729fje>
- Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L., & Schägger, H. (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *The Journal of biological chemistry*, 278(52), 52873–52880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308366200>
- Pizzuto, M., Lonez, C., Baroja-Mazo, A., Martínez-Banaclocha, H., Tourlomousis, P., Gangloff, M., Pelegrin, P., Ruysschaert, J. M., Gay, N. J., & Bryant, C. E. (2019). Saturation of acyl chains converts cardiolipin from an antagonist to an activator of Toll-like receptor-4. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(18), 3667–3678. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03113-5>
- Pointer, C. B., Wenzel, T. J., & Klegeris, A. (2019). Extracellular cardiolipin regulates select immune functions of microglia and microglia-like cells. *Brain research bulletin*, 146, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.002>

- Raches, D., & Mazzocco, M. M. (2012). Emergence and nature of mathematical difficulties in young children with Barth syndrome. *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*, 33(4), 328–335. <https://doi.org/10.1097/DBP.0b013e31824c4090>
- Rampelt, H., Wollweber, F., Gerke, C., de Boer, R., van der Klei, I. J., Bohnert, M., Pfanner, N., & van der Laan, M. (2018). Assembly of the Mitochondrial Cristae Organizer Mic10 Is Regulated by Mic26-Mic27 Antagonism and Cardiolipin. *Journal of molecular biology*, 430(13), 1883–1890. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.037>
- Robinson N. C. (1993). Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 25(2), 153–163. <https://doi.org/10.1007/BF00762857>
- Roozenbeek, B., Maas, A. I., & Menon, D. K. (2013). Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nature reviews. Neurology*, 9(4), 231–236. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.22>
- Roth, K. A., & D'Sa, C. (2001). Apoptosis and brain development. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 7(4), 261–266. <https://doi.org/10.1002/mrdd.1036>
- Sacchetto, C., Sequeira, V., Bertero, E., Dudek, J., Maack, C., & Calore, M. (2019). Metabolic Alterations in Inherited Cardiomyopathies. *Journal of clinical medicine*, 8(12), 2195. <https://doi.org/10.3390/jcm8122195>
- Saini-Chohan, H. K., Dakshinamurti, S., Taylor, W. A., Shen, G. X., Murphy, R., Sparagna, G. C., & Hatch, G. M. (2011). Persistent pulmonary hypertension results in reduced tetralinoleoyl-cardiolipin and mitochondrial complex II + III during the development of right ventricular hypertrophy in the neonatal pig heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301(4), H1415–H1424. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00247.2011>
- Schlame, M., Ren, M., Xu, Y., Greenberg, M. L., & Haller, I. (2005). Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chemistry and physics of lipids*, 138(1-2), 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2005.08.002>
- Schlame, M., & Rüstow, B. (1990). Lysocardiolipin formation and reacylation in isolated rat liver mitochondria. *The Biochemical journal*, 272(3), 589–595. <https://doi.org/10.1042/bj2720589>
- Schlame, M., Xu, Y., & Ren, M. (2017). The Basis for Acyl Specificity in the Tafazzin Reaction. *The Journal of biological chemistry*, 292(13), 5499–5506. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.769182>
- Selassie, A. W., Zaloshnja, E., Langlois, J. A., Miller, T., Jones, P., & Steiner, C. (2008). Incidence of long-term disability following traumatic brain injury hospitalization, United States, 2003. *The Journal of head trauma rehabilitation*, 23(2), 123–131. <https://doi.org/10.1097/01.HTR.0000314531.30401.39>

- Shi Y. (2010). Emerging roles of cardiolipin remodeling in mitochondrial dysfunction associated with diabetes, obesity, and cardiovascular diseases. *Journal of biomedical research*, 24(1), 6–15. [https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(10\)60003-6](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(10)60003-6)
- Song, H., Wohltmann, M., Bao, S., Ladenson, J. H., Semenkovich, C. F., & Turk, J. (2010). Mice deficient in group VIB phospholipase A2 (iPLA2gamma) exhibit relative resistance to obesity and metabolic abnormalities induced by a Western diet. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 298(6), E1097–E1114. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00780.2009>
- Sparagna, G. C., Chicco, A. J., Murphy, R. C., Bristow, M. R., Johnson, C. A., Rees, M. L., Maxey, M. L., McCune, S. A., & Moore, R. L. (2007). Loss of cardiac tetralinoleoyl cardiolipin in human and experimental heart failure. *Journal of lipid research*, 48(7), 1559–1570. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600551-JLR200>
- Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Fink, A. B., Anthonymuthu, T., New, L. A., Kochanek, P. M., Watkins, S., Kagan, V. E., & Bayır, H. (2016). Imaging mass spectrometry reveals loss of polyunsaturated cardiolipins in the cortical contusion, hippocampus, and thalamus after traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry*, 139(4), 659–675. <https://doi.org/10.1111/jnc.13840>
- Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature cell biology*, 20(7), 745–754. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
- Storch EA, Keeley M, Merlo LJ et al (2009) Psychosocial functioning in youth with Barth syndrome. *Child Health Care* 38:137–156. <https://doi.org/10.1080/02739610902813344>
- Sullivan, E. M., Fix, A., Crouch, M. J., Sparagna, G. C., Zeczycki, T. N., Brown, D. A., & Shaikh, S. R. (2017). Murine diet-induced obesity remodels cardiac and liver mitochondrial phospholipid acyl chains with differential effects on respiratory enzyme activity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 45, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.04.004>
- Sullivan EM, Pennington ER, Sparagna GC, Torres MJ, Neuffer PD, Harris M, Washington J, Anderson EJ, Zeczycki TN, Brown DA, and Shaikh SR (2018) Docosahexaenoic acid lowers cardiac mitochondrial enzyme activity by replacing linoleic acid in the phospholipidome. *J Biol Chem* 293, 466–83.
- Sun, W. Y., Tyurin, V. A., Mikulska-Ruminska, K., Shrivastava, I. H., Anthonymuthu, T. S., Zhai, Y. J., Pan, M. H., Gong, H. B., Lu, D. H., Sun, J., Duan, W. J., Korolev, S., Abramov, A. Y., Angelova, P. R., Miller, I., Beharier, O., Mao, G. W., Dar, H. H., Kapralov, A. A., Amoscato, A. A., ... Kagan, V. E. (2021). Phospholipase iPLA2 β averts ferroptosis by eliminating a redox lipid death signal. *Nature chemical biology*, 17(4), 465–476. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00734-x>

- Taylor, W. A., & Hatch, G. M. (2009). Identification of the human mitochondrial linoleoyl-coenzyme A monolysocardiolipin acyltransferase (MLCL AT-1). *The Journal of biological chemistry*, 284(44), 30360–30371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048322>
- Taylor, W. A., Mejia, E. M., Mitchell, R. W., Choy, P. C., Sparagna, G. C., & Hatch, G. M. (2012). Human trifunctional protein alpha links cardiolipin remodeling to beta-oxidation. *PloS one*, 7(11), e48628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048628>
- Taylor, W. A., & Hatch, G. M. (2003). Purification and characterization of monolysocardiolipin acyltransferase from pig liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 278(15), 12716–12721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210329200>
- Thompson, W. R., DeCroes, B., McClellan, R., Rubens, J., Vaz, F. M., Kristaponis, K., Avramopoulos, D., & Vernon, H. J. (2016). New targets for monitoring and therapy in Barth syndrome. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 18(10), 1001–1010. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.204>
- Tyurina, Y. Y., Poloyac, S. M., Tyurin, V. A., Kapralov, A. A., Jiang, J., Anthonymuthu, T. S., Kapralova, V. I., Vikulina, A. S., Jung, M. Y., Epperly, M. W., Mohammadyani, D., Klein-Seetharaman, J., Jackson, T. C., Kochanek, P. M., Pitt, B. R., Greenberger, J. S., Vladimirov, Y. A., Bayir, H., & Kagan, V. E. (2014). A mitochondrial pathway for biosynthesis of lipid mediators. *Nat Chem*, 6(6), 542–552. <https://doi.org/10.1038/nchem.1924>
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- van Werkhoven, M. A., Thorburn, D. R., Gedeon, A. K., & Pitt, J. J. (2006). Monolysocardiolipin in cultured fibroblasts is a sensitive and specific marker for Barth Syndrome. *Journal of lipid research*, 47(10), 2346–2351. <https://doi.org/10.1194/jlr.D600024-JLR200>
- Vangaveti, V., Baune, B. T., & Kennedy, R. L. (2010). Hydroxyoctadecadienoic acids: novel regulators of macrophage differentiation and atherogenesis. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 1(2), 51–60. <https://doi.org/10.1177/2042018810375656>
- Wenzel, T. J., Ranger, A. L., McRae, S. A., & Klegeris, A. (2021). Extracellular cardiolipin modulates microglial phagocytosis and cytokine secretion in a toll-like receptor (TLR) 4-dependent manner. *Journal of neuroimmunology*, 353, 577496. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577496>
- Whalen, M. J., Carlos, T. M., Dixon, C. E., Schiding, J. K., Clark, R. S., Baum, E., Yan, H. Q., Marion, D. W., & Kochanek, P. M. (1999). Effect of traumatic brain injury in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1: assessment of histopathologic and functional outcome. *Journal of neurotrauma*, 16(4), 299–309. <https://doi.org/10.1089/neu.1999.16.299>

- Xu, Y., Kelley, R. I., Blanck, T. J., & Schlame, M. (2003). Remodeling of cardiolipin by phospholipid transacylation. *The Journal of biological chemistry*, 278(51), 51380–51385.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307382200>
- Xu, Y., Malhotra, A., Ren, M., & Schlame, M. (2006). The enzymatic function of tafazzin. *The Journal of biological chemistry*, 281(51), 39217–39224.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M606100200>
- Yoda, E., Hachisu, K., Taketomi, Y., Yoshida, K., Nakamura, M., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakatani, Y., Kuwata, H., Murakami, M., Kudo, I., & Hara, S. (2010). Mitochondrial dysfunction and reduced prostaglandin synthesis in skeletal muscle of Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A2gamma-deficient mice. *Journal of lipid research*, 51(10), 3003–3015.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M008060>
- Zarkovic K. (2003). 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Molecular aspects of medicine*, 24(4-5), 293–303. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(03\)00024-4](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(03)00024-4)
- Zegallai, H. M., & Hatch, G. M. (2021). Barth syndrome: cardiolipin, cellular pathophysiology, management, and novel therapeutic targets. *Molecular and cellular biochemistry*, 476(3), 1605–1629. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-04021-0>
- Zhang, M., Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2002). Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry*, 277(46), 43553–43556.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200551200>