



T.C.

**İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

BEYİN YAŞLANMASINDA ENDOJEN RETROVİRÜSLERİN OLASI ROLÜ

Dr. Abdullah ÖZDEMİR

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Ocak 2025

İSTANBUL



**T.C.
İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

BEYİN YAŞLANMASINDA ENDOJEN RETROVİRÜSLERİN OLASI ROLÜ

Dr. Abdullah ÖZDEMİR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Sadrettin PENÇE

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Ocak 2025

İSTANBUL

ONAY

Abdullah ÖZDEMİR'in Tıpta Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Sadrettin Pençe

İmza:.....

Fizyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Prof.Dr. Ertuğrul Kılıç

İmza:.....

Fizyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Esra Yazar

İmza:.....

Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tarih:....../.../....

YAZAR BİLDİRİMİ

“BEYİN YAŞLANMASINDA ENDOJEN RETROVİRÜSLERİN OLASI ROLÜ” isimli uzmanlık tezinde Dr. Abdullah ÖZDEMİR

- Bu çalışmada adı geçen ilaç, tıbbi cihaz ve laboratuvar malzemelerinin üreticileri ile herhangi bir çıkar ilişkisi yoktur.
- Bu çalışmadan elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak göstermiştir. Tezin yazımı sırasında telif haklarını ihlal edici bir davranışta bulunmamıştır.
- Tez içerisinde başka kaynaklardan kopyalanmış olan kısımları tırnak içerisine alarak ve izin alınan kaynağı belirterek kullanmıştır.

Ocak 2025

Abdullah ÖZDEMİR

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmamı yaparken yardımları ile tez yazımımı kolaylaştıran tez danışmanım Prof. Dr. Sadrettin PENÇE ve Doç. Dr. Birsen Elibol'a, deneylerin yapılmasında ve analizlerinde desteğini esirgemeyen Ar. Gör. Nur Damla KORKMAZ'a, destek veren diğer tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma, tez yazımında maddi manevi yardımını hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Abdullah ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

YAZAR BİLDİRİMİ	vii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 . RETROTRANSPOZONLAR.....	3
2.1.1. Sinsitin proteinlerinin fizyolojik işlevleri.....	5
2.1.2. Endojen retrovirüslerin susturulması.....	5
2.1.2.1. DNA metilasyonu	5
2.1.2.2. TRIM28	6
2.1.2.3. SETDB1.....	6
2.1.3. Endojen retrovirüslerin uyanması.....	7
2.1.4. Endojen retrovirüs aracılı inflamasyon	7
2.1.5. Endojen retrovirüslerin hastalıklarda ekspresyonu	9
2.2. YAŞLANMA	10
2.2.1. Yaşlanma ve epigenetik değişiklikler.....	12
2.2.2. Klotho proteini ve yaşlanma.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. GEREÇ.....	15
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	15
3.1.2. Kullanılan malzemeler.....	15
3.2. YÖNTEM.....	16
3.2.1. Morris su labirenti (MWM) testi	16
3.2.2. Dokuların alınması	17
3.2.3. Uygulanan protokoller	17
3.2.3.1. RNA izolasyonu.....	17
3.2.3.2. RNA miktarının ölçülmesi.....	18
3.2.3.3. cDNA sentezi	18
3.2.3.4. Primer tasarlama	19

3.2.3.5. qPCR.....	22
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	23
4. BULGULAR	24
4.1. Morris su labirenti testi	24
4.2. ERV ve ilişkili genlerin ekspresyonlarındaki değişimler.....	25
4.3. İnflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonlarındaki değişimler	28
4.4. Yaşlanma ilişkili klotho geninin ve beyin hasarı belirteci GFAP geninin ekspresyonlarındaki değişimler.....	30
5. TARTIŞMA.....	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
EKLER.....	67
EK-1: ETİK KURUL ONAYI	67
EK-2: TURNİTİN İNTİHAL RAPORU.....	68

KISALTMALAR

ALS: Amyotrofik lateral skleroz

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CT: Cycle treshold

COX-2: siklooksijenaz-2

DTİ: Diffüzyon tensör görüntüleme

EBV: Epstein bar virus

ERE: Endojen retroviral element

ERV: Endojen retrovirüsler

ESC: Embriyonik kök hücreler

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

GFAP : Gliyal fibriler asidik protein

IL-6: İnterlökin-6

KRAB-ZFP: Krüppel-associated box zinc finger proteins

KO: Knock out

LINE-1: Long interspersed nuclear element-1

LTR: Uzun terminal tekrar

mESC: Fare embriyonik kök hücreleri

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

ORF: Açık okuma çerçevesi

SETDB1: SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1

SINE: Kısa aralıklı nükleer elementler

ssRNA: Tek iplikli RNA

TLR: Toll-like receptor

TRIM28: Tripartite motif containing 28

ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Transpozonların sınıflandırılması	3
Şekil 2.2: Retrovirüslerin endojen retrovirüsleri oluşturması	3
Şekil 2.3: LINE-1 ve HERV-K.....	4
Şekil 2.4: cGAS-STING ile NF-kB	9
Şekil 2.5: Sistemik yaşlanmanın 12 özelliği	11
Şekil 2.6: Klotho eksikliğinin sebep olduğu bozukluklar	14
Şekil 3.1: Thermo Fisher Multiskan GO	18
Şekil 3.2: SynB genetik bilgiler sayfası	19
Şekil 3.3: Setdb1 genetik bilgiler sayfası.....	20
Şekil 3.4: Erime eğrisi.....	22
Şekil 3.5: Bio-Rad RT-PCR cihazı	23
Şekil 4.1: Morris su labirenti testi	24
Şekil 4.2: SYNB ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi	25
Şekil 4.3: LINE-1 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi.....	26
Şekil 4.4: TRIM28 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi	27
Şekil 4.5: SETDB1 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi.....	27
Şekil 4.6: IL-6 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi	28
Şekil 4.7: TNFa ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi.....	29
Şekil 4.8: COX2 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi	29
Şekil 4.9: Klotho ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi	30
Şekil 4.10: GFAP ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi	31

ÖZET

BEYİN YAŞLANMASINDA ENDOJEN RETROVİRÜSLERİN OLASI ROLÜ

Endojen retrovirüsler insan genomunun yaklaşık %8'ini oluşturur. Çok eski dönemlerde atalarımızın germ hücrelerini enfekte etmeleri ile nesilden nesile aktarılabilmiş bu retroviral genler büyük oranda mutasyonlara uğrayarak ve çeşitli epigenetik mekanizmalar ile bastırılmış olsa da çeşitli durumlarda veya yaşlanma sürecinde tekrar aktifleşip hastalık patogenezinde rol oynayabilmektedir. Fakat bu baskılanma yaşla birlikte azalmaktadır. Endojen retrovirüsler özellikle inflamatuvar süreçleri güçlendirmeleri nedeni ile birçok otoimmün hastalığın patogenezinde etkin rol oynamaktadırlar. Gerek gelişimsel gerek bağışıklık sisteminin düzenlenmesi açısından hem gen regülasyonunda hem de protein sentezinde rol alan retroviral genlerin yaşlanma sürecinde aktifleşerek özellikle nörodejenerasyon patogenezinde etken bir faktör olarak davranabileceğine dair çalışmalar vardır. Endojen retrovirüsler tarafından kodlanan sinsitin-1 proteini insanda trofoblastların sinsityotrofoblastlara dönüşümünde ve myoblastların birleşmesinde görev aldığı bilinen bir proteindir. Bu proteinin bağışıklık sistemini uyardığı ve multiple skleroz, şizofreni gibi hastalıklarda ekspresyonunun arttığı gösterilmektedir. Beyin yaşlanmasının hangi aşamada başladığı yeterince araştırılmamış bir konudur. İnsanlarda yapılan çıkarımsama ve işlem hızı içeren bilişsel testlerde 30'lu yaşlardan itibaren 20'li yaşlardaki bireylere göre gerilemeler saptanmıştır. Fakat bu yaşlarda yaşlanmanın başlayabileceğine dair yeterince çalışma bulunmamaktadır. Diffüzyon MR ile yapılan çalışmalarda ak madde bütünlüğündeki bozulmaların 30'lu yaşlarda başladığı gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalarda ise 12 aylık farelerde daha genç farelere göre davranış testlerinde gerilemeler kaydedilmiştir. Ayrıca bu hayvanların beyin kesitlerinde de yaşlanmaya dair çeşitli belirteçlerin oluşmaya başladığı gösterilmiştir. Endojen retrovirüslerin 30'lu yaşlardaki bilişsel fonksiyonlarda gerilemeye sebep olan beyin yaşlanmasını başlatan faktörlerden olup olmadığını araştırmayı amaçladığımız çalışmamızda 12 aylık (n=5), 4 aylık (n=7) ve 1 aylık (n=7) sıçanlara morris

su labirenti testi yapıldıktan sonra sıçanların beyinlerinde sinsitin-2'nin faredeki analogu olan sinsitin-b (SYN-B), en yaygın retrotranspozon olan long interspersed nuclear element-1(LINE-1), bunların inflamatuvar süreçlerle ilişkisini belirlemek için interleukin-6 (IL-6), tumor nekroz faktör-alfa (TNF-a), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve gliyal fibriler asidik protein (GFAP), retrotranspozonların ve endojen retrovirüslerin ekspresyonunu baskılayan proteinler olan TRIM28 ve SETDB1 ve son olarak yaşlanmada ekspresyonu azalan klotho genlerinin ekspresyonları RT-PCR kullanılarak gruplar arasında karşılaştırıldı. LINE-1 ve SYN-B seviyelerinin 12 aylık grupta 1 aylık gruba göre anlamlı seviyede arttığı ve bu artışın IL-6 seviyesindeki artışla paralel olduğu gösterildi. Bununla birlikte SETDB1 ekspresyonunda fark görülmezken TRIM28 ekspresyonunun 12 aylık sıçanlarda 1 aylık gruba oranla anlamlı derecede düşük olduğu kaydedildi. Diğer yandan, COX-2 ve TNF-a seviyelerinde ise gruplar arası anlamlı fark bulunmazken, klotho seviyesinin yaşla birlikte anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Morris su labirenti testinde ise gruplar arasında bir fark gösterilemedi. Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, endojen retrovirüslerin hedeflenmesinin beyin yaşlanmasını yavaşlatma ve nörodejeneratif süreçleri hafifletme konusunda terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir. Bu retroelementlerin beyinde yaşlanmaya nasıl katkıda bulunduğunu anlamak, yaşa bağlı bilişsel gerileme ve nörodejeneratif hastalıklar için yeni tedavilerin önünü açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bilişsel yaşlanma, endojen retrovirüsler, polimeraz zincir reaksiyonu, inflamasyon

ABSTRACT

THE POSSIBLE ROLE OF ENDOGENOUS RETROVIRUSES IN BRAIN AGING

Endogenous retroviruses make up approximately 8% of the human genome. Having been transmitted from generation to generation by infecting the germ cells of our ancestors in ancient times, these retroviral genes have largely undergone mutations and have been suppressed by various epigenetic mechanisms. However, in certain conditions or during the aging process, they can be reactivated and play a role in disease pathogenesis. This suppression decreases with age. Endogenous retroviruses are particularly active in the pathogenesis of many autoimmune diseases by strengthening inflammatory processes. Studies suggest that retroviral genes, which play roles in both gene regulation and protein synthesis during developmental and immune regulatory processes, may become activated in the aging process and act as a contributing factor to neurodegeneration. The syncytin-1 protein encoded by endogenous retroviruses is known to be involved in the transformation of trophoblasts into syncytiotrophoblasts and in the fusion of myoblasts in humans. This protein has been shown to stimulate the immune system and is increased in diseases such as multiple sclerosis and schizophrenia. It has not been sufficiently investigated at which stage brain aging begins. In cognitive tests involving reasoning and processing speed in humans, declines have been detected from the age of 30 onward compared to individuals in their 20s. However, there are not enough studies to definitively state that aging begins at these ages. Diffusion MRI studies have shown that deterioration in white matter integrity starts in the 30s. Studies in mice have found that 12-month-old mice show more pronounced declines in behavioral tests compared to younger mice. Additionally, various aging markers have been shown to appear in the brain sections of these animals. In our study, which aimed to investigate whether endogenous retroviruses might be among the factors initiating brain aging that leads to cognitive decline in the 30s, we conducted the Morris water maze test on 12-month-old (n=5), 4-month-old (n=7), and 1-month-old (n=7)

rats. Afterward, we used RT-PCR to compare the expression levels of syncytin-b (SYN-B)—the mouse analog of syncytin-2—along with the most common retrotransposon, long interspersed nuclear element-1 (LINE-1); interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF-a), cyclooxygenase-2 (COX-2), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) (to determine their relationship with inflammatory processes); TRIM28 and SETDB1 (proteins that suppress the expression of retrotransposons and endogenous retroviruses); and finally the klotho genes, whose expression decreases with aging. It was shown that the levels of LINE-1 and SYN-B were significantly increased in the 12-month-old group compared to the 1-month-old group, and this increase was parallel to the increase in IL-6 levels. Although no difference was observed in SETDB1 expression, TRIM28 expression was significantly lower in the 12-month-old rats than in the 1-month-old group. On the other hand, no significant difference was found among the groups in COX-2 and TNF-a levels, whereas klotho levels were observed to increase significantly with age. No difference was detected among the groups in the Morris water maze test. In conclusion, our findings indicate that targeting endogenous retroviruses may hold therapeutic potential in slowing brain aging and alleviating neurodegenerative processes. Understanding how these retroelements contribute to aging in the brain paves the way for new treatments for age-related cognitive decline and neurodegenerative diseases.

Key words: Cognitive aging, endogenous retroviruses, polymerase chain reaction, inflammation

1. GİRİŞ

Yaşlanma denilince genelde 60'lı yaşlar ve sonrası anlaşılır. Ancak beyin yaşlanması olarak bakılacak olursa, 30'lu yaşlardan itibaren bilişsel testlerde gerilemelerin başladığı birçok çalışmada gösterilmiştir (1–3). Diffüzyon MR ile yapılan çalışmalarda 30'lu yaşlardan itibaren beyin ak maddesinin bütünlüğünde bozulmalar olduğu gösterilmiştir (4,5). Ayrıca başka bir çalışmada ise bu ak madde bütünlüğündeki bozulma ile bilişsel testlerdeki gerilemenin paralel seyrettiği bildirilmiştir (6). Beyin yaşlanmasının 30'lu yaşlarda başladığına dair elde edilen verilere rağmen bu dönemin yaşlanma açısından moleküler olarak incelenmesi büyük oranda göz ardı edilmiş bir konudur (3).

Endojen retrovirüsler (ERV) milyonlarca yıl öncesinde germ hücrelerin enfekte edilmesi ile nesilden nesile aktarılmış retroviral genlerdir. Bu genler gen regulasyonu, plasenta oluşumu, embriyolojik gelişim, bağışıklığın düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik görevler edinmişse de epigenetik mekanizmalar ve çeşitli mutasyonlar yoluyla büyük oranda susturulmuştur (7–9). ERV'lerin tam genomik yapısı, gag, pro, pol ve env genlerinden oluşur ve bunlar iki uzun terminal tekrar ile çevrilidir. Bu genlerden gag, kapsid, nükleokapsid ve matris proteinini; pro, proteazı; pol, ters transkriptaz ve integrazı; env ise zarf proteinini kodlar (7). Bu proteinler viral yapılara benzerlikleri nedeni ile doğal bağışıklık sistemini pattern tanıma reseptörleri üzerinden uyarabilmektedir (10).

ERV'lerin baskılanmasında rol alan histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu mekanizmaları yaşla birlikte zamanla bozulabilir ve bu gen bölgeleri ekspresyona uğrayabilir (11). Açığa çıkan endojen retroviral elementlerin DNA bütünlüğüne zarar verebileceği veya çeşitli protein ve genetik materyaller ile inflamasyona yol açabileceği bilinmektedir (12). Gelişen bu inflamasyon ve DNA hasarının ise yaşlanmayı ilerletici bir faktör olduğu birçok çalışmada ileri sürülmüştür (12,13).

Multiple skleroz (MS), amyotrofik lateral skleroz (ALS), şizofreni, alzheimer gibi birçok nörolojik ve psikiyatrik rahatsızlıkta tespit edilen endojen retrovirüslerin bu hastalıkların patogenezinde yer alabileceği bildirilmiştir (13,14). Çeşitli çevresel faktörler ve yaşlanmanın etkisiyle ekspresyonu aktiveleşebilen endojen retrovirüslerin 30'lu yaşlarda ortaya çıkan MS, ALS ve şizofreni rahatsızlıklarında etkili olması (14) yine bu yaşlarda

gelişen ak madde bütünlüğündeki bozulma ve bilişsel fonksiyonlardaki gerilemeyi açıklayabilir.

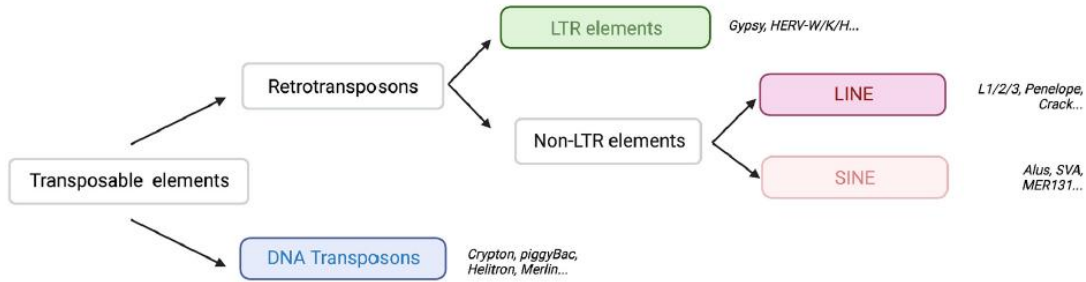
Endojen retrovirüslerin yaşla birlikte değişimi ve bunun yaşlanma ile ilişkisini incelediğimiz çalışmamızda 1, 4 ve 12 aylık sıçanlarda morris su labirenti testinden sonra dekapitasyon yapılarak frontal korteksten izole edilen dokudan endojen retrovirüslerden olan Syn-B, retrotranspozonlardan olan LINE-1 ekspresyon seviyelerini, bu elementlerin epigenetik susturulmasında rol alan TRIM28 ve SETDB1 ekspresyon seviyelerini, inflamasyon açısından değerlendirmek için COX-2, TNF-a, IL-6 ve GFAP ekspresyon seviyelerini ve yaşlanma açısından değerlendirmek için klotho ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile ölçüp karşılaştırdık.



2. GENEL BİLGİLER

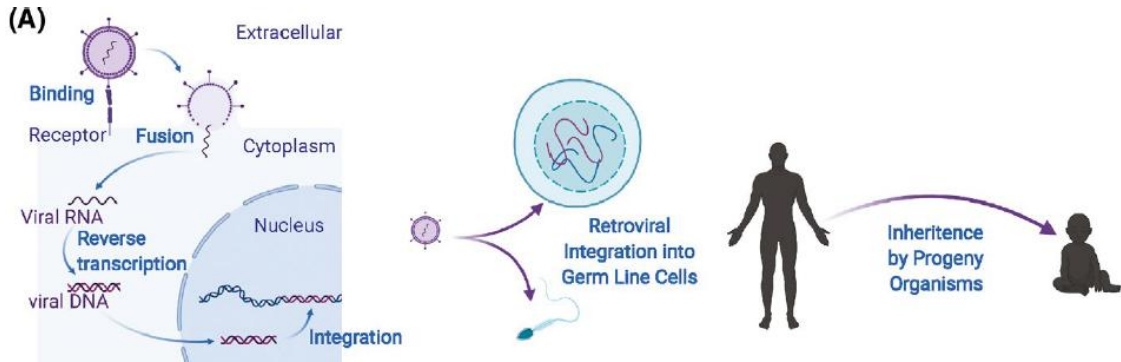
2.1. RETROTRANSPOZONLAR

Retrotranspozonlar, "kopyala-ve-yapıştır" mekanizmasıyla hareket eden genetik materyallerdir. Retropozisyon denen bu mekanizmada RNA ara ürünleri cDNA'lara çevrilerek transpozisyon gerçekleştirilir. Retrotranspozonlar uzun terminal dizi (LTR) varlığına bağlı olarak sınıflandırılır. LTR retrotranspozonları, aynı zamanda endojen retrovirüsler (ERV) olarak da bilinir. ERV'ler insan genomunun yaklaşık %8'ini oluşturur. (Şekil 2.1) (12).



Şekil 2.1: Transpozonların sınıflandırılması

ERV'ler germ hücrelerinin retrovirüsler ile enfekte edilmesi ile konak genetiğine yerleşmişlerdir. Bu sayede nesilden nesile aktarılabilmişlerdir (Şekil 2.2) (15).

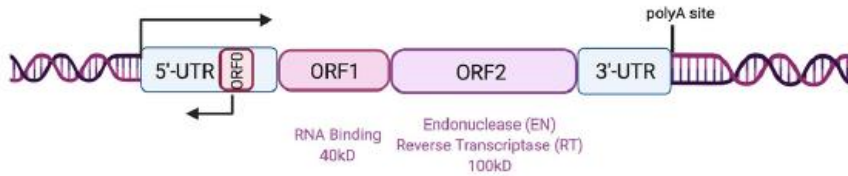


Şekil 2.2: Retrovirüslerin endojen retrovirüsleri oluşturması

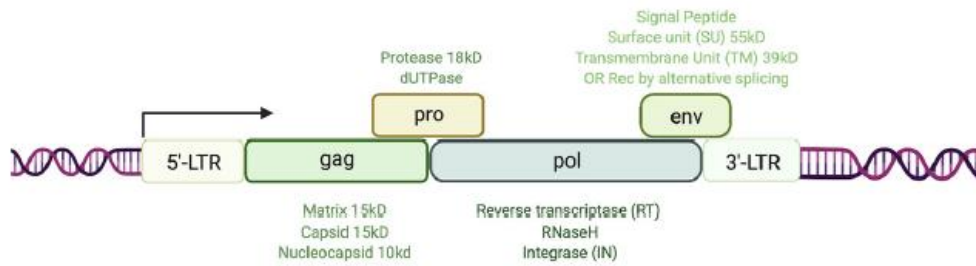
ERV'ler nokta mutasyonları, kısaltmalar ve iç rekombinasyon gibi mutasyonların gerçekleşmesiyle birçok fonksiyonlarını kaybederek atıl kalmışlardır. Bu yüzden insanlarda retrotranspozisyona yetenekli olmadıkları düşünülmektedir (16). Fakat bazı insan ERV'leri (HERV'ler) fizyolojik fonksiyonlar kazanmıştır. Bazı HERV'ler embriyogenez sırasında, gelişimsel ilerleme için transkripsiyonel yeniden düzenlemede rol alır (17–20). Sinsitin ve PEG10 gibi ERV'ler plasenta gelişiminde rol alır (21,22). HERV-K (HML-2), transkripsiyonel olarak en aktif ve en çok incelenmiş HERV'dir ve sağlam açık-okuma çerçevesine (ORF) sahiptir (23,24).

non-LTR retrotranspozonlar insandaki mobil genetik elementlerin çoğunluğunu oluşturur. Non-LTR retrotranspozonlar (yaklaşık 6 kB uzunluğunda), 5'UTR (sense ve antisense promotörler içeren kodlanmayan bölge), iki açık okuma çerçevesi (ORF1 ve ORF2) ve bir poli(A) bölgesi içeren 3'UTR'den oluşur. ORF1, bir RNA bağlayıcı protein kodlarken, ORF2p endonükleaz ve ters transkriptaz aktivitelerine sahiptir. İnsan ve primat LINE-1'i ayrıca 5'UTR'de bulunan antisens bir ORF olan ORF0'ı kodlar. LTR (HERV-K/HML-2) retrotranspozonları ise iki LTR ile çevrilidir (Şekil 2.3) (12,25).

Non-LTR retrotransposon (LINE-1) - 6KB



LTR retrotransposon (HERV-K/HML2) - Type 2 - 10KB



Şekil 2.3: LINE-1 ve HERV-K

Retrotranspozonlar arasında tek otonom retrotranspozon long interspersed nuclear element-1 (LINE-1)'dir. LINE-1 tarafından kodlanan ters transkriptaz diğer retrotranspozonların transpozisyonunu gerçekleştirebilir (26–29). LINE-1 insan genomunun

yaklaşık %16,9'unu oluşturur. Genomda retrotranspozisyon yeteneğini koruyan yaklaşık 80-100 tam uzunlukta LINE-1 bulunur (30,31). LINE-1 retrotranspozisyon olayları intra-kromozomal delesyonlara veya duplikasyonlara ve daha nadiren inter-kromozomal translokasyon olaylarına yol açabilir (32–35).

2.1.1. Sinsitin proteinlerinin fizyolojik işlevleri

Sinsitin -1 ve sinsitin -2 plasenta oluşumu sırasında sinsityotrofoblastın oluşumunu düzenler. Sinsitin -1 HERV-W ailesinden gelen bir gen ile kodlanır, yüzey ve transmembran alt birimlerinden oluşur. Yüzey alt birimi, sinyal peptidini içerirken, transmembran alt birimi, füzyon peptidini ve immünosupresif alanı içerir (36,37). Sinsitin-2, füzyonik aktiviteye sahip bir insan zarf proteinidir ve HERV-FRD ailesinden gelen bir gen tarafından kodlanır (38). Alt birimlerin işlevleri ve hücre füzyon mekanizması, sinsitin-1'e benzer.

2.1.2. Endojen retrovirüslerin susturulması

ERV'lerin transkripsiyonel susturulmasındaki bilgilerimiz büyük oranda ekzojen retrovirüslerin transkripsiyonel susturulmasındaki mekanizmalara dayanmaktadır (39). ERV'ler baskılayıcı histon metilasyonlarından zengin heterokromatin bölgelerde bulunur (40,41). H3K9me3 inaktif ekzojen ve endojen retroviral elementler ile yakın ilişkideki bir histon modifikasyonudur (40,42–44). Bu modifikasyonun oluşumunda görevli metiltransferazlardan biri Setdb1'dir (9). Ancak somatik hücrelerde baskılanma DNA metilasyonu ile olmaktadır (45).

2.1.2.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonunun ERV üstündeki etkilerini araştırmak için DNA metiltransferaz KO fare modelleri geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda Dnmt3L eksikliğinde testiste bir endojen retrovirüs olan IAP ekspresyonu artarak infertiliteye neden olmuştur (46). Dnmt1 eksikliği embriyonik kök hücrede (ESC) ERV ekspresyonunda genel ve kısa süreli baskılanmanın kalkmasına (47–49) somatik hücrelerde ise IAP ekspresyonu artışına neden olmuştur. ESC'lerde Dnmt3a ve Dnmt3b'nin tek başına eksikliğinde ERV metilasyonunda ciddi bir değişim gelişmez iken ikisinin yokluğunda ise embriyolojik bozukluklar oluşmuştur (9,50).

2.1.2.2. TRIM28

Tripartite motif containing 28 (TRIM28) özellikle embriyolojik gelişim dönemlerinde pluripotent hücrelerde yüksek seviyelerde ekspresyona uğrayan ve çoğu hücrede aktif bir ko-represör proteindir (51,52). TRIM28 hem gelişmekte olan beyinde hem de erişkin beyinde yüksek oranda eksprese olur (53–55). Heterozigot delesyon sonrası erişkin hayvanlarda hiperaktivite benzeri davranışlar görülmektedir (54). Önbeyin nöronlarında TRIM28 delesyonu kompleks davranışsal bozukluklara yol açmıştır (55).

TRIM28 diğer baskılayıcı kromatin düzenleyen faktörleri görevlendiren bir iskelet rolü oynar. Histon metiltransferaz (56), histon deasetilaz NuRD kompleks (57), heterokromatin protein 1 (58) gibi proteinler ile epigenetik baskılanmada rol alır. TRIM28 aracılı transkripsiyonel baskılanma H3K9me3 ile karakterizedir ve muhtemelen heterokromatin protein 1 aracılığı ile genom boyunca yaygın alanlarda gerçekleşebilmektedir (59). Erken gelişim dönemi boyunca bu baskılanma stabil bir yapı kazanır ve TRIM28 yokluğunda da sürdürülebilir (60).

Önceden TRIM28'in transpozonları baskılamasının sadece erken embriyolojik gelişim döneminde gerekli olduğu düşünülüyordu. Ancak fare nöral progenitör hücrelerinde TRIM28'in delesyonu ile ERV ve transpozonlar tekrar aktifleşebilmiştir (54). Devam eden çalışmalarda TRIM28 insan nöroprogenitör hücrelerde transpozonlara bağlanarak histon metilasyonu yaptığı ve H3K9me3 yapısını oluşturduğu gösterilmiştir (53).

2.1.2.3. SETDB1

İnsan SETDB1 proteini 1291 amino asitten oluşur ve 143 kDa'dır. 3'lü Tudor domaini içerir ve N-terminal kısmında SET kısmının takip ettiği metil-CpG bağlanma domaini bulunur. Tudor domainleri metilasyona uğramış lizin ve arjinini tanıyabilmesiyle bilinir (61,62). SETDB1 3'lü Tudor domaini H3 histonunun k14 asetilasyonu ve k9 metilasyonu ile modifiye edilmiş kuyruğuna bağlanır (56). C-terminal bölgesi, H3K9'a özgü lizin metilasyonundan sorumludur (56,63). TRIM28, SETDB1 ve KRAB-ZFP proteinleri ile kompleks oluşturarak SETDB1'in retroelementlere yerleşmesini sağlar (52,56,64).

SETDB1 erken embriyogenezis ve germline gelişimi için gereklidir (65,66). Blastokist fazında ve primordiyal germ hücresi DNA'larında hipometilasyon vardır. Bu dönemde SETDB1, DNA metilasyonu azaldığında alternatif retroelement baskılama yolu oluşturur. Bu durumla uyumlu bir şekilde GSK3 ve ERK/MEK inhibitörleri ile fare ESC'lerde (mESC) global DNA hipometilasyonu geliştirildiğinde SETDB1 aracılı

retroelement baskılanması dramatik bir şekilde artmıştır (67). Erişkin Setdb1 knockout (KO) farelerde yapılan çalışmalarda SETDB1'in somatik hücrelerde de retroelement baskılamada rol aldığı gösterilmiştir. Ayrıca bu durum B lenfosit (68), T lenfosit (69) ve beyin (70) dokularında da bildirilmiştir.

2.1.3. Endojen retrovirüslerin uyanması

Normal koşullarda ERV'ler epigenetik mekanizmalar ile susturulur. Fakat bazı etkenler sonrası bu epigenetik baskılanma kalkabilir ve ERV'ler reaktivasyona uğrayarak hastalıkların başlamasına veya ilerlemesine yol açabilir .

ERV'lerin epigenetik baskılanmasında birçok mekanizma bulunsa da çevresel etkenler ile bu baskılanmalar ortadan kalkabilir. Örneğin melanoma hücrelerinde, epigenetik değişimlere yol açtığı bilinen ultraviyole ışınların etkisi ile HERV-K pol genin transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleşmiştir (71). Bazı beslenme ilişkili etkenlerin de epigenetik etkileri bilinmektedir. Örneğin beta-karoten'in HERV-W'nin (syncytin-1) DNA metilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (72). Buna ek olarak epigenetik düzenleyiciler üzerinde etkisi olan ilaçlar da ERV ekspresyonunu etkileyebilmektedir. Örneğin HDAC inhibitörü olan valproik asit, birçok nörolojik ve psikiyatrik hastalıkta kullanılmaktadır. Valproik asit hücre serilerinde 1 ve 2. sınıf ERV'lerin ekspresyonunu artırmıştır (73).

Epstein bar virus (EBV), herpes simplex virus-1 gibi bazı viral enfeksiyonlar da HERV ekspresyonlarını etkileyebilmektedir (74). Örneğin, B hücrelerinin EBV'ye maruziyeti sonrası genom boyunca LTR dizileri aktiflenmiştir. İnsan fibroblastları influenza A ile enfeksiyon sonrasında HERV-W transaktivasyonu göstermiştir (75).

2.1.4. Endojen retrovirüs aracılı inflamasyon

Ekzojen retrovirüslere benzer şekilde ERV'lerin hayat döngüsünde doğal bağışıklığı uyarabilecek nükleik asit ve proteinler oluşabilmektedir. ERV tarafından üretilen tek iplikli RNA (ssRNA), ssRNA sensörü olan Toll-like reseptör (TLR) 7 ve TLR8'i uyarabilmektedir. (76,77). ERV genlerinin reverse transkripsiyonu da doğal bağışıklık sensörlerini uyarabilmektedir. Buna dair kanıt ise reverse transkriptaz inhibitörü kullanılarak yapılan insan ve hayvan çalışmaları ERV veya LINE-1'nin doğal bağışıklığı uyarmış olabileceğinin gösterildiği çalışmalarda mevcuttur (78–81). ERV'lerin iki yönlü transkripsiyonu ile oluşan çift iplikli RNA'lar TLR3 veya MDA5'i uyarmıştır (82,83).

Epigenetik baskılayıcı TRIM28'in nöral progenitör hücrelerde genetik delesyonu ERV'den gelişen intrasisternal A partiküllerinin birikimine neden olarak transgenik farelerin beyinlerinde inflamasyona yol açmıştır (84). Pro-B hücrelerinde epigenetik baskılayıcı SETDB1'in silinmesiyle ERV kaynaklı protein birikimine bağlı ölüm gösterilmiştir (85).

Potansiyel immünolojik aktivite gösteren nükleik asitler LINE-1'in ters transkriptazı ORF2p ile oluşabilmektedir (86). LINE-1 derepresyonu ile artan ORF2p aktivitesi interferon cevabı ve inflamasyonu tetikleyerek senesens oluşturmuştur (87,88). Ayrıca ORF2p, endonükleaz aktivitesi ile DNA'nın çift ipliğine hasar verip cGAS-STING yolağını aktifleyerek de interferon cevabı oluşturabilmektedir (89,90).

Belli başlı endojen retroviral zarf glikoproteinleri insan ve farelerde süper antijen etkisi gösterebilmiştir (91). Faredeki bazı MMTV provirüsleri ile insanda HERV-K18 buna örnek verilebilir (92–95). Fizyolojik koşullarda büyük oranda baskılanmış olan endojen retroviral element (ERE) kaynaklı proteinler, immünolojik tolerans gelişiminde pozitif seçim sırasında tanınmayarak bağışıklık sistemi tarafından yabancı protein olarak algılanıyor olabilir. ERE proteinlere karşı immün tolerans gelişmemesi bu proteinlerin ekspresyonları durumunda adaptif yanıtlara ve inflamatuvar reaksiyonlara yol açabilir. ERE ile kodlanan proteinlerin bağışıklığı uyarabilme potansiyelini arttıran bir diğer özellikleri ise kendiliğinden birleşerek virüs partikülleri, kapsit, ribonukleoproteinler gibi yapılara dönüşebilmeleridir. Labaratuvar farelerinde birçok defektif ERV partikülleri birleşerek infektif retrovirüslere dönüşebilmiştir (96). İnsan plasentasında ve teratokarsinoma hücre kültüründe HERV-K provirüslerine ait retroviral partiküller gözlenmiştir (97–101). ERV kaynaklı proteinler HLA-1 üzerinde diğer insan proteinlerinden çok ekzojen virüs proteinlere benzer epitoplar göstermiştir (102).

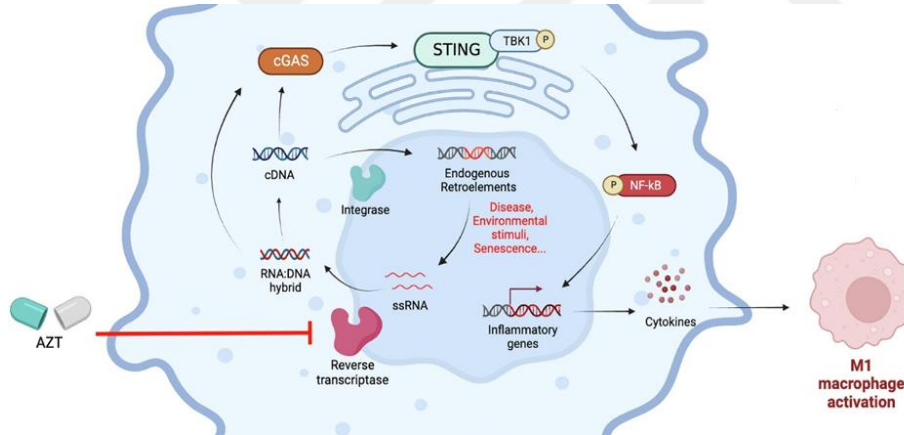
Sinsitin-1'in insan monositlerinde TLR-4'e bağlanarak monositleri aktive edebildiği gösterilmiştir (103,104). Bu çalışmada ayrıca dendritik hücrelerin de HERV-W env proteinini ile tetiklenerek Th1 gelişimini desteklediği bildirilmiştir. İnsan ve fare mikrogliaları HERV-W env proteinine maruziyeti sonrasında proinflamatuvar sitokin, kemokin ve nitrik oksit seviyesini yükseltmiştir. Bu inflamatuvar polarizasyon aksonal hasara yol açmıştır (105).

HERV-W env proteinini aracılı TLR4'ün uyarılması ile gelişen nitrik oksit stresinin, oligodentrositlerin farklılaşma sürecini bozduğu ve aksonal myelinizasyona engel olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle ERV aktivitesinin doğal olarak gelişen tamir mekanizmasını bozduğu ileri sürülmüştür (106). HERV-W env ve TLR4 inhibitörü verildiğinde HERV-W env aracılı etkilerin azalması, env proteinin etkilerini TLR4 üzerinden gerçekleştirdiğini

düşündürmektedir (107–109). Anti-Env antikorı GNBAC1/Temelimab ile yapılan klinik çalışmada MS hastalarındaki olumlu gelişmeler, HERV-W env'in mikrogial akson hasarı gelişmesinde ve myelin yenilenmesinin önlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (110).

ERV'lerin bağışıklık sisteminde adjuvan olarak etki ettiği ve bağışıklık cevabını arttırdığı, bu yolla bağışıklık cevabında kontrol bozukluğuna yol açtığı düşünülmektedir. Buna dair kanıt ise farede geliştirilen ensefalomyelitin GNBAC1/Temelimab ile hafifletildiği çalışmada da gösterilmiştir (111).

Ters transkriptaz ile sentezlenen RNA:DNA hibritleri daha sonra sitozolik nükleik asit sensörü cGAS'ı aktive eder. Aktivasyon sonrasında cGAS, STING'i uyarır, bu da TBK1'i göreve alır ve NF- κ B moleküllerini fosforile eder. Fosforile edilmiş NF- κ B kompleksi daha sonra çekirdeğe girer ve pro-enflamatuar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi) salınımını teşvik eder, bu da makrofajların M1 fenotipine polarizasyonuna yol açar. Bir ters transkriptaz enzim inhibitörü olan azidothymidine, bahsedilen enflamatuar yolları engeller (112) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: cGAS-STING ile NF- κ B

2.1.5. Endojen retrovirüslerin hastalıklarda ekspresyonu

Multiple skleroz demiyelinizasyon ile karakterize otoimmün ve kronik bir merkezi sistem hastalığıdır (113). MS hastalarının BOS (114,115) ve serumunda (116,117) HERV-W'ye yakınlığı olan retroviral benzeri diziler elde edilmiştir (118). Hastalığın aktif fazında olan MS hastalarının periferik mononükleer hücrelerinde sağlıklı insanlara ve remisyon halindeki MS hastalarına göre hastalığın ağırlığı ile korele artmış HERV-W proteini

gösterilmiştir (119). HERV-W aktivitesi MS hastalarında 1.5 ila 3 kata kadar yüksek bulunmuştur (114,117,120–126). Artmış HERV-W aktivitesi sklerotik plaklarda (120,127) ve periferik mononükleer hücrelerinde (121–123,128) gösterilmiştir. Ancak MS hastalarında artmış HERV-W env seviyesi gösterilemeyen çalışmalar da vardır (129).

Fareye myelin oligodendrosit glikoproteinini ile mikobakteriyel lizat birlikte verilerek miyelin glikoproteinine karşı otoimmün reaksiyon oluşturulabilir. MS modeli olarak kullanılan bu modelde mikobakteriyel lizat yerine HERV-W env proteinini verildiğinde de MS benzeri patoloji gelişmesi HERV-W env proteinin otoimmün hastalıklarda rol alabileceğini göstermiştir (111). Ayrıca HERV-W Env proteinleri ile myelin oligodendrosit glikoproteinini ve myelin basic protein-1 arasında çapraz reaksiyon gelişimine neden olabilecek 6 epitop gösterilmiştir (123,124,130).

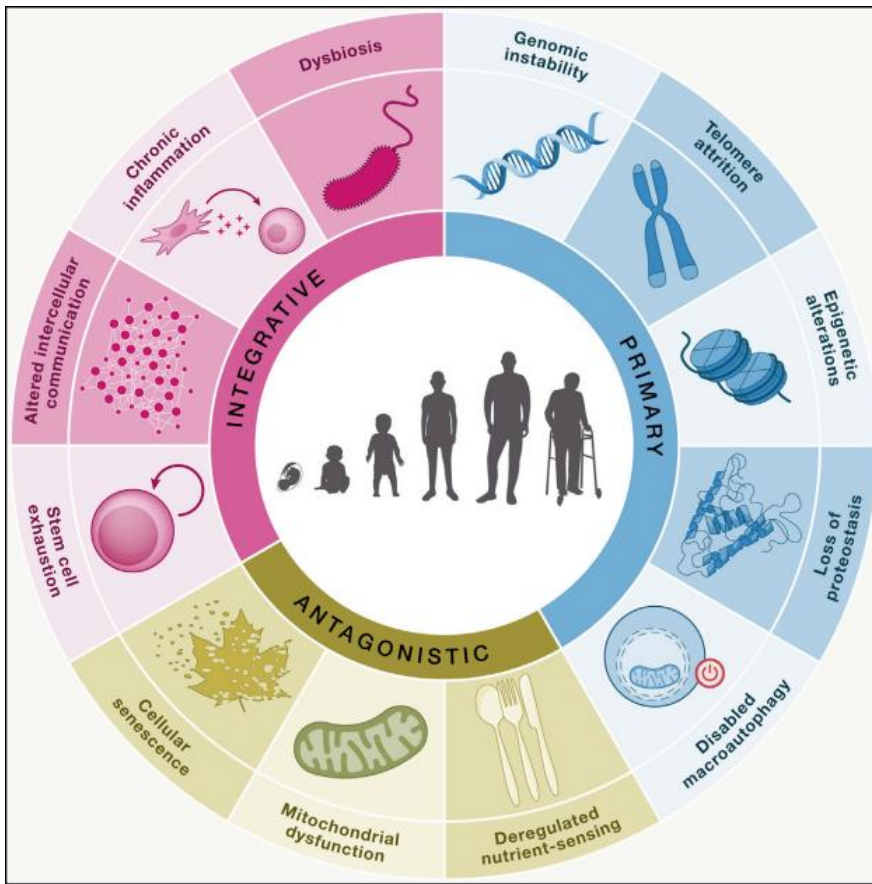
ALS hastalığı toplumda 100.000’de 4-8 arasında görülen ve motor korteks ve motor nöronları tutan bir hastalıktır. ALS hastalığında neredeyse bütün hastalarda ortak olan patoloji RNA bağlayıcı protein olan TARDBP/TDP-43’in motor korteks ve spinal kordda motor nöronlarda birikmesidir (131,132). Hastalığın patolojisinde mikrogliya ve astrosit aktivasyonu ile T hücre infiltrasyonu ve aşırı sitokin salınımı bulunur (133). Sağlıklı kontrole göre ALS hastasında artmış ters transkriptaz aktivitesi birçok çalışmada gösterilmiştir (134–139). HERV-K Env proteininin motor nöronlarda transgenik overekspresyonunun yapıldığı farede ALS benzeri semptomlara yol açması HERV-K ile ALS arasında bağlantı olabileceğini desteklemektedir (140). 29 ALS hastasında yapılan antiretroviral tedavide kan HERV-K seviyesi düşen hastalar, semptomlarda iyileşme ve hastalığın ilerlemesinde yavaşlama göstermiştir (141). TDP-43 overekspresyonu yapılan drosophila modelinde transpozon upregulasyonu ile nöral ve glial hücre ölümü gerçekleşmiştir. Nöral ve glial hücre ölümleri drosophilada en aktif transpozon olan gypsy’nin knockdownu ile hafiflemiştir (142).

2.2. YAŞLANMA

Mevcut teorilerin yaşlanma tanımları farklı özellikler içermektedir. Bazıları, yaşlanmanın birincil özelliği olarak hasar birikimini vurgular (143–151). Yaşlanmada diğer tema ise fonksiyonel kapasitelerde düşüştür (152–156). Yaşlanma genellikle ilerleyen yaşla birlikte azalan doğurganlık ve artan ölüm oranı eşliğinde fonksiyon kaybının ilerleyici bir şekilde ortaya çıkması olarak da tanımlanabilir. Elbette, bu yönler arasında bir örtüşme vardır (157,158). Yine, hasar yönünü vurgulayarak, yaşlanma azalmış veya bozulmuş

onarım mekanizmalarının bir sonucu olarak da ifade edilmektedir (159–162). Son olarak, başka bir görüş yaşlanmayı bir ömür boyunca fenotiplerde genel bozulma olarak tanımlamaktadır (163–166).

Hücrel ve sistemik yaşlanmanın temel özelliklerinin 12 adet olduğu kabul görür: DNA kararsızlığı, telomer aşınması, epigenetik değişiklikler, proteostaz kaybı, düzensiz besin algılama, mitokondriyal disfonksiyon, hücrel yaşlanma, kök hücre tükenmesi, bozulmuş makrotofji, kronik inflamasyon, disbiyoz ve değişmiş hücreler arası iletişim (167) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Sistemik yaşlanmanın 12 özelliği

2013 yılına kadar yaşlanma karşıtı müdahalelerle ilgili kanıtların çoğu maya, nematod ve meyve sinekleri gibi memeli olmayan model organizmalarla sınırlıydı. Neyse ki, fareleri (ve bazı durumlarda primatları) içeren deneyler bu temel özelliklerin çoğunun memelilerde geçerliliğini doğruladı (168).

Sıçan ve farelerde 18-24 ay arası yaşlı kabul edilse de 10-12 aylık orta yaşlardan itibaren yaşlanmaya bağlı birçok değişiklik gösterilmiştir (169,170). 4 aylık fareler ile karşılaştırıldığında uzaysal bölge ayırım testlerinden 17 aylık fareler %5'inde bozulma gösterirken 11 aylık fareler ise %1'inde bozulma göstermiştir (171). 3, 12, 17 ve 24 aylık sıçanlarda yapılan bir deneyde hafıza performansındaki kayıpların, hipokampusun CA3 bölgesindeki piramidal hücre sayısındaki azalmanın ve hipokampustaki lipofuksin birikiminin 12 aylık sıçanlarda başladığı gösterilmiştir (172). C57BL/6J cinsi 2-3 aylık, 4-5 aylık, 6-7 aylık ve 8-12 aylık farelerde yapılan çeşitli davranış testleri sonucu 8-12 aylık farelerin daha genç farelere göre motor disfonksiyonu, azalmış kas gücü, azalmış lokomotor aktivite, azalmış sosyal etkileşim, uzaysal hafıza ve bağlamsal korku şartlanma hafızası testlerinde azalmış performans gösterdiği bildirilmiştir (173).

Diffüzyon tensor görüntüleme (DTİ) ile insanlarda yapılan çalışmada 20'li ve 30'lu yaşlardaki sağlıklı insanlar arasında anterior singulat kortekste ak madde bütünlüğü açısından anlamlı fark olduğu ve 30'lu yaşlarda ak madde bütünlüğünün bozulmaya başladığı bildirilmiştir (4). 18-77 yaş arası 148 kişide yapılan DTİ çalışmasında ak madde kaybı 40'lı yaşlardan sonra başlarken ak madde bütünlüğündeki bozulma 20'li yaşların sonundan itibaren görülmeye başlamıştır (5). 25 ila 80 yaş arasındaki 148 kadında yapılan başka bir DTİ çalışmasında, 25 yaşından itibaren beyin bütünündeki ortalama fraksiyonel anizotropide (DTİ'de ak madde bütünlüğünün biyomarkırı) azalma başlamıştır ve bu durum bilişsel testlerde işlem hızındaki azalma ile korele bulunmuştur (6).

2286 kişinin 10 yıl boyunca takip edildiği çalışmada serum IL-6 seviyeleri hızlanmış beyin yaşlanması ile ilişkili bulunmuştur (1). 20-80 yaş aralığındaki 5000 kişinin ve 18-60 yaş aralığındaki 2350 kişinin katıldığı iki çalışmada, işlem hızı ve çıkarımsama yetenekleri 30'lu yaşlardaki bireylerde 20'li yaşlardaki bireylere göre daha düşük bulunmuştur (2,3).

2.2.1. Yaşlanma ve epigenetik değişiklikler

Yaşlanma ile epigenetik düzen ilerleyici bir şekilde bozulmaktadır (174). Genomik bütünlükte ciddi değişiklikler oluşmakta ve kromozomal yapı bozulmaktadır (175). Yaşlanma sürecinde histon kaybı ve nükleozomların yeniden düzenlenmesi söz konusudur. Örneğin, mayaların yaşlanmasında histon ekspresyonunun %50 oranında azaldığı ve kalan nükleozom kısımlarının da genom boyunca yeniden dağıldığı gösterilmiştir (176,177). Genomda oluşan dengesizlik bozulmuş gen susturulması, artmış translasyon ve retrotranspozon ekspresyonuna yol açabilmektedir (178).

Yaşlanma ile DNA'nın tümünde metilasyonun azaldığı 30 yıldır bilinmektedir (179). Transpozonlar genomdaki CpG metilasyon bölgelerinin genelini oluşturur ve sadece transpozonlardaki metilasyon miktarı bütün genomdaki metilasyon değişimini göstermek için belirteç olarak kullanılabilir (180). İnsan genomunda CpG bölgelerinin %23'ü Alu elementleri, %13'ü LINE-1, %8'i LTR retroelementler, %7'si diğer SINE'lardan oluşur (181,182). 18-89 yaş aralığındaki yaklaşık 1200 kişide yapılan çalışmalarda HERV'lerin ve LINE-1 genlerinin yaşla birlikte metilasyonun azaldığı gösterilmiştir (183–186).

2.2.2. Klotho proteini ve yaşlanma

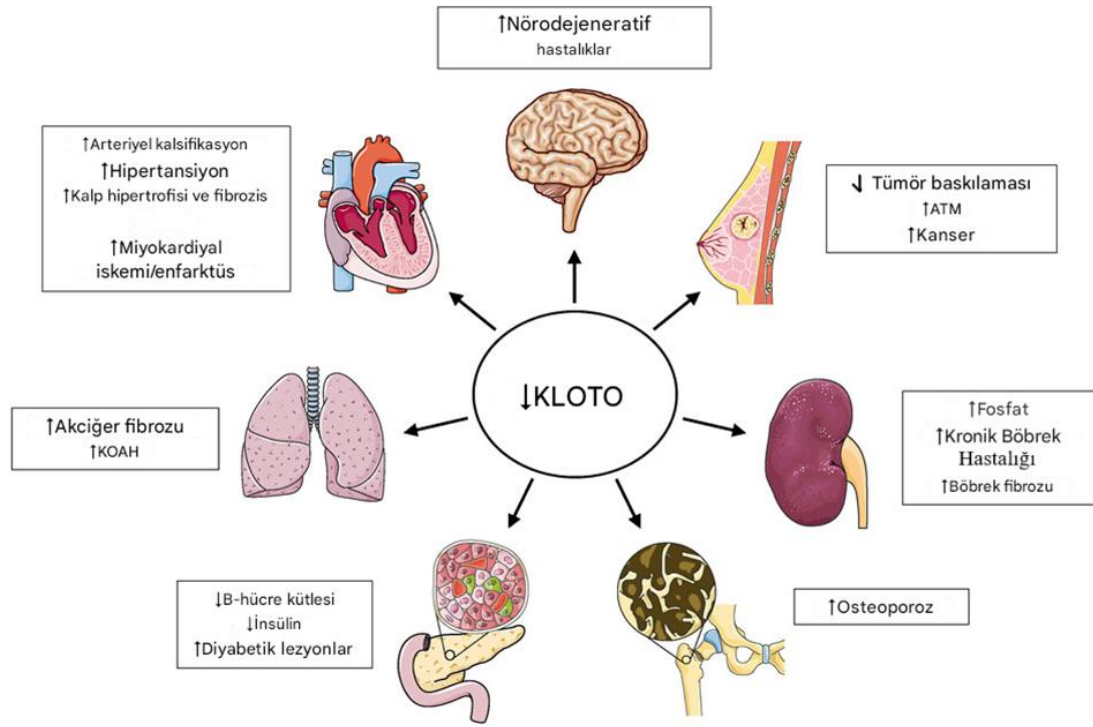
1997 yılında Kuro-o ve arkadaşları (187), insanlardaki erken yaşlanmaya benzer bir fenotip sergileyen mutant bir fare bildirmiştir. Bu farede klotho geni ifadesinin yokluğuna atfedilen, ömrün kısalması, çoklu organ dejenerasyonu, vasküler kalsifikasyon, kardiyovasküler hastalık ve kırılabilirlik fenotipi gözlenmiştir (187). Daha sonraki Klotho yetersizliği olan fare modelleri, hızlandırılmış bir yaşlanma fenotipi ve anormal fosfat ve mineral düzenlemesi sergilemiştir (188,189).

Klotho proteini fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesinin üyelerinin, özellikle FGF-21 ve FGF-19'un, aktivitesini düzenlemekle görevlidir. α -Klotho beş ekzon içermekte ve yapısal olarak, büyük bir ekstrasellüler domain, transmembran domain ve 11 kalıntıdan oluşan küçük bir hücre içi C-terminal domaininden oluşmaktadır (190,191). Ekstrasellüler domainin kesilmesi ile çözünebilir bir Klotho formu salınır (191). Çözünebilir klotho, dolaşımdaki ana fonksiyonel formdur (192,193) ve kan, idrar ve beyin omurilik sıvısında tespit edilmektedir (194–196). Klotho, ağırlıklı olarak proksimal ve distal renal tübüllerin hücre yüzeyi membranında eksprese edilmekte (197–199), aynı zamanda beyindeki koroid pleksusta da bulunmaktadır (200).

Klotho, fosfat homeostazının düzenlenmesi, insülin sinyal yolu ve Wnt sinyal yolu (201,202) gibi yaşlanma süreçlerine dahil olan birçok yolu düzenlemektedir. Ayrıca, klotho, p53/p21, cAMP, protein kinaz C ve TGF- β (199,201) dahil olmak üzere hücre içi sinyal yollarını da etkilemektedir.

Klotho ekspresyon seviyeleri ve dolaşımdaki seviyesi yaşlanma sırasında azalır. İnsanlarda, klotho eksikliği medial kalsifikasyon, intima hiperplazisi, endotelial disfonksiyon, arteriyel sertleşme, hipertansiyon, bozulmuş anjiyogenez ve vaskülogenez (yani, erken vasküler yaşlanmanın özellikleri) ile karakterizedir (203). Klotho eksikliği olan

fareler, bozulmuş idrar fosfat atılımı nedeniyle fosfat dengesizliği ve hiperfosfatemi göstermekte, ancak önemli ölçüde zayıf büyüme, çoklu organ atrofisi, vasküler kalsifikasyon, sarkopeni, kardiyak hipertrofi ve fibrozis, bilişsel bozukluk ve kısalmış yaşam süresi dahil olmak üzere karmaşık bir progerik fenotip geliştirmektedirler (Şekil 2.6) (187,189,202).



Şekil 2.6: Klotho eksikliğinin sebep olduğu bozukluklar

Beyinde, klotho ifadesinin en yüksek seviyesi koroid pleksustadır, ancak klotho aynı zamanda hipokampus, korteks, serebellum ve medulla gibi diğer birçok beyin bölgesinde de ifade edilmektedir (204,205). Beyindeki klotho ifadesi anne karnında başlamakta ve yetişkinliğe kadar artmaya devam etmektedir (206,207). Ancak, klotho ifadesi yaşlı maymun, sıçan ve farelerin beyinlerinde (208) ve insanlarda beyin omurilik sıvısında (BOS) (194) azalır. Klotho yetersizliği olan fareler farelerde serebellumda önemli ölçüde daha az purkinje hücresi (187), azalmış aksonal taşınma (209) ve bilişsel bozukluk (210) gösterilmiştir. Klotho ayrıca yetişkin hipokampal nöral progenitör hücrelerin proliferasyonu ve olgunlaşması (211), oligodendrosit olgunlaşması ve miyelin bütünlüğü (212) için gereklidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Next Advance Bullet Homojenizatör
 - Dokuların yüksek devirde parçalanması için kullanıldı.
- Nüve 1200R Soğutmalı Santrifüj
 - Soğuk koşullarda santrifüj yapma olanağı sağladı.
- ThermoScientific Multiscan Go
 - Nanospektrofotometrik ölçümlerde kullanıldı.
- Runik Thermal Cycle
 - PCR tekniği için kullanıldı.
- BioRad CFX Connect Real Time PCR
 - Real Time PCR tekniğinde kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan malzemeler

- ThermoFisher Purelink RNA mini kit
 - 125 mL Lysis Buffer
 - 50 mL Wash Buffer I
 - 15 mL Wash Buffer II
 - 15.5 mL RNase-free Water
 - 50 PureLink Spin Cartridges with Collection Tubes
 - 50 Collection Tubes
 - 50 Recovery Tubes
- ThermoFisher Powrup sybr master mix
- qScript cDNA sentez kit

- 5X concentrated master mix containing: titered primer blend (oligo dT(20) and random hexamer), qPCR-optimized dNTP blend and flexible magnesium titration
- 20X concentrated qScript reverse transcriptase
- Nuclease-free water

3.2. YÖNTEM

Çalışmaya dahil edilmesi gereken en az sıçan sayısı %95 güven düzeyinde ve %80 güç ile örnek olarak alınan çalışmada (213) ölçülen TNF-alfa gen ekspresyonlarındaki 0.9445046 etki büyüklüğü ve 0.5 birimlik standart sapmaya bakıldığında her grup için minimum 5 sıçan olarak G power (3.1.9.7) kullanılarak belirlenmiştir (213). Literatürdeki diğer çalışmalarda da (214,215) gruplar benzer sayıdadır.

Çalışmamızda 19 adet Long-Evans Hooded erkek sıçandan elde edilmiş olan beyinin frontal korteks dokuları kullanılmıştır. Long-Evans Hooded sıçanları Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışma için gerekli olan etik kurul izni Sağlık Bilimleri Üniversitesi Yerel Etik Kuruldan 18.12.2024 tarih ve 9/3 sayılı 24-5 kayıt numaralı karar ile alınmıştır. Çalışma için 1 aylık (n=7), 4 aylık (n=7) ve 12 aylık (n=5) olmak üzere 3 farklı yaş grubu belirlenmiştir.

3.2.1. Morris su labirenti (MWM) testi

Hayvanların bellek kapasitelerini değerlendirmek için, çapı 125 cm yüksekliği 60 cm olan bir su tankı düzeneği kullanılmıştır. Düzenek içerisinde gizlenmiş bir platformla sıçanların mekânsal öğrenmeleri gerçekleştirildikten sonra kaldırılmış olan platformla bellek düzeyleri değerlendirilmiştir. Aynı zamanda suyun ısısı sıcaklık geri bildirim mekanizmasıyla $21^{\circ}\text{C} \pm 1$ aralığında tutulmuştur.

Öğrenme deneylerinde, her bir sıçan 4 gün boyunca günde 4 deneme olacak şekilde, sudaki yeri 4 gün boyunca sabit olan gizli platformun yerini mekânsal verileri kullanarak öğrenmiştir. Testler süresince sıçanların tüm hareketleri gerçek zamanlı olarak kaydedilip Ethovision XT bilgisayar programı vasıtasıyla analiz edilmiştir. Öğrenme denemeleri bittikten sonra düzeneğin içerisindeki gizli platform kaldırılmıştır. Sıçanların 5. günde boş düzeneğe alındığında çıkartılmış olan platformun olduğu bölümde geçirdikleri süre

hesaplanmıştır ve böylece mekânsal hafızaları hakkında bilgi edinilmiştir. Morris su tankından platform çıkartılarak yapılan test denemesi deneylerinde hayvanların platform kadranında ve platform alanında geçirdikleri süre bilgisayar yardımıyla hesaplanmıştır.

3.2.2. Dokuların alınması

Rompun ve ketamin anestezisi altındaki hayvanlar dekapitasyon ile kurban edildi. Kurban olan hayvanlardan alınan beyin dokularından frontal korteks disekte edildi ve disekte edilen beyin dokuları kuru buz üzerinde dondurularak RNase free tüplere alınıp -80°C dondurucuda moleküler deneyler yapılncaya kadar saklandı.

3.2.3. Uygulanan protokoller

3.2.3.1. RNA izolasyonu

RNase içermeyen bir tüp içerisinde bulunan doku lizatına 1 hacim %70 etanol eklendi. Etanol eklenmesinden sonra oluşabilecek görünür çökeltiyi dağıtmak amacıyla karışım vortex ile iyice karıştırıldı. Elde edilen karışımdan en fazla 700 µL'lik kısım (oluşabilecek çökelti de dahil) toplama tüpü ile birlikte gelen spin kartuşuna aktarıldı ve oda sıcaklığında 12.000 × g kuvvetinde 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alt kısma geçmiş sıvı (flow-through) atıldı ve spin kartuşu aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi. Tüm örnek işlenene kadar bu adımlar tekrarlandı.

Spin kartuşuna 700 µL wash buffer I eklendikten sonra oda sıcaklığında 12.000 × g kuvvetinde 15 saniye santrifüj edildi. Flow-through ve toplama tüpü atıldı, spin kartuşu yeni bir toplama tüpü'ne aktarıldı.

Ardından 500 µL etanol içeren wash buffer II ilave edilerek yine oda sıcaklığında 12.000 × g kuvvetinde 15 saniye santrifüj edildi. Flow-through atıldı ve spin kartuşu aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

Daha sonra spin kartuşu, toplama tüpü ile birlikte oda sıcaklığında 12.000 × g kuvvetinde 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve Spin Kartuşu bir recovery tüpüne yerleştirildi. Spin kartuşunun merkezine 30 µL'den 300 µL'ye kadar değişebilen hacimlerde RNase-free su (RNase-Free Water) eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Oda sıcaklığında 12.000 × g kuvvetinde 2 dakika santrifüj edilerek RNA elüe edildi.

3.2.3.2. RNA miktarının ölçülmesi

Örneklerden 2'şer μl alınarak Thermo Fisher Multiskan GO (Şekil 3.1) spektrofotometresinde 260 nm, 280 nm ve 230 nm dalga boylarında ölçümler yapıldı. Spektrofotometre elde edilen veriler ile konsantrasyonlar $\mu\text{g/ml}$ cinsinden hesaplandı.



Şekil 3.1: Thermo Fisher Multiskan GO

3.2.3.3. cDNA sentezi

Çalışılan ortam, kullanılan cihazlar, araç ve gereçler RNase ZAP temizleme solüsyonu ile steril edildi. Reaksiyon karışımı (optimize edilmiş tampon çözelti, magnezyum, oligodTprimer, randomprimer ve dNTP seti) ve ters transkriptaz enzimi içeren bir ana karışım hazırlanarak kuyu başına 5 μl olacak şekilde 96 kuyuluk plakalara paylaştırıldı. Eklenmesi gereken su ve RNA miktarları 500 ng RNA'ya denk gelecek şekilde konsantrasyonlarına göre hesaplandı. RNA eklenmesiyle son hacim su ile 20 μl 'ye tamamlanarak Runik termal cihazında aşağıda belirtilen koşullarda cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi.

- 22°C'de 1 döngü, 5 dk,
- 42°C'de 1 döngü, 30 dk,

- 85°C’de 1 döngü, 5 dk,

Elde edilen cDNA’ların üzerine 80 µl nükleaz içermeyen su eklenerek 1:5 oranında seyreltme işlemi yapıldı. Moleküler analizler gerçekleştirilinceye kadar saklanmak üzere cDNA’ları içeren plaka -20 °C’ye kaldırıldı.

3.2.3.4. Primer tasarlama

Çalışma kapsamında primer bölgelerinin çoğaltımı için uygun primer çiftleri Sentromer firması tarafından sentez ettirilmiştir. Kullanılan primerler:

- SYNb: Pf: CACACCTTTGGGTCCTCTGT, Pr: CATGGGTGTGTCTGTCCAA
ENSRNOG00000021823

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the gene **Synb** (ENSRNOG00000021823) in *Rattus norvegicus*. The page includes a navigation bar with links to BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, Help & Docs, and Blog. The main content area is divided into several sections:

- Gene-based displays:** A sidebar menu with options like Summary, Splice variants, Transcript comparison, Gene alleles, Sequence, Secondary structure, Comparative Genomics, Genomic alignments, Gene tree, Gene gain/loss tree, Orthologues, Paralogues, Strains, Ontologies, GO: Cellular component, GO: Molecular function, GO: Biological process, Phenotypes, Genetic Variation, Variant table, Variant image, Structural variants, Gene expression, Pathway, Molecular interactions, Regulation, External references, Supporting evidence, ID History, and Gene history.
- Gene: Synb ENSRNOG00000021823:** A section providing detailed information about the gene, including its description (syncytin b), gene synonyms (Envfrd-1, Herv-frd, LOC290348, RGD1566115), location (Primary assembly 15, 44, 583, 476-44, 585, 345 reverse strand), and about this gene (This gene has 1 transcript, 55 orthologues, and 12 paralogues).
- Transcripts:** A table showing the transcript Synb-201 (ENSRNOT00000038845.6) with its protein (617aa) and UniProt Match (A0A8IG4443).
- Summary:** A section providing a brief overview of the gene, including its name (Synb), Ensembl version (ENSRNOG00000021823.6), gene type (Protein coding), and annotation method (Annotation produced by the Ensembl genebuild).

Şekil 3.2: SynB genetik bilgiler sayfası

```
>ENSRNOT00000038845.6 Synb-201 cdna:protein_coding
ATGACACACCTTTGGGTCCTCTGTTTTGTCTCTTTCCCTTCCTTGTCTATCCCGAG
AGCTGGATGCCCCCTTATAAACCTCCTACCCACATCTACGGGATGCCAACTCTTCCCTG
TTTCCCAACTGCTGGGCTGCTGTGTCACCCAAACCAACGGTCCCTGGCAGTCCCGCC
CCACTGTCCACTTGGACAGACACCCATGAAGCTTACCTTACCTACTCAGTCAAGGCC
TTCCCTGGCTCTTTTCCCATTAGCGACCTTGAAGAGCGCCTCCGTCTCTTCCACCCACTG
ATTGCCCTCTATCCCTTCCACAATCTGAGAGAAGGGCGATCACTTTTCTTCAACTCGTC
AGCTCAACAGGCATATTTCGGATCATACCCGATAACCTCTGTGATATATCCTGAGAA
GACCGTTTCTTGAATCTGCCAGCGCCCTCTCTGGGGACCACTCTTTACTGAGACCGTC
CTCAGGTCACAGGCCCCACTCTGCATATCCCGCTTCTTCAAGGTCTCAGCTTATGCCACT
TTTGTAGGCAACCTCTCTGCTTCTCTGCAACTACACCTTTCGTATTTACCTTCTACC
AGCCATGAAAACTAGATCTTCCATACCCATCCATTCAAACAGGCAATGAAAAGGCC
AATGCCAAATGAAAAACCACTCCGTTTCTCCGGGCCCCCTCCCTAATCTTCTCAAAG
CCCTCTTACCATCCCTGCCAGCAGACAAATACTGCCACACCTCCCGGCCACTCCCTGG
ATGCGCTGTCTCACGCCCCCTCTAGCACCTGCTATAACCTTACCTTATTTGAATCAGAT
AACTTAACCACTCTGTCACCATGTCAGTGGACTCTACCAATTCAAGGCCAACTCCAG
GGGCGCAGAGACCCCTTATCCTCTCTCCATTATCAGCCTATCCCGGGAGCTGCCCTGTCT
GGACAGTATTAGTCTGGGAGAATGAGATCACTATCAAGAAACTGGGGAGTCACCTCC
```

AACATTTTCTCACATCTGCTCAGCTTCTCGTACATCTTCTGTCTCAACTCTTCAGGAGTT
 TTCTTCTCTGCGGAACATCGACTTATGTCTGCCTCCAGCCAATTGGTCCGGTGTCTGT
 ACCCTTGTCTTCCAATACCCGGATATTGAACCTCTCCCAATAACCAAACGGTGCCTGTC
 CCCCTTTTGTCTCAGTTCTTTCTCGGCCTCAGTTCTTCTCGTCCAAAGAGGTCTCCACAC
 CTCCTCCCCTTCCTTGCAAGGCTGGGCATCTCTTCTGCCCTTGGTACGGGTATAGCTGGC
 TTGGCCTCCTCAACTCTATATTCCAACGGCTTCTAAGGCTCTCTCAGAAACCTGGAA
 GAAATAGCTGCCTCTATTACTACCCTCCAGAACCAATAGACTCGCTTGC GGCGCTTGT
 CTCCAAACCGCAGAGCTCTGGACCTCATCACCGCCGAAAGGGGGGCACCTGTCTCTTC
 CTCCAGGAAGAGTGCTGCTTCTATGTAACCAGTCTGGAATAGTCCGGGATGCGGCAAGG
 AAACCTCCGAGAACGAGCATCTGAACCTCAGCCAGCATTTCTGACTCTTGGGACAGTGGCCT
 GACCTGGACGCTGGCTGCCCTGGCTGACTCCCTTTCTGGGACCTCTCTCTTCATCTTC
 TTCCTACTGACATTTGGGTCTTGTCTTCTGAATTGTCTAACCCGTTTGTGTGCGAGAGA
 CTTGGCTCCTTTGTCCAGGACACTGCCAAATGCAGGTGGACAGCATCTCCAAATTTTC
 CAATATAAAAACTGCCTCAAGACTCCCAAGATGAGGACACTATTCTATGTAAACAGGAA
 GAAGTTGTGA

- SETDB1: Pf: CCTCGAGATGGGTGATGAGT, Pr:
 GCATAGCTACGCCACACTGA
 ENSRNOG00000021143

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the Setdb1 gene (ENSRNOG00000021143) in the Rattus norvegicus genome. The page includes a navigation menu on the left, a main content area with gene details, and a table of transcripts.

Gene: Setdb1 ENSRNOG00000021143

Description: SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1 [Source:RGD Symbol;Acc:1308370]

Gene Synonyms: LOC100911180, LOC310668, LOC689883

Location: Primary assembly 2: 182,898,738-182,930,506 reverse strand. mRatBN7.2: CM026975.1

About this gene: This gene has 3 transcripts (splice variants), 243 orthologues, 23 paralogues and is associated with 17 phenotypes.

Transcripts: Hide transcript table

Transcript ID	Name	bp	Protein	Biotype	UniProt Match	Flags
ENSRNOT00000028709.8	Setdb1-201	4490	1322aa	Protein coding	D4A081	Ensembl Canonical APPRIS P2
ENSRNOT00000111803.1	Setdb1-203	6194	1221aa	Protein coding	A0A8IGASK2	APPRIS ALT2
ENSRNOT00000077325.2	Setdb1-202	5007	1245aa	Protein coding	A0A0G2K5A7	APPRIS ALT2

Summary

Name: Setdb1 (RGD Symbol)

Ensembl version: ENSRNOG00000021143.8

Gene type: Protein coding

Annotation method: Annotation produced by the Ensembl genebuild.

Go to Region in Detail for more tracks and navigation options (e.g. zooming)

Export data: Add/remove tracks, Custom tracks, Share, Resize image, Export image, Reset configuration, Reset track order

www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Transcript/Summary?db=core;g=ENSRNOG00000021143;r=2:182898738-182930506;t=ENSRNOT00000028709

Şekil 3.3: Setdb1 genetik bilgiler sayfası

```
>ENSRNOT00000028709.8 Setdb1-201 cDNA:protein_coding
ATGGTCTAGGAGTTTTTAAAGCCAACCTTTCTACAGGAAAGCAAACTCCGGCGAAAGC
ATGTCCTCCCTCCCTGGGTGCATGAGTTTGGCTGCAGCGCCAGCTGCGGCGGACTCTGCA
GAGATTGCTGAGCTGCAGCAGGCAGTGGTTGAAGAGCTGGGTATCTCTATGGAGGAACCT
CGTCAGTTTCATCGATGAAGAACTGGAAAAGATGGACTGTATACAGCAGCGCAAGAAGCAG
CTGGCAGAGCTGGAGAACGTGGGTGCTGCAGAAAGAGTCTGAGGTGGCTTATGTTGATCGG
CTGTTTGATGATGCATCTAGGGAAGTACTAATTGTGAGTCTTTGGTGAAGGATTTCTAC
TCTAAGCTGGGATTACAGTATCATGACAGTAGCTCTGACGATGAAGCTTCCAGCCTACA
GAGATAATCGAGATTCTGATGAAGATGATGATGTCCTCAGTATTGATTCAGGTGATGCT
GGGACAGAGCTGGAGAACGTGGGTGCTGCAGAAAGAGTCTGAGGTGGCTTAAAGAAAATCA
GCTCAAGATGTCCAGAAGTTTATGGATGCTGTGAATAAGAAAAGCAGTTCTCAAGATCTA
CATAAAGGAACCTTGGGTGAGTGTCTGGAGAACTGAGCAAGATGGGGACCTGATAGTC
AGCATGCGGATTCTGGGCAAGAAGAGGACTAAGACGTGGCACAAAGGCACCTCATTGCC
ATCCAGACTGTCGGGCTAGGAAAGAAATACAAAGTGAATTTGACAACAAAGGAAAGAGT
CTGCTGTCTGGGAACCATATTGCCATGATTACCACCTCTGCTGACAAGCTGTTTGTG
```

GGCAGTCGAGTGGTGGCCAAATACAAAGATGGAAATCAGGTCTGGCTTTATGCTGGCATT
GTAGCTGAGACCCCTAACGTCAAGAACAAAGCTCAGATTTTTAATTTTTTTTGTATGATGCG
TATGCTTCCATATGTCTACTCAGTCCGAGCTGTATCCCATTTGCCGACCATTGAAAAAGACT
TGGGAGGACATAGAAGACAGCTCCTGCCGAGACTTCATAGAAGAATATATCACTGSCCTAT
CCAAACCGCCCAATGGTACTTCTCAAGAGTGGCCAGCTTATTAAGACTGAGTGGGAAGGC
ACATGGTGAAGTCTCCAGATTGAAGAGGTTGATGGCAGCCTAGTCAGGATCCCTTTCTG
GATGACAAAAGATGTGAGTGGATCTATCGAGGCTCTACACGCCTGGAACCTATGTTTCACT
ATGAAGACATCCTCAGCCTCTGCAATGGAGAAGAAGCAAGGGGGGCAACTCAGAACCCGT
CCTAATATGGGTGCTGTGAGGAGCAAGGTCCTGTTGTTTCACTACACTCAGGATCTAACG
AGTACTGGAATCCAGTTTAAAGCCCATGGAGCCCTGCAGCCTATAGTCCCACCTGCCCG
CTTCCCATGCTTCTCTTTCCCCCAGGCAGGCGACAGTGAAGCTTAGAAAGCCAGCTT
GCTCAATCACGGAAGCAAGTAGCCAAAAAGAGCACATCATTCCGACCAGGATCTGTGAGT
TCTGGCCATTCTCCCTACTTCGCCACACTCAGTGAAGTGTACCCCTGGGAAAATT
GGAATGAACCGACATACAGATCACCTTCAGCCTCTGTAACATCTACCCAGCACCTGCA
GCCCCCTTCTGGGCTCCAGCCCTCCAGGCTCTTGTCTCTCTGGACCACCGGCCCT
CCAGCTTTCACGGCATGTTAGAGCGGCGACAGCTGAGCCCTCCTATCGTGCCCTATG
GAGAAGCTTTTCTATTTACCTCATGTCTGAGTTACACTTGTGTTCCCGGATTAGACCC
ATGAGGAATGAACATTCGGGGCAAAAACCTCTACTGGTCCCATTATTGTATGACTTC
CGGAGGATGACAGCAGTGCAGAGTTAACCGCAAGATGGGCTTCCATGTAATCTATAAG
ACACCTGTGTGCTCTGCTTCCGACGATGCAGGAAATAGAGCGCTACCTTTTGTGAGACT
GGCTGTGACTTCTGTACCTGGAGATGTTCTGTTGGATCCATATGTCCTTGTGACAGA
AAGTTGACCCCTTTAAACCTTTTACTATATTTGGACATCACCTATGGCAAAGAAGAT
GTTCCCTGTCTGTGTTAATGAGATTGACACAACTCCCCACCCAGGTGGCTACAGC
AAGGAACGCATTCTGGCAAGGTTGTTTTCATTAACAGGCGCTGAATTTCTGGTTGGC
TGTGACTGCAAGGATGGGTGTGGGATAAATCCAAGTGTGCTGCCATCAGCTCACTGTC
CAGGCCACAGCCTGTACCCAGGGGTCAGATCAACCTAGTCCGGCTACCAGCAGAAA
AGACTGAGAGAGTGTCTGCCACAGGGGTTTATGAGTGTAAACAGCGCTGCAATGTGAC
CCAAACATGTGCACAAATCGGTTGGTGCAGCATGGACTGCAGGTTGACTACAGCTGTTT
AAGACACAGAAACAGGGCTGGGGCATCCGCTGCTTGGATGACATTGCTAAAGGCTCTTTT
GTCTGCATTTATGCAGGCAAAATCCTGACAGATGACTTTCAGACAAAGAAGGCCCTGAG
ATGGGTGATGAGTACTTGTGCAATCTGGACCACATTGAAAGTGTGGAGAACTCAAGGAA
GGATATGAGAGTGACGTCCCCAGCTCCTCTGACAGCAGTGGGTGGATATGAAGGACCAG
GAGGATGGCAACAGTGGCTCAGAGGACCTGAGGAGTCCAACGACGACAGCTCCGATGAC
AACTTCTGTAAGGACGAGGACTTCAGCACCAGTTCAGTGTGGCGTAGCTATGCAACCCGG
AGGCGAGACTCGGGGTGAGAGGAGAGTGAAGTGTCTGAGGTGACTTCAAAGGACTCCGCG
GCCCCAGACCGTGGGCTCCCCAGTCCCTATCACTCCCTCAGGATCTGTAGGGGTTGC
AATCCACCTTCTCCGAAGAGACACCAAGAACAAGTGGCTCATGGTTGAGCTGCAAT
AGTGTGAGTGAAGGTGGATTGCTGACTCTGACAGCCGTTCTCTCTTAAAGACTAGTGAA
GGTGGAGATGGCCGTGCTGGGGGAGGCGGGGAGAGGCTGAAGAGCCTCTACCTCAGGA
TTGAGCTTCAAGGATGAAGGAGACAGTAAGCAATCTAAAAAGAGGACCTGAGGACCGA
AACAAGATGTGAGTAGTTACTGAAGGCTCTCAGAATCATGGACACAATCCTCCCATGAAG
TCTGAAGGGCTTCGCCGACCAGCTAGTAAATTTCTATGCTCCAGAGCCAGCGAGTTGTG
ACTTCTACTCAGTCAAAACCTGATGATATCCTAACACTGTCCAGCAGCACAGAAAGTGA
GGGGAAGTGAAGACAGCCGAAAGCCACTACTGGTCAGACTTCAGCCACAGCAGTTGAC
AGTGATGACATCCAGACCATCTCTTCTGGCTCTGATGGCGATGACTTGGAGGACAAGAAG
AACTTGTGCGGACCAACAAAGCGTCAGGTGGCAGTAAATCAACCCGAGGCTTTGCTCTT
AAATCAACCATGGTATTGCCATTAAATCAACCAACATGGCTTCCGTGGACAGGGGGAG
AGTGCACCAGTTCGTAAGAACACACGCCAGTCTATGATGGTGAAGAGTCTTGCTACATC
ATTGATGCCAACTTGAAGGCAACCTAGGCCGCTACCTCAATCAGATTGCAGCCCCAAC
CTGTTTGTCCAGAAGCTTTTGTGGATACCATGATCTTCGCTTCCCTTGGGTGGCTTT
TTTGCCAGCAAGAGAAATCCGGGCTGGAACAGAACTCACTGGGATTACAACATATGAAGTG
GGCAGTGTGAAGGCAAGGAAGTGTGTGCTGTGTGGAGCCATTGAATGCAGAGGGCGG
CTTCTCTAGAGGAAGACTCTTCTCTACTCTGAGGATCCCTTCCCCAGGAAGTGGTCTTT
CTGACTCCACGCTCTGATCTGGCTTCTCCCCAGCTCCTAGTAGATAAAAGTGGGGTCC
TAGATCAGGACGTTGCCAGCGTGGTGCTAGCAGGCACTAGGGTGGGATGACCACCTAGC
ATCAGCCTGAGGTCTTCTCATCCCGTATGTGTTTATGATTACATGCGCCGTGTATCTG
GTTTGTATGGTTTCTTGAAAGTCTTCTAACAAGATGATAAATAGAGCTTGTGGTTTGTG
TTCTCTCTCAGCCCCATCTTGACCTTCCAGGAGATGTCAATTTCCCAATGGCAACTATC
ATTAGTTTACCCCTTGATTTTATTTGCTTGTGTAATTTTAAACAGCAACAAAAGTTCCA
TGACCAGGAGGGAAGCCTAAGAAAAATAACCTTCTCAAGTCTTAATAGTCTGACACAGT
CATGTTTATTTAACTTTAATATATCTTAATTAATAAAAAATTAACAGTA

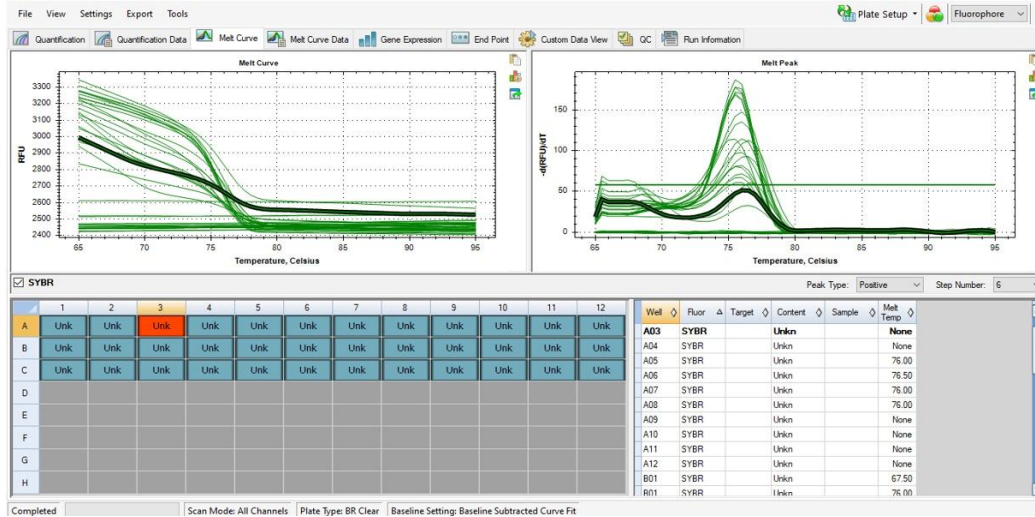
- LINE-1(L1td1): Pf: GAGGGAGAGGCCTCAGAGTT, Pr:
AGCCTCGAGCGTCATGTAGT
- GAPDH; Pf: TTGGGTTGTACATCCAAGCA, Pr:
CCCTCCTGGGTTTGTAGTCA
- TRIM28; Pf: GACTGCCAACTCAATGCTCA, Pr:
ATCAACCTGCACTCGCTTCT

- Klotho; Pf: CCACCAGAAGAGATGATGCCA Pr: ACCACTCCCCAAGCAAAGTC
- TNF; Pf: GAGGCGCTCCCCAAAAAGAT, Pr: CTACGGGCTTGTCACTCGAG
- COX2; Pf: TGGCTTACAAGACGCCACAT, Pr: TGGGCGTCTATTGTGCTTG

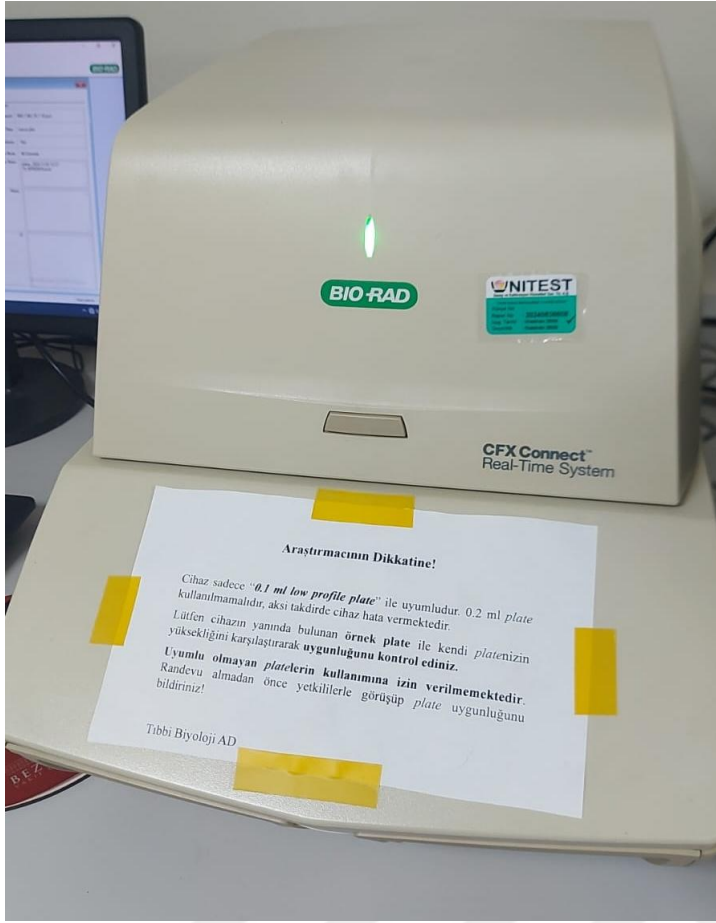
3.2.3.5. qPCR

Gerçek zamanlı PCR yapmak için; ileri primer, geri primer, su ve reaksiyon karışımı (syber yeşil boyası, DNA polimeraz, dUTP içeren dNTP) plakalara 14 µl olacak şekilde paylaştırıldı. cDNA örneklerinden 1 µl alınarak plakalara eklendi. Erime eğrisi altında kalan örnekler çalışma dışı bırakıldı ve bu örnekler yeniden RT-PCR yapıldı (Şekil 3.4). Aşağıda belirtilen koşullarda gerçek zamanlı PCR reaksiyonu Bio-Rad RT-PCR cihazında (Şekil 3.5) gerçekleştirildi (216,217).

- Polimeraz aktivasyonu: 95°C’de 1 döngü, 2 dk,
- Denatürasyon: 95°C’de 1 döngü, 5 sn,
- Primer Bağlanması: 60-65°C’de 1 döngü, 10sn,
- Uzatma: 72°C’de 1 döngü, 15sn,



Şekil 3.4: Erime eğrisi



Şekil 3.5: Bio-Rad RT-PCR cihazı

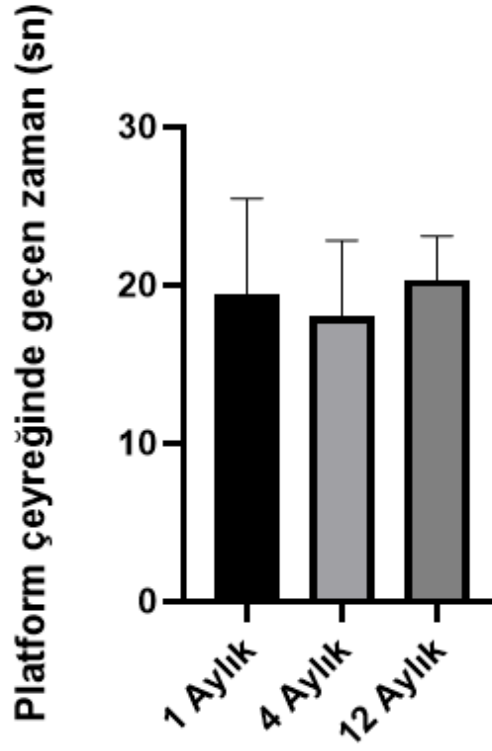
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler ve grafikler GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak (GraphPad Software, Inc., CA, ABD) yapıldı. SYNB, GFAP, IL-6, TRIM28, LINE-1, COX-2, TNF-a, a-klotho ve SETDB1 ekspresyon seviyeleri 2- $\Delta\Delta C_t$ yöntemiyle hesaplandı. Grup farklılıklarını belirlemek için Kolmogrov-Smirnov testi ile normal dağılım gösteren verilere Tek yönlü Varyans analizi (One-way ANOVA) testi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Morris su labirenti testi

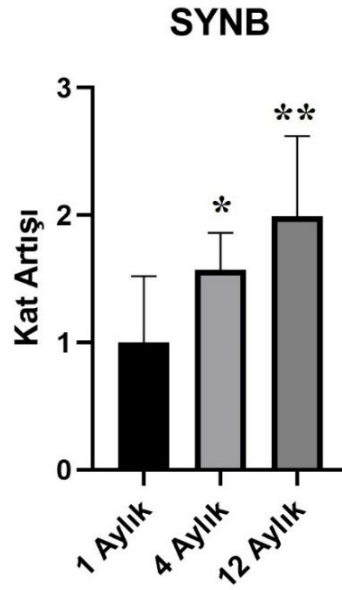
Morris su labirenti test denemesinde hayvanların platform kadranında geçirdikleri süreye bakılarak yapılan tek yönlü ANOVA testinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Morris su labirenti testi

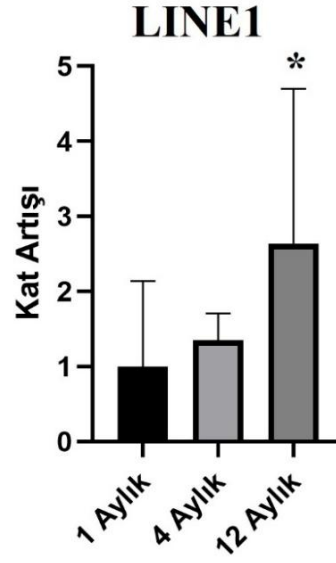
4.2. ERV ve ilişkili genlerin ekspresyonlarındaki değişimler

Yapılan tek yönlü varyans analizine göre, SYNB gen ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı bir fark görüldü ($F_{(2,18)}=4.808$, $p=0.0232$). İkili post hoc LSD testine göre, SYNB geni ekspresyonunda 4 aylık ve 12 aylık sıçanlarda 1 aylık sıçanlara oranla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0,0485$ ve $p=0,0089$, sırasıyla) (Şekil 4.2).



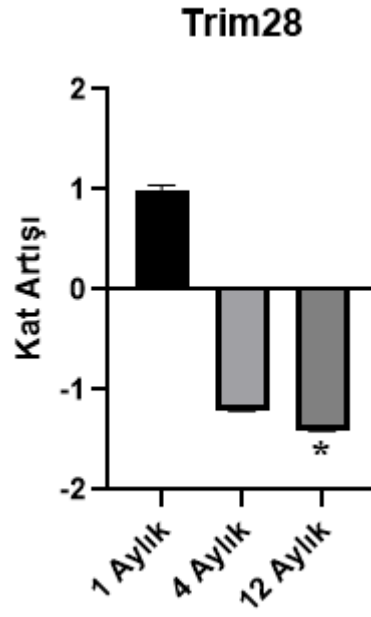
Şekil 4.2: SYNB ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi. * $p<0.05$ ve ** $p<0.01$.

LINE-1 gen ekspresyon seviyesinin karşılaştırılmasında da yaşlar arasında bir farklılık saptandı ($F_{(2,18)}=3.013$, $p=0.0816$). Bu farklılık marjinal anlamlılık seviyesinde kaldı. Fakat post hoc LSD testi ile ikili karşılaştırmalarda, 12 aylık sıçanlarda 1 aylık sıçanlara göre LINE-1 gen ekspresyonunda anlamlı bir artış kaydedildi ($p=0,0318$) (Şekil 4.3).



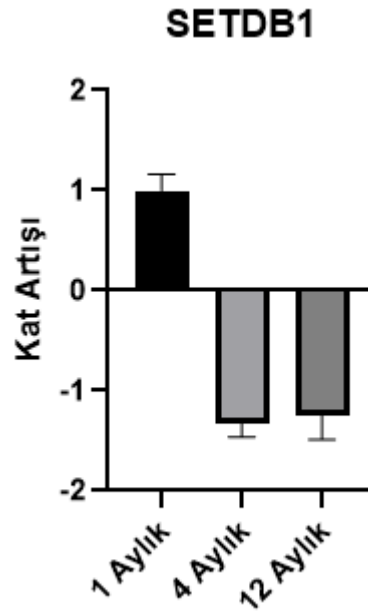
Şekil 4.3: LINE-1 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi. * $p < 0.05$.

ERV'lerin susturulmasında görevli olan TRIM28 gen ekspresyonu analizinde yaşlar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($F(2,18)=2.322$, $p=0.1323$). Fakat TRIM28 gen ekspresyonunda yaşa bağlı olarak bir düşüş söz konusuydu ve bu düşüş ikili karşılaştırmalarda 12 aylık sıçanların frontal korteksindeki TRIM28 ekspresyonu 1 aylık sıçanların frontal korteksindeki ekspresyona oranla daha azdı ($p=0.054$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: TRIM28 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi. * $p < 0.05$.

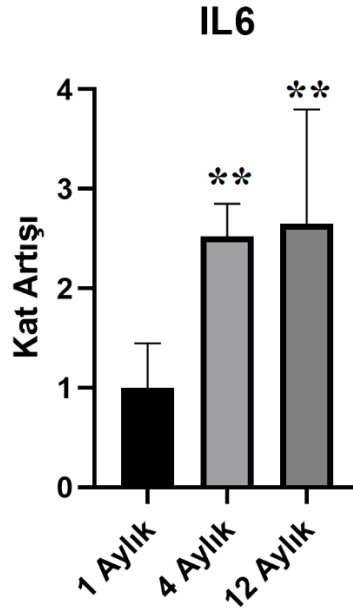
ERV'lerin susturulmasında görevli olan SETDB1 mRNA ekspresyonu yaşlar arasında karşılaştırıldığında yaşla birlikte bir düşüş olmasına rağmen anlamlı olarak bir değişim gözlenmedi ($F_{(2,18)}=0.8380$, $p=0.4507$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: SETDB1 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi.

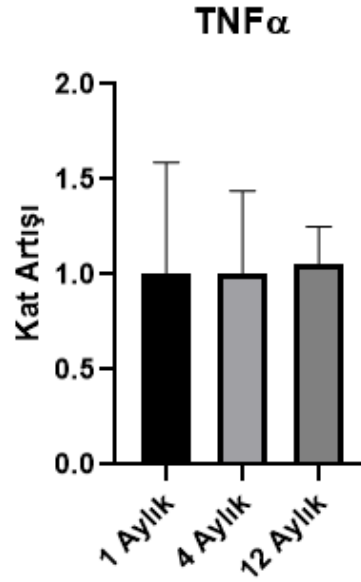
4.3. İnflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonlarındaki değişimler

Hem proinflamatuvar sitokin hem de antiinflamatuvar miyokin olarak görev yapan IL6 mRNA ekspresyonu, tek yönlü varyans analizine göre yaşlar arasında anlamlı bir değişim gösterdi ($F_{(2,18)}=10.120$, $p=0.0017$). Post hoc LSD testindeki ikili karşılaştırmalarda ise, hem 4 aylık ($p=0.0012$) hem de 12 aylık ($p=0.0027$) sıçanların IL6 seviyelerinde 1 aylık sıçanlara oranla anlamlı bir artış tespit edildi (Şekil 4.6).



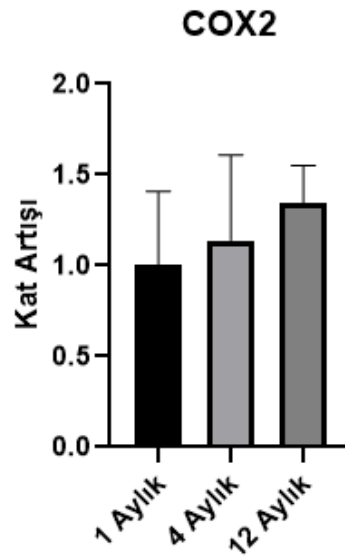
Şekil 4.6: IL-6 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi. ** $p<0.01$.

Diğer taraftan, inflamasyonu tetiklediği bilinen TNF-a gen ekspresyon seviyesi açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark görülmedi ($F_{(2,18)}=0.008$, $p=0.9921$). (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: TNFα ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi

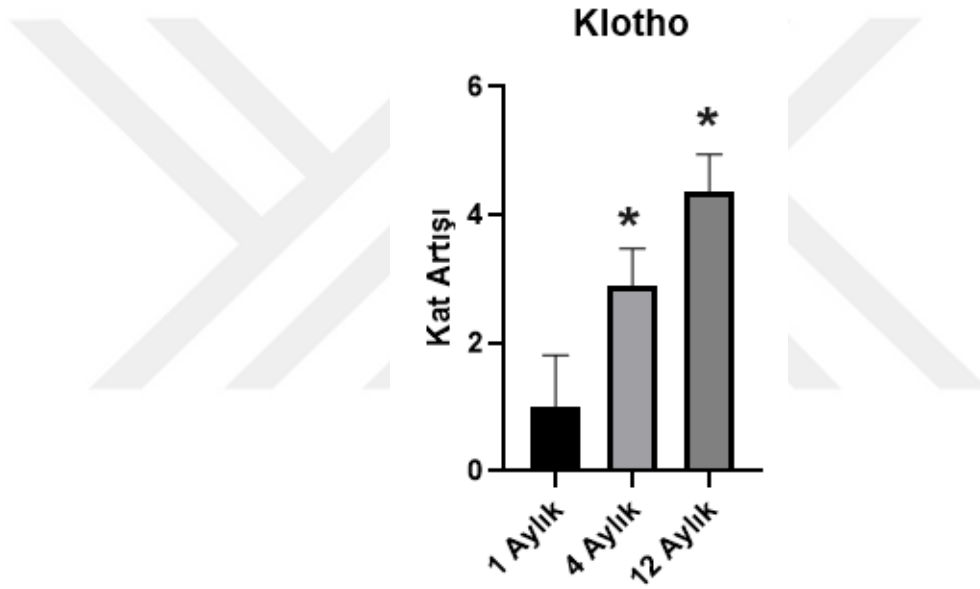
Yaşla birlikte inflamasyonun değişimine bakmak amacıyla inflamasyonda rol oynayan prostanooidlerin yapımından sorumlu olan COX-2 gen ekspresyonunun değişimi de incelendi. Yapılan tek yönlü varyans analizine göre, 12 aylık sıçanların beynindeki COX-2 ekspresyonu 1 aylık sıçanların beynindeki orana daha fazla olsa da, incelenen yaşlar arasında COX-2 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark gözlenmedi ($F(2,18)=0.044$, $p=0.9567$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: COX2 ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi

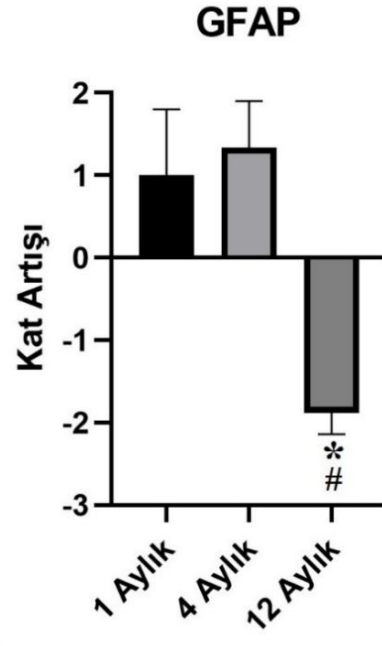
4.4. Yaşlanma ilişkili klotho geninin ve beyin hasarı belirteci GFAP geninin ekspresyonlarındaki değişimler

Yaşlanma ile ilişkili olan klotho geninin ekspresyonundaki değişim tek yönlü varyans analizi ile incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olduğu gözlemlendi ($F_{(2,18)}=3.929$, $p=0.0463$). Gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda ise hem 4 aylık sıçanların ($p=0.0415$) hem de 12 aylık sıçanların ($p=0.0223$) frontal kortekslerinde 1 aylık sıçanlarınkine oranla klotho geninin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Klotho ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi. * $p<0.05$.

Merkezi sinir sistemi hasarının kandaki biyobelirteci olarak kabul edilen GFAP geninin ekspresyonundaki yaşa bağlı değişiklikler tek yönlü varyans analizi ile incelendiğinde, gruplar arasında GFAP ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olduğu gözlemlendi ($F_{(2,18)}=5.262$, $p=0.0175$). Yapılan LSD ikili karşılaştırma analizlerinde ise GFAP ekspresyonunun 12 aylık sıçanlarda hem 1 aylık ($p=0.0421$) hem de 4 aylık ($p=0.0054$) sıçanlara oranla anlamlı derecede düştüğü kaydedildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: GFAP ekspresyon seviyelerinin yaşlara göre değişimi. * $p<0.05$; 1 aylık sıçana göre, # $p<0.01$; 4 aylık sıçana göre.

5. TARTIŞMA

Epigenetik mekanizmalarla susturulduğu düşünülen ve gen regülasyonunda görevleri olduğu gösterilen endojen retrovirüslerinde yaşlanma teorilerine katkısının olabileceği yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, endojen retrovirüs aktivasyonu tarafından tetiklenen immün-patojenik sürecin özellikle yaşlanmaya ve yaşlanmaya bağlı nörodejenerasyona sebep olabileceği konusunda kanıtlar sunulmuştur. Bu nedenle, endojen retrovirüslerin, düzensiz hücresel alt popülasyonların çoğalmasını desteklemesi ve sisteme özgü "yaşlanmayı" hızlandırması nedeniyle epigenetik bir etken gibi davrandığı sonucuna varılmıştır (218,219).

Beyin yaşlanmasının ardındaki moleküler mekanizmaları anlamak, yaşlanmayı geciktirmeye ve yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkları önlemeye ve hatta tedavi etmeye yönelik stratejilerin geliştirilmesini destekleyecektir. Bu nedenle, bu çalışmada, beyindeki yaşlanma sürecinin ne zaman başladığı ve başlamasında rol oynayan moleküler mekanizmalara ışık tutabilmek ve katkı sağlamak amacıyla yaşla birlikte beyindeki endojen retrovirüslerin nasıl değiştiğini ve endojen retrovirüslerle ilişkili diğer genlerin değişiminin beyin yaşlanmasındaki rolünü araştırılması amaçlanmıştır.

Endojen retrovirüslerin beyin yaşlanmasındaki rolünü incelemek amacıyla biz de çalışmamızda Syn-B geninin ekspresyonunun beyin korteksinde yaşla birlikte nasıl değiştiğine baktık. Mevcut çalışmamızda, yaşla birlikte Syn-B geninin ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı, 1 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında 4 aylık sıçanlarda 1.5 katlık bir değişim varken 12 aylık sıçanlarda 2 katlık bir değişimin olduğunu kaydettik. Yapılan çalışmalarda özellikle bazı patolojik durumlarda sinsitin-2 gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Örneğin; Shen ve arkadaşları sinsitin 2 gen ekspresyonunun akut miyeloid lösemide artışının immün regülasyon üzerinde etkili olduğunu (220), Tovo ve arkadaşları kronik immün trombositopenili çocuklarda sağlıklı çocuklara oranla sinsitin-2 ekspresyonunun artışının hastalık patogenezinde etkili olduğunu (221) ve yine aynı ekibin otizm spektrum bozukluğu olan çocuklarda da artan sinsitin-2 ekspresyonu ile hastalığın patogenezi arasında pozitif bir korelasyonun olduğu gösterilmiştir (222).

Sinsitin-2 artışının beyinde omega 3 taşınmasını engelleyebileceği bildirilmiştir (223). Omega 3 eksikliğinin ak madde bütünlüğünde bozukluklara ve oligodendrosit olgunlaşmasında yetersizliklere yol açtığı bilinmektedir (224–226). Sıçanlarda artan Syn-b seviyesi ise insandaki homoloğu olan sinsitin-2'nin artışına işaret edebilir. İnsanda artan sinsitin-2 ekspresyonunun ise beyinde omega 3 transportunu inhibe edip ak madde bütünlüğünü bozarak beyin yaşlanmasında rol alabileceği söylenebilir.

Yapılan moleküler çalışmalarda ise HERV-W env'nin (sinsitin-1) insan monositlerinde TLR-4'e bağlanarak monositleri aktive edebildiği, dendritik hücrelerin HERV-W env proteini ile tetiklenerek Th1 gelişimini desteklediği gösterilmiştir (105). Multipl sklerozda (MS), HERV-W env proteininin, beyindeki kronik aktif lezyonlardaki makrofajlar ve mikroglia tarafından ifade edildiğinden dolayı hastalık patogeneğinde öne sürülmüştür (105). İnsan ve fare mikroglialarının HERV-W env proteinine maruziyeti sonrasında proinflamatuvar sitokin, kemokin ve nitrik oksit seviyesini yükseltmesi ile aksonal hasara yol açtığı da yapılan çalışmaların sonuçlarındandır (227). Anti-HERV-W Env antikoru GNBAC1/Temelimab ile yapılan klinik çalışmada MS hastalarındaki olumlu gelişmeler, HERV-W env'in mikroglial akson hasarında ve myelin yenilenmesinin önlenmesinde rol oynayabileceğini gösterdi (228). Bu proteinin ayrıca oligodendrosit öncü hücre farklılaşmasını da inhibe ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (229).

İnsan fetal astrositlerinde sinsitin genini içeren virüs vektörü ile enfekte edilerek HERV-W env overekspresyonu sağlandığında nöroinflamasyon ilişkili gen ekspresyonlarının ve protein karbonil seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Bu hücre kültüründen elde edilen şartlanmış medyumun oligodendrosit kültürüne uygulandığında da oligodendrosit hücrelerinin öldüğü ve hücresel uzantıların çekildiği kaydedilmiştir. Ancak nöronlarda bu etki gösterilememiştir. İnsan fetal astrositlerinin HERV-W env içermeyen SINrep5-EGFP virüsle enfekte edilmesiyle elde edilen şartlanmış medyumun ise oligodendrositlerde hücre ölümü gerçekleştirmediği bildirilmiştir. Başka bir kontrol olarak HIV-JFRL retrovirüs envelop proteini HFA hücrelerinde eksprese edildikten sonra elde edilen şartlanmış medyumun ise oligodendrositlerde ölümüne ve hücre uzantısının çekilmesine yol açmadığı ancak nöronlarda sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (229). Bu çalışmadan anlaşılabileceği üzere sinsitin proteini kaynaklı inflamatuvar süreçlerin oligodendrositlere spesifik bir hasar oluşturması 30'lu yaşlarda görülen ak madde bütünlüğündeki bozulmayı açıklayabilecek verilere örnek oluşturmaktadır.

İnsan fetal astrositlerine sinsitin geni taşıyan virüs enfeksiyonu sonrasında non-steroid anti-inflamatuvar, antioksidan ferülik asit ve iki farklı iNOS inhibitörü uygulandıktan

sonra alınan şartlanmış medyumun oligodentrosit kültürüne eklenmesi sonrasında non-steroid anti-inflamatuvar ve ferülik asit uygulanan gruplarda hücre ölümü ve hücre uzantılarının çekilmesinin diğer ilaçlara göre azaldığı gösterilmiştir. Bu azalmanın protein karbonil miktarındaki azalma ile korele olduğu da bildirilmiştir (229). Bu çalışmada sinsitin astrositlerde ekspresyonunun protein sentezi olmadan da IL-1 β , iNOS ve redoks reaktanlarının sentezine yol açarak özellikle oligodendrositlerde patolojik etkiler oluşturabileceğine dikkat çekilmiştir. Bizim çalışmamızda da 4 aylık genç sıçanlarda artmaya başlayan sinsitin B ekspresyonunun 12 aylık erişkin sıçanlarda daha fazla miktarda eksprese olduğu gözlenmiştir. Artan sinsitin B ifadesinin yaşla birlikte retrotranspozon aktifleşmesine işaret ettiği görülmektedir. Bu durum yaşla birlikte beyindeki yapılarıdaki dejenerasyonla bu retrotranspozonların artışının ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, mutant farelerle yapılan bir çalışmada özellikle oligodentrosit prekürsör hücrelerin farklılaşmasında sorun olduğu ve bu miyelin kılıfındaki problemle birlikte MS hastalığının belirtilerinin görüldüğü gösterilmiştir (230).

Başka bir çalışmada ise CIBERSORTx kullanılarak 10 MS hastalığı olan ve 5 sağlıklı bireyin beyin ak maddesinden elde edilen RNA'lardan dizileme yapılarak 215 HERV-W (sinsitin-1) lokusunun transkripsiyonel aktivitesi analiz edildiğinde, 65 HERV-W lokusunun tespit edilebilir bir ifadeye sahip olduğu ve bunlardan 14'ünün MS ve kontrol örnekleri arasında farklı şekilde ifade edildiği gösterilmiştir. Bu 14 lokustan 12'sinin MS'de yukarı regüle edildiği belirlenmiştir. Yukarı regüle edilen 8 HERV-W lokusunun ifade seviyeleri, tahmini oligodendrosit oranları ile anlamlı negatif korelasyon göstermiş, bu da bu lokusların oligodendrosit oluşumu ve/veya bakım dinamikleri ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca, Gen Set Zenginleştirme Analizi sonuçları, yukarı regüle edilen üç HERV-W lokusunun, 2p16.2, 2q13 ve Xq13.3'ün, oligodendrosit gelişimi ve miyelinizasyonunun baskılanması ile ilişkili olduğunu göstermiştir (231).

Sinsitin B miktarındaki yaşa bağlı değişimin beyindeki sinyal yollarını etkileyip etkilemediğini araştırmak amacıyla, çalışmamızda sinsitin B ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz bazı genlerin ekspresyonlarındaki değişimleri de inceledik. Bu genlerden biri başka bir transpozon olan ve toplam genom uzunluğunun önemli bir kısmını oluşturan LINE-1 idi. Çalışmamızda, LINE-1 gen ekspresyonunun 4 aylık sıçanlarda artmamasına rağmen 12 aylık sıçanlarda sinsitin-B gibi genç hayvanlara oranla 2 kat arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, artan LINE-1 ifadesinin yaşlanma sürecinde retrotranspozon aktifleşmesinin 12 aylık sıçanlarda da yani insanlara oranla orta yaşlarda da görülebileceğini desteklemektedir.

LINE-1'in insan beyinde ekspresyonu birçok çalışmada gösterilmişse de LINE-1 kaynaklı proteinlerin varlığına dair pek çalışma bulunmamaktadır (232–235). Daha önce yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalardan birinde LINE-1 kaynaklı ORF1p proteini, retrotranspozisyon için gerekli olan proteinlerden biri, insan postmortem beyin dokusunda immünohistokimyasal metodlar ile gösterilmiş ve çalışmada yaş ile ORF1p proteini miktarında belirgin artış olduğu bildirilmiştir (236). *Saccharomyces cerevisiae* (237), *Caenorhabditis elegans* (238), insan (87,239) ve fare (240) gibi birçok türde transpozon hareketliliğinin yaşla birlikte arttığı düşünülmektedir. Bilindiği üzere yaşlanma, baskılayıcı epigenetik düzenleyicileri değiştirerek heterokromatin organizasyonunun bozulmasına yol açmaktadır (241,242). Bunların yanı sıra, yaşlanma ile genel olarak transpozon baskılayıcı faktörler azalmakta (240) ve oksidatif stres gibi LINE-1 ekspresyonuna yol açan çevresel faktörler artmaktadır (243,244). Fakat LINE-1 ekspresyonun özellikle farklılaşan nöral prekürsor hücrelerinde arttığı gözlenmiştir. Bu nedenle LINE-1'ler, reverse transkripsiyondan bağımsız bir şekilde nöral farklılaşma hızını düzenleyerek hem insan hem de fare beyini gelişiminde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir. Farklılaşmanın tamamlandığı beyinlerde ise kontrolsüz olarak ekspresyonlarının artmasının genomik istikrarsızlığa neden olmasından dolayı, erişkin beyinde genellikle LINE-1'in çeşitli mekanizmalar tarafından susturulduğu bilinmektedir (245).

LINE-1'in susturulmasında görevli olan enzimlerden biri de SIRT6'dır. SIRT6 ile LINE-1 susturulma düzenlemesinin yaşla birlikte işlevinin bozulması hücrel stres veya yaşlanma sonrası represyon mekanizmalardaki işlevsel bozukluğunun gösterilmesi açısından iyi bir örnek oluşturmaktadır. Bununla ilişkili yapılan çalışmalarda yaşlanma sırasında ya da DNA hasarında heterokromatin oluşumunu destekleyen histon deasetilaz proteini olan SIRT6'nın LINE-1 lokusunda azalması, LINE-1 derepresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (240). SIRT6'nın yaşlanmada önemli bir düzenleyici olduğu knockout fare çalışmalarında yaşlanmanın hızlanması (246) ve overekspresyonunda fare ömrünün uzaması ile gösterilmiştir (247). İlginç bir şekilde, beyin bütün diğer organlar arasında yaşlanma sonrası LINE-1'in 5'UTR bölgesine bağlanan SIRT6'nın kısmi kaybı ile en yüksek LINE-1 upregulasyonu gösteren doku olmuştur. Bu durum ile beyindeki yüksek retrotranspozisyon oranları (248,249), birçok nörolojik hastalığın LINE-1 disregulasyonu ile ilişkili olması (249,250), beyin yaşlanmasında LINE-1 ilişkili patolojilerin daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre yaşamını ve genomik sağlamlığı koruyan bir diğer sirtuin ise SIRT7'dir (251). SIRT7 diğer görevlerinin yanında bir bağlayıcı faktör olarak da işlev görmektedir. Kısmen

fare ve insan hücrelerindeki LINE-1 dizileri ile nükleer lamina proteini lamin A/C arasında H3K18 (histon H3 lizin 18) asetilasyonu yaparak etki etmektedir. LINE-1 elementleri bu yüzden lamin ilişkili domainler açısından zengindir. Bu bölgeler nükleer periferdeki heterokromatin yapılarını oluşturmakta (252) ve SIRT'nin sağladığı bağlanma ile LINE-1'in susturulmasını gerçekleştirmektedir (253). Yaşlanma ile SIRT7'nin hematopoietik hücrelerdeki downregulasyonu gösterilmiştir ve bu durumun LINE-1 derepresyonuna sebep olabileceği düşünülmektedir (254). Bunun yanında, insan kanından elde edilen hücreden bağımsız DNA'larda LINE-1 promoter bölgesinde yaşlanma ile metilasyonun azaldığı da bildirilmiştir. Aynı şekilde bu durumun da LINE-1 ekspresyonunun artmasına yol açabileceği bildirilmiştir (255). İnsan fibroblastlarında yapılan çalışmalarda, yaşlanmış hücrelerin promotör ve artırıcı aktif gen bölgelerinin daha kapalı kromatin yapısı gösterirken, retrotranspozon (LINE-1) bölgelerinin daha açık kromatin yapısı gösterdiği (256) ve yaşlı farelerin karaciğer ve kas dokularındaki retroelementlerin artmış RNA ekspresyonu ve kopya sayısına sahip olduğu yapılan diğer çalışmalarda gösterilmiştir (239).

LINE-1'in yaşlanmada önemli bir rol oynayabileceğini iddia eden "LINEage" teorisi 2010 yılında ortaya atılmıştı (257). Bu teoriye göre LINE-1 endojen bir saat gibi işleyerek sürekli DNA'yı hasara uğratmakta ve genomik bütünlükte yavaş yavaş erozyona neden olmaktadır. Bu teori üzerine yapılan çalışmalarda LINE-1'in yaşlanmada sadece bir gösterge rolü olmadığı, aynı zamanda yaşlanmanın temelinde rol oynayan bir faktör olduğu da gösterilmiştir (257).

LINE-1'in yaşla birlikte epigenetik baskılanmasının ortadan kalkması ve regülasyonunda yer alan SIRT6 ve SIRT7 miktarındaki yaşla birlikte değişimi LINE-1 ekspresyonunun artmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda DNA hasarı ve inflamasyon gibi yollar ile yaşlanmada rol alabilecek mekanizmalarda etkili olduğunu daha önce yapılan çalışmalarla gösterildiğinden çalışmamızda LINE-1'in 12 aylık sıçanlarda artması beyin yaşlanması sonucu orta yaşlı insanlarda gelişen bilişsel kayıpları ve morfolojik bozuklukları açıklayabilecek potansiyele sahiptir (2,3,172,258). Özellikle beyindeki yüksek retrotranspozisyon oranlarının (248,249) birçok nörolojik hastalıkta LINE-1 disregulasyonu ile ilişkili olarak gösterilmesi (249,250), beyin yaşlanmasında LINE-1 ilişkili patolojilerin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

İnsan endojen retrovirüslerin transkripsiyonu, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmalar aracılığıyla susturulsa da çevresel faktörlerin endojen retrovirüs aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Üç parçalı motif içeren 28 (TRIM28), insandaki en büyük transkripsiyonel düzenleyici ailesi için nükleer bir koruyucu

olarak işlev görmektedir. SETDB1 proteini ise, histon proteini için oldukça spesifik bir metiltransferazdır. Hem TRIM28 hem de SETDB1, insan endojen retrovirüslerin epigenetik transkripsiyonel baskılanması için spesifik etiketlerdir (259). Bu nedenle biz de çalışmamızda bu iki proteinin gen düzeyindeki değişimlerin yaşla birlikte nasıl olduğunu inceledik. Çalışmamızda 12 aylık sıçanların frontal korteksinde hem TRIM28 hem de SETDB1'in 1 aylık sıçanlara oranla 12 aylık sıçanlarda azaldığı görülmeye rağmen bu azalmanın sadece TRIM28'de anlamlı olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda artan SYNB ve LINE-1 ekspresyonunun azalan TRIM28 gen ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Epigenetik baskılayıcı olan TRIM28'in nöral progenitör hücrelerde genetik delesyonunun ERV'den gelişen intrasisternal A partiküllerinin birikimine sebep olduğu ve bu yolla transgenik farelerin beyinlerinde inflamasyon geliştiği daha önce yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (84). Epigenetik baskılayıcı SETDB1'in silinmesiyle oluşturulan deneysel bir düzenekte de pro-B hücrelerinde de ERV kaynaklı protein birikimine bağlı hücre ölümleri tespit edilmiştir (85).

TRIM28'in endojen retrovirüslerin sessiz bir durumda tutulmasında rol oynadığını daha önce yapılan birçok çalışma tarafından vurgulanmaktadır (260). 12 aylık sıçanlarda gözlemlenen TRIM28'in azalan transkripsiyonel seviyelerinin bazı HERV elemanlarının artan ekspresyonundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. TRIM28/SETDB1 protein kompleksinin, pluripotent kök hücrelerde ve erken embriyolarda endojen retrovirüslerin sessiz durumda tutulması için hayati önem taşıdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (260). Epigenetik süreçler, yapısal DNA değişikliği olmaksızın gen ifadesinin düzenlenmesinde kromatin bazlı mekanizmaları kapsamaktadır. Çevresel faktörler, TRIM28 ve SETDB1'in neden olduğu gibi epigenetik değişikliklere neden olabilmektedir. TRIM28, hedef proteinlerin lizin kalıntılarına bağlanarak bunların fosforilasyonuna ve proteozom kaynaklı bozunmaya neden olduğu bilinmektedir. TRIM28, protein degradasyonu, RNA eklenmesi ve transkripsiyonel inhibisyon gibi çeşitli hücre fonksiyonlarında yer alan bir translasyon sonrası olay olan SUMOlaşım için SETDB1'i görevlendirmektedir (261). TRIM28 ve SETDB1 çok sayıda epigenetik süreçte yer almaktadır ve hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık üzerinde etki göstermektedir (262). B hücresinin farklılaşmasını ve T hücresinin aktivasyonunu etkilemektedir. Özellikle, KRAB-ZFP'ler ve Foxp3 içeren kompleks aracılığıyla, TRIM28/SETDB1, T hücrelerinin düzenleyici fenotiplere genişlemesini kontrol etmekte, Treg baskılayıcı aktivitesini veya dentritik hücrelerin dağılımını ve T hücresinin inflamatuvar efektör hücrelere kırılmasını düzenlemektedir (263).

Yapılan bazı çalışmalar TRIM28 seviyesindeki değişimlerin nörodejenerasyonla ilişkisinin de olabileceğini göstermiştir (264). Bu nedenle TRIM28'in yaşlanmayı düzenlediği ve yaşlanmayla ilişkili sinyalizasyonun ilgili fenotipinin indüksiyonunu etkilediği bilinmektedir (265).

Yapılan çalışmalarda rekombinant ENV (sinsitin-1) proteini uygulandığında sıçan oligodendritik hücrelerde iNOS ekspresyonunun arttığı ve proinflamatuvar sitokin salgısının gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca sinsitin-1 proteinin aşırı ekspresyonunun in vitro insan astrositlerinde ve in vivo transgenik farelerde inflamasyona yol açtığı belirlenmiştir (84). Biz de bu nedenle sinsitin B ve LINE-1'in yaşla birlikte ekspresyon artışının proinflamatuvar süreçlerle ilişkisini göstermek amacıyla IL-6 ekspresyonundaki değişimin 1 aylık sıçanlara oranla 4 aylık ve 12 aylık sıçanlarda nasıl olduğunu inceledik. Çalışmamızda IL-6 gen ekspresyonunun hem 4 aylık hem de 12 aylık sıçan beyinlerinde anlamlı dercede arttığını gözlemledik. Daha önce 4 ve 24 aylık IL-6 knockout ve vahşi tip farelerde yapılan karşılaştırmada IL-6 knockout fare hipokampusunda azalmış p53 protein miktarı ile artmış otofaji genlerinin ekspresyonu IL-6 proteininin eksikliğinin yaş ile gelişen hücresel hasar birikimini azalttığını göstermiştir (266). Alzheimer hastalığına sahip farelerin hipokampusunda ise artmış IL-6 yolak aktivasyonu gösterilmiştir. Buna paralel olarak beyinde IL-6'nın nötralizasyonunun hafıza sorunlarını azalttığı ve Alzheimer hastalığında görülen periferik glukoz intoleransını hafıflettiği de gösterilmiştir (267). Yine bu çalışmada genç yetişkin IL-6 eksikliği olan farelerde Morris su labirentinde yapılan deneylerde öğrenme yeteneğinin zayıflaması ile IL-6'nın fizyolojik seviyesinin doğru hafıza oluşumuna katılan mekanizmalarda rol oynadığı ve IL-6 sinyalizasyonunun beyin gelişimindeki önemi de gösterilmiştir. Hem 4 hem de 24 aylık IL-6 knockout farelerde benzer seviyede korunan öğrenme yeteneği ve 24 aylık vahşi tip farelerdeki zayıflama, IL-6 eksprese etmeyen farelerde yaşa bağlı hafıza kaybının daha yavaş olduğunu göstermektedir (268). Bu çalışmada aynı zamanda IL-6'nın, süperoksit üreten bağışıklık enzimi NADPH-oksidazın artan nöronal ifadesi için gerekli ve yeterli olduğu ve bunun kanonik olmayan NF- κ B sinyalleşmesi ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca, NADPH-oksidaz tarafından üretilen süperoksitin, normal bilgi işleme, kodlama ve hatırlama için gerekli olan parvalbumin ifade eden GABAerjik internöronların yaşa bağlı kaybından doğrudan sorumlu olduğu gösterilmiştir. IL-6'nın hedeflenmiş olarak silinmesi veya kronik süperoksit-dismutaz mimetiği ile süperoksitin ortadan kaldırılması, parvalbumin internöronlarının yaşa bağlı kaybını önlemekte ve yaşa bağlı bilişsel eksiklikleri tersine çevirdiği de yapılan çalışmada gösterilmiştir (269).

Bizim çalışmamıza paralel olarak daha önce yapılan bir çalışmada, 1 aylık yavru, 3 aylık yetişkin ve 24 aylık yaşlı erkek BALB/c farelerin beyinlerinden alınan protein ekstraktlarında yapılan ölçümlerde beyincik, serebral korteks ve hipokampusta IL-6 konsantrasyonu yaşla birlikte arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak, yaşlanmada spontan IL-6 üretimini değerlendirmek amacıyla yeni doğmuş (<7gün), yetişkin (3-6 ay) ve yaşlı (24 ay) farelerin beyinlerinden glial hücreler kültüre edildiğinde, IL-6 gen ekspresyonunda ve IL-6 protein konsantrasyonunda yaşa bağlı bir artış görüldüğü belirlenmiştir. Aynı zamanda IL-6 pozitif olan mikrogliya oranının da yaşla birlikte arttığı gösterilmiştir. Bu veriler, mikrogliaların yaşlı beyindeki artmış IL-6 seviyesine katkıda bulunduğunu da göstermektedir (270).

İnsan çalışmalarında da yaşlı yetişkinlerde dolaşımdaki IL-6 seviyelerinin genç yetişkinlere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (163,271). Weaver ve ark (272) tarafından yapılan uzun süreli bir çalışmada, sağlıklı yaşlı bireylerde plazmada yaşa bağlı IL-6 artışı bildirilmiş ve bu artışın bilişsel yeteneklerde hafif bir düşüşle ilişkili olduğu bulunmuştur. Önemli olarak, yaşlı yetişkinlerden ve farelerden izole edilen lenfoid hücrelerin de kendiliğinden yüksek seviyelerde IL-6 salgıladığı gösterilmiştir (273,274). Ayrıca yaşlı farelerin tüm beyin, hipokampus, serebral korteks ve beyincikleri incelendiğinde IL-6 seviyelerinin genç ve yetişkin farelere oranla arttığı gözlenmiştir (270). Benzer şekilde, 10 aylık senesans-hızlandırılmış farelerin serebral korteks ve hipokampuslarında da IL-6 seviyelerinin yaşça eş kontrollere oranla arttığı görülmüştür (275). Yapılan bazı çalışmalarda, yaşlı beyindeki IL-6 artışının genç kontrollere göre beyinde daha fazla salgılanmasından kaynaklandığı gösterilmiştir (275). Ayrıca, IL-6 protein seviyelerine benzer olarak sağlıklı yaşlı farelerin tüm beyinde, yetişkinlere kıyasla belirgin bir IL-6 mRNA artışı da gösterilmiştir (270). IL-6 ve MAC-1 (mikrogliya için bir belirteç) boyaması için yapılan iki renkli akış sitometrisi analizi, yaşa bağlı IL-6-pozitif mikrogliyal hücrelerde bir artış olduğunu göstermiştir (270). Ayrıca, bu çalışmada yaşla birlikte IL-6 ortalama floresan yoğunluğu artması ile hücre başına daha fazla IL-6 ifadesinin olduğunu göstermiştir. Çok yaşlı rhesus maymunlarından kültüre edilen endotelial hücreler de yetişkin ve fetal/neonatal maymunlardan izole edilenlere göre daha fazla IL-6 salgılamıştır (276). Yapılan bu çalışmalar yaşla birlikte beyinde IL-6 ifadesinin hem gen hem de protein düzeyinde arttığını göstermektedir.

Yaşlı beyindeki IL-6 ifadesinin, gelişim sırasında olduğu gibi nöroprotektif özellikleri sürdürmesi mümkün olsa da elde edilen kanıtların çoğu aksini göstermektedir. Yaşlı beyindeki IL-6 artışı nörotoksik olabileceği ve bilişsel ve motivasyonel sistemleri

etkileyebileceği elde edilen sonuçlardan bazılarıdır (277). Örneğin, Down sendromu ve Alzheimer hastalığındaki demans şiddeti, artan IL-6 konsantrasyonları ile ilişkili bulunmuştur (278).

Transgenik farelerin nöronlarındaki IL-6 ifadesinin artması ile artan astrositlerin sayısı astrosit boyutu ve dallanmış mikrogial hücrelerin sayısının ilişkisi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (279). Ayrıca, astrositlerinde IL-6 ifadesinin aşırı olduğu transgenik farelerin, sitokin ifadesi düzeyi ile ilişkili olarak nörolojik hastalık geliştirme oranlarında artış göstermiştir (280). IL-6 transgeninin ilerleyici nöropatik belirtilerinin özellikle kaçınma öğrenimindeki defektlerle yakından ilişkili olması (281), IL-6'nın hipokampal nöronlarda uzun vadeli potansiyasyonu engellediğine işaret etmiştir (282). Yakın tarihli bir çalışma, astrositleri IL-6'yı aşırı ifade eden yetişkin transgenik farelerin hipokampal dentate gyrusunda nörojenezin %63 oranında azaldığını göstermiştir (283). Embriyonik serebral prekürsör hücrelerin IL-6 varlığında kültüre edildiğinde astrositlere farklılaşması (284) IL-6'nın progenitor hücreleri glial hücre soyağacına yönlendirerek yaşlı beyindeki nörojenezini sınırladığını göstermiştir. Bu durum özellikle Alzheimer hastalığı ile ilgili olan gliozisin yaşlı beyinde IL-6 artışı ile ilişkili olmasını ve IL-6 seviyesi yüksek bireylerin bu tip nörolojik hastalığa yatkın hale gelmesine veya en azından yaşlılarda gözlemlenen bilişsel bozuklukları kısmen de olsa açıklamaktadır.

Diğer taraftan IL6 ve endojen retrovirüslerin ilişkisini gösteren bir çalışmada amyotrofik lateral sklerozda TDP43 proteininin insan endojen retrovirüs K (HERV-K) ekspresyonunu aktiflediği (285) ve inflamasyonda ERV ve ERV çevresindeki dizilerin ekspresyonu artırdığı gösterilmiştir (286). Uzun terminal tekrarı olan LTR dizileri proinflamatuvar NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri bulundurmaktadır (133,287). NF- κ B'nin doğal ve adaptif bağışıklıktaki düzenleyici etkileri ve TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IFN γ gibi birçok proinflamatuvar sitokinin NF- κ B'yi aktifleyebildiği düşünüldüğünde, NF- κ B'nin LTR çevresine bağlanarak ERV ekspresyonunu etkileyebilmesi, inflamasyon ile gelişen ERV ekspresyon artışını açıklamaktadır (133). Benzer şekilde insan astrosit hücrelerinde 13 aylıktan itibaren artan TNF- α , IFN γ , IL-6 ve IL-1'in sıçanların hipokampusunda astrositlerin hipertrofiye uğramasına neden olduğu gösterilmiştir (288).

Sonuç olarak çalışmamızdaki IL-6 artışı retrotranspozon aktivasyonu sonrası steril inflamasyonu gösterdiği gibi beyindeki yapım süreçlerini kısıtlayıp yıkımı arttırdığından beyindeki artmış senescence ile de ilişkili olabilir. Bu durumda beyin yaşlanmasının 12 aylık sıçanlarda gelişmeye başladığı öne sürülebilmektedir.

Endojen retrovirüslerle yapılan çalışmalarda astrositlerin özellikle etkilenmesi nedeniyle çalışmamızda merkezi sinir sistemindeki astrositlerden eksprese olan GFAP proteinin ekspresyonunun yaşla birlikte nasıl değiştiğini de inceledik. Yapılan analizlerde 4 aylık sıçanlardaki GFAP ekspresyonunda bir değişim görülmezken yapılan çalışmalara benzer şekilde 12 aylık sıçanların frontal korteksinde GFAP ekspresyonunun yaklaşık 2 kat azaldığını tespit ettik. Daha önce yapılan bir çalışmada ise, bizim çalışmamızın aksine 24 aylık sıçanlarda GFAP mRNA miktarının 6-7 aylıklara göre hipokampusta 2 kat striatumda 4 kat arttığı gösterilmiştir (289). Başka bir çalışmada ise, GFAP ekspresyonunun 29 aylık sıçanların 3 aylık ve 13 aylık sıçanlara göre arttığı, fakat 13 aylık ile 3 aylık grup arasında fark olmadığı gösterilmiştir (290). Erkek Wistar sıçanların serebellumunda yapılan immunohistokimyasal bir çalışmada ise GFAP seviyesinin ak madde de yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir (291). Benzer şekilde yapılan bir çalışma, yaşlı (26 aylık) ve çok yaşlı (29-32 aylık) dişi sıçanlarının 4-6 aylık sıçanlara göre hipokampusün stratum radiatum bölgesinde GFAP-pozitif astrositlerin sayısının azaldığını ve bu astrositlerin kısalmış uzantılara ve azalmış dallanma karmaşıklığına sahip olduğu bildirilmiştir (292).

Başka bir çalışma, 24 aylık farelerin entorhinal korteksinde benzer bir şekilde GFAP aktivitesinde azalma olduğunu bulmuştur, bu durumun özellikle astrositlerin dallanmasının azalmasından kaynaklandığı öne sürülmüş ve CA1 alanında ve dentat girusta artmış GFAP aktivitesi bildirilmiştir (292).

3, 9, 18 ve 24 aylık SV129/C57BL6 farelerde yapılan çalışmada, dentat girusta 3 aylık ve 9 aylık gruplar arasında GFAP+ astroglia profilleri benzer iken 18 ve 24 aylık gruplarda GFAP immunoreaktivitesinde artış gösterildi. Ayrıca 24 aylık grupta 18 aylık gruba göre de anlamlı artış tespit edilmiştir (293). CA1 bölgesinde ise 9 aylık grupta 3 aylık gruba göre GFAP artışı vardı. En yüksek artış 24 aylık grupta iken 9 ve 18 aylık gruplar arasında anlamlı fark olmasa da 18 aylık grupta artışa eğilim bildirilmiştir. CA1 bölgesinde yaşla birlikte GFAP seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir (293). 3 aylık sıçanların entorhinal korteksi ile karşılaştırıldığında 9, 18 ve 24 aylık sıçanların yaşla birlikte GFAP immunoreaktivitesinde bir azalmanın olduğu bildirilmiştir (293).

6, 12 ve 29 aylık C57BL/6J farelerde yapılan başka bir çalışmada korteks serebellum ve hipokampustan elde edilen dokulardan RNA izolasyonu yapıldı. Bu RNA izolatlarından Northern blot ile 3-tubulin, GFAP, GAD (glutamik asit dekarboksilaz), SS(Somatostatin) ve Thy-1 RNA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Yaşla sadece GFAP seviyesinin 29 aylık farelerde

arttığı bildirilmiştir. Bilgisayar yardımlı dansitometri ile 29 aylık farelerde serebellum ve kortekste sinyal artışının 3 kat olduğu bildirilmiştir. (294).

GFAP yapısal proteini astrositlerin karakterizasyonu için bir belirteçtir. Ayrıca, astroglia hücrelerinin beyinde en çok bulunan hücre türü olduğu ve nöronlar için hem yapısal hem de işlevsel destek sağladığı (nörotransmitter glutamat geri dönüşümü ve trofik faktör salınımı dahil) bilinmektedir (295). GFAP mRNA ifadeleri çeşitli nükleer reseptör hormonları, büyüme faktörleri ve lipopolisakkaritler tarafından düzenlenmektedir. GFAP ayrıca bir dizi translasyon sonrası modifikasyona tabi tutulurken, GFAP mutasyonları da bir takım protein birikimlerine neden olan hastalıklara sebebiyet vermektedir. GFAP gen aktivasyonu ve protein indüksiyonunun, merkezi sinir sistemi yaralanmaları ve nörodejenerasyonu takiben astroglia hücre aktivasyonunda (astrogliosis) kritik bir rol oynadığı görülmektedir. Ortaya çıkan kanıtlar ayrıca, travmatik beyin ve omurilik yaralanmaları ve felç sonrasında, GFAP proteini ve onun parçalanma ürünlerinin hızlı bir şekilde biyosıvılara salındığını ve bu durumun onları bu tür nörolojik bozukluklar için güçlü aday biyobelirteçler haline getirdiğini göstermektedir (296). GFAP ekspresyonunun travmatik durumlarda özellikle artması, çalışmamızdaki GFAP seviyesindeki azalmanın normal fizyolojik yaşlanma süreçlerinin erken yaşlanma dönemlerinde GFAP seviyelerinin patolojik seviyelere ulaşmadığını göstermektedir. Machnik ve arkadaşları tarafından 2024 yılında yapılan bir hücre kültürü çalışmasında astrosit hücrelerine verilen hasarda sinsitin-1 seviyesindeki azalmayla birlikte GFAP seviyesinde anlamlı bir artışın olduğu gösterilmiştir (297). Bu durum bizim sağlıklı hayvanlarımızda yaşla birlikte artan sinsitin-b seviyelerinin GFAP seviyelerinde bir azalmaya sebep olmasını kısmen açıklamaktadır. Bu durum GFAP seviyeleri ile endojen retrovirüs seviyeleri arasında negatif bir korelasyonun olduğuna işaret etmekte ve artan sinsitin seviyelerinin inflamasyona bağlı bir şekilde astrosit ölümlerine sebebiyet verebileceği hipotezini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, HIV Nefin beklentinin aksine GFAP ekspresyonunun azaltması ve astrositlerde glutamat metabolizmasının değişmesine ve astrosit proliferasyonuna yol açması özellikle viral partiküllerin gen ekspresyonunda promotör kısımlardaki etkisine işaret etmektedir (298)

Normalde çoğu hücrede düşük seviyelerde bulunan COX-2 geni de inflamasyon ile pek çok hücrede hızla eksprese olmakta ve miktarında hızlı bir artış görülmektedir (299). Bizim çalışmamızda ise COX-2 miktarında 12 aylık sıçanlarda bir artış görülmesine rağmen bu artışın 1 aylık sıçanlara oranla anlamlılık seviyesine ulaşmadığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, 5 ve 30 aylık farelerin korteks ve serebellumunda yapılan 6347 genin analizinde COX2'nin yaşla birlikte değişmediği bildirilmiştir (300). Diğer taraftan, 4-6, 12-14 ve 20-

21 aylık farelerin kortikal kılcal damarlarında yapılan çalışmada, sıvı sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi cihazı ile yapılan çalışmada 12-14 aylık farelerde COX2 seviyesinin 4-6 aylık ve 20-21 aylık farelere göre yüksek olduğu bildirilmiştir (301). Ayrıca, farelerin dentat girus ve hipokampal CA2/3 bölgelerinden elde edilen dokularda yapılan western blot ve immunohistokimya çalışmasında 24 aylık farelerde daha küçük yaşlardaki (12 aylık ve 1 aylık) farelere göre azalmış COX-2 seviyesi tespit edilmiştir (302). Bizim çalışmamıza benzer şekilde, sıçanların hipokampus ve korteksinde yapılan başka bir çalışmada ise COX-2 ekspresyonunun 30 aylık sıçanlarda 4 aylık sıçanlara göre hipokampusta azaldığı fakat korteksteki ekspresyonunun yaş grupları arasında fark oluşturmadığı bildirilmiştir (316).

Hipokampal GFAP ekspresyonu ise 4 aylık gruba göre 24 aylık grupta %46, 30 aylık grupta ise %72 arttığı bildirildi. Kortikal GFAP ekspresyonu ise 4 aylık sıçanlara göre 24 aylık grupta 2 kat, 30 aylıkta ise 2.4 kat arttığı bildirilmiştir (303). Diğer taraftan, 1, 3, 6, 12, 18 ve 24 aylık çöl farelerinde yapılan çalışmada hipokampusta COX2 protein seviyelerinin ve immunoreaktivitesinin yaşla değişimi araştırıldı. Bu çalışmada CA1 bölgesinin stratum piramidale kısmında 6 aylık grupta COX-2 immünoreaktivitesinin, 1 ve 3 aylık gruplara kıyasla azaldığı, daha yaşlı gruplarda ise COX2 immünoreaktivitesinin zamanla arttığı bildirilmiştir. 18 ve 24 aylık gruplarda ise güçlü COX-2 immünoreaktivitesi bulunduğu gösterilmiştir. CA2/3 bölgesinde COX2 immünoreaktivitesinin 1 aylık gruba göre 3, 6 ve 12 aylık gruplarda azaldığı 12 aylık gruba göre 18 ve 24 aylık gruplarda arttığı bildirildi. Dentat girustaki immunoreaktivite ise 18 ve 24 aylık gruplarda diğer gruplara göre arttığı gösterilmiştir. Western blot ile hipokampusta yapılan protein seviyesi analizinde 3 aylık grupta 1 aylık gruba göre azalma gösterildi. 6 aylık grupta COX2 seviyesi en az iken yaşla birlikte arttığı bildirilmiştir (304).

6, 12, 18 ve 24 aylık Fischer 344 sıçanların beyin izolatında yapılan çalışmada da benzer şekilde COX2 mRNA ve protein seviyelerinde gruplar arasında fark bulunmamıştır (305,306). Bu çalışmada endojen retrovirüs geninin farklı sitotoksikite ve inflamatuvar araçların modülasyonunu uyarak patofizyolojik olayları başlattığı öne sürülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca yaşla birlikte ekspresyonel değişimine baktığımız sistemik inflamasyonda yer alan hücre sinyal proteini olan TNF- α 'nın da COX-2 ile benzer şekilde gruplar arasında anlamlı bir değişiminin olmadığı gözlenmiştir. TNF- α akut faz reaksiyonunu oluşturan sitokinlerden biridir ve birincil rolü bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesidir. TNF- α 'nın salınımı hücrede NF- κ B ve MAPK yollarının etkinleştirilmesine ve ölüm sinyallerinin tetiklenmesi ile apoptoz yolğunun aktifleşmesine

sebebiyet vermektedir (307). Literatürdeki çalışmalara baktığımızda ise özellikle hipokampüste yaşla birlikte TNF- α seviyelerinin arttığı görülmektedir. Örneğin; 3, 16 ve 22 aylık Wistar sıçanlarının hipokampusundan elde edilen doku örneklerinde yapılan bir çalışmada 3 aylık sıçanlara göre 16 ve 22 aylık sıçanlarda TNF- α seviyesinin arttığı bildirilmiştir (319). Diğer bir çalışmada da 6 ve 24 aylık sıçanların substansia nigrasından elde edilen örneklerde 24 aylık sıçanların TNF- α 'nın yanı sıra, IL-6 ve COX2'nin protein ve mRNA seviyelerinin 6 aylık sıçanlara göre arttığı bildirilmiştir (10). Yapılan çalışmalar patolojiye bağlı olarak değişen sinsitin proteininin TNF- α seviyelerinde artışa sebep olduğunu göstermektedir (309). 6 ve 16 aylık dişi farelerde yapılan çalışmada yaşlı farelerin hipokampusunda genç farelere göre IL-6 ve IL-1 β seviyelerinin arttığı, TNF- α seviyelerinin ise değişmediği bildirilmiştir. Bu çalışmada yüksek kolesterolü diyet ile beslenen yaşlı farelerde IL-1 β ve TNF- α seviyelerinin kontrol yaşlı farelere göre arttığı, TNF- α seviyesinin ise kolesterolle beslenen yaşlı farelerde kolesterolle beslenen genç farelere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (310).

Makrofajlar tarafından artan TNF- α salınımının inflamasyonun başlatılmasında merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle sağlıklı yaşlanmada ya da herhangi bir patolojik durum olmadığında gen ekspresyonunda değişim beklenmemektedir. Bunu destekler nitelikte yapılan bir çalışmada 3-4 ve 22-24 aylık Wistar sağlıklı sıçanlarda striatal TNF- α değerlerinin her iki yaşta da benzer olduğu gözlenmiştir. Ayrıca her iki yaş grubunda da TNF- α ifade eden hücrelerin ağırlıklı olarak GFAP-pozitif astrositlere karşılık geldiği bildirilmiştir. Yaşlı hasarlı striatumdaki TNF- α seviyelerinin ise, yetişkinlere göre anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edilmiştir (311). Yapılan bazı çalışmalarda da yaşlanmanın erken evrelerinde TNF- α seviyelerinde görülmeyen farklılıkların ileri yaşlılık dönemlerinde değiştiği gösterilmiştir. Örneğin; C57BL6/N farelerin bütün hemisferinden elde edilen dokuda yapılan qPCR analizinde yaşla birlikte TNF- α 'da artışa doğru bir meyil olsa da sadece 28 aylık farelerde artışın anlamlı bir seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (312).

Çalışmamızda yapılan morris su labirenti testinde gruplar arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir. Benzer çalışmalarda ise gerek uygulanan prosedürlerdeki farklılıklar gerek hayvan cinsi ve yaşının farklı olması nedeniyle farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin 10 adet Wistar cinsi sıçan içeren 6, 9, 12 aylık gruplarda yapılan morris su labirenti testinde 9 ve 12 aylık grupların ortalama toplam zaman ve ortalama toplam alınan yol değerlerinin 6 aylık gruba göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (313).

Başka bir çalışma dört farklı yaş grubundaki sıçanlarda (Fischer-344) mekânsal referans ve çalışma belleğindeki yaşa bağlı değişim örüntüsünü incelemiştir. Morris su labirenti testinde uygulanan yer ayrımı testi mekânsal referans belleğini; kaçış platformunun konumunun oturumdan oturuma değiştiği bir ayırt etme görevi olan tekrar edilen edinim testi ise mekânsal çalışma belleğini ölçmüştür. Test edilen yaş grupları 4 ay, 11 ay, 17 ay ve 24 ay olarak belirlenmiştir. Dört aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında, 24 aylık sıçanlar yer ayrımı performansının altı ölçütünün tamamında, 17 aylık sıçanlar beş ölçütte ve 11 aylık sıçanlar ise yalnızca bir ölçütte anlamlı düzeyde bozulma göstermiştir. Sadece 24 aylık sıçanlarda 4 aylıklarla karşılaştırıldığında tekrar edilen edinim testinde anlamlı bir çalışma belleği bozulması saptanmıştır (258).

Yaklaşık 20 adet sıçanın bulunduğu 8, 16 ve 24 aylık sıçanlardan oluşan grupların kullanıldığı diğer bir çalışmada morris su labirenti testinde 8 aylık sıçanların daha yaşlı gruplara göre platformun yerini daha çabuk öğrendiği gösterilmiştir (314).

15 adet 4 aylık, 30 adet 12 aylık ve 9 adet 24 aylık CD-COBS sıçanların kullanıldığı çalışmada morris su labirenti testinde 4 aylık sıçanlar diğer gruplara göre daha iyi performans gösterirken 24 aylık sıçanların platformun bulunduğu alan ile ilgi bir öğrenme davranışı sergilemediği bildirilmiştir (315).

10 adet 6 aylık 6'şar adet 12, 15, 18 ve 22 aylık Fisher 344 sıçanların kullanıldığı çalışmada her gün 10 dakika arayla 2 defa morris su labirenti testi yapılmıştır. Bu çalışmada aynı günün 2. testinde ilk teste göre daha kısa zamanda platformu bulan tek grup 6 aylık grup olmuştur. Ancak 6 aylık grup ile 12 ve 15 aylık grupların 2. deneyde platformu bulma süreleri açısından istatistiksel olarak fark gösterilememiştir. 18 ve 22 aylık gruplar ise diğer gruplara göre 2. testte platformu daha geç bulmuştur (316).

6, 12 ve 24 aylık long-evans cinsi sıçanların kullanıldığı çalışmada her grupta 12 sıçanla çalışılmıştır. Morris su labirenti testinde her gün 3-4 defa test tekrarlanmıştır. Bu çalışmada ilk testte 6 aylık sıçanlar 12 ve 24 aylık sıçanlara göre platformu daha erken bulurken, son testte ise 12 ve 6 aylık sıçanlar arasında bir fark gösterilememiştir (317). Bizim çalışmamızda 4 aylık sıçanlar kullanılmış olsa da test protokolü ve hayvan cinsi açısından çalışmamıza en yakın olan bu çalışmada genç ve orta yaşlı sıçanlar arasında fark gösterilmemiş olması bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Ancak genç farelerin orta yaşlı farelerden daha üstün performans gösterdiği diğer çalışmalar ise hipotezimizi destekler niteliktedir (258,313,315,316).

Çalışmamızda son olarak yaşlılıkla ilişkisi bilinen klotho geninin ekspresyonunun beyinde nasıl değiştiğini inceledik ve yaşla birlikte gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemledik. Literatürde yapılan birçok çalışmada ileri yaşlarda klotho seviyesinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir. Örneğin; 6, 9, 12 ve 18 aylık farelerde prefrontal korteks, korteks, hipokampus ve serebellumda yapılan analizde yaşla birlikte klotho ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Beyindeki transmembran klotho ekspresyonu salgılayan klotho ekspresyonundan 6 aylık iken 9, 18 aylık iken 5 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Prefrontal korteksteki klotho seviyelerinin 6 aylık fareler ile karşılaştırıldığında, 9 aylıktan itibaren düşmeye başladığı, 12 ve 18 aylık farelerdeki düşmenin ise neredeyse %90'larda olduğu bildirilmiştir. Hipokampusta klotho seviyeleri 12 aylıktan itibaren düşmeye başlarken, kortekste 18 aylıkta ciddi düşme gösterilmiştir. Serebellumda da klotho seviyeleri 12 aylıktan itibaren hızla düşmeye başlamıştır (318).

Salgılayan klothonun protein seviyeleri 6 aylık fareler ile kıyaslandığında 18 aylık farelerde prefrontal kortekste %41, kortekste %49, hipokampusta ise %63'lük bir düşüş gösterdiği bildirilmiştir. Alzheimer modeli olan 3xTg-AD farelerde yapılan ölçümlerde 6 aylık farelerdeki klotho ekspresyonu kontrol farelerdekine göre daha düşük bulunmuştur. Fakat 12 aylıktan itibaren klotho ekspresyonunun benzer seviyelerde olduğu bildirilmiştir (318). 6 ve 12 aylık farelere 6 ay egzersiz yaptırılan deneyde ise yaşlı fareler %50 daha az egzersiz yapmalarına rağmen kontrol gruba göre klotho ekspresyonlarındaki artışın daha belirgin olduğu gösterilmiştir (318).

B6D2F1 farelerde yapılan çalışmada ise 12 aylık olana kadar klotho seviyesinin beyinde zamanla arttığı, 12 aylıktan sonra ise azaldığı bildirilmiştir. Sıçanlarda da benzer bir ekspresyon patterni gösterilmiştir (208). Sıçanların 12 aylık oluncaya kadar yaşlanma belirtilerinden bu protein ekspresyonunu arttırarak korunduğu öngörülmektedir. Yapılan araştırmalar, klotho proteininin yüksek miktarda üretilmesinin oksidatif strese karşı belirgin bir direnç sağladığını ve bu sayede yaşlanma sürecini yavaşlatarak yaşam süresini uzattığını göstermektedir (319).

37 ve 85 yaş aralığında 202 kişinin kan örneğinden yapılan çalışmada yaş ile birlikte spor yapan kişilerde serum klotho seviyelerinin düştüğü ve yaş ile ilişkili düşmenin kısmen klotho genindeki metilasyondan kaynaklandığı bildirilmiştir (320). İnsanlarda yapılan başka bir çalışmada orta yaşlı yetişkinlerdeki klotho serum seviyelerinin, yaşlı yetişkinlerdekinden de anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlenmiştir (321).

181 sağlıklı Asyalı bireyin serumundan ELISA testi kullanılarak yapılan çalışmada normal yetişkinlerde α -klotho serum seviyelerinin 239 ile 1266 pg/mL arasında değişmekte olduğu bildirildi. α -klotho seviyelerinin kreatinin ve yaş ile ters orantılı olduğu gösterildi. Ancak normal çocuklardaki α -klotho seviyelerinin yetişkinlerdeki seviyelerden anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirildi. Bu çalışmada hem çocukları hem de yetişkinleri içeren çok değişkenli bir lineer regresyon analizinde, α -klothonun yaş ve kalsiyum ile negatif, fosfat ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirildi (322).

Beyin yaşlanmasının 30'lu yaşlarda başladığına dair deliller olmasına rağmen bu durumu açıklığa kavuşturmak için yeterince çalışma yapılmamıştır. Yaşlanma çalışmaları genellikle 60'lı yaşlara karşılık gelen sıçanlar üzerinde yapılırken yaşlanmanın ne zaman başladığına dair net bir görüş bulunmamaktadır (3).

ALS ve multiple skleroz, çoğunlukla 30'lu yaşlarda tanı konulan ve her ikisinde de HERV'lerin etkili olabileceği düşünülen hastalıklardır. Şizofreni ise ergenlik ve 20'li yaşlarda tanı konabilen, patogenezinde HERV'lerin rol alabileceği başka bir hastalık olarak öne çıkar. Aynı şekilde patogenezinde HERV'lerin yer alabildiği frontotemporal demans 40'lı yaşlarda teşhis edilir. 30'lu yaşlarda, 20'li yaşlara kıyasla gözlemlenen bilişsel işlev kaybı ise beyin yaşlanmasının erken belirtileri olarak değerlendirilebilir.

Çevresel koşulların etkisiyle ekspresyonu artarak çeşitli enflamatuvar süreçleri tetikleyebilen HERV'ler, multiple sklerozdaki mekanizmaya benzer bir şekilde 30'lu yaşlarda aktifleşerek ak madde bütünlüğünde bozulmalara neden olabilir. Bu yaşlardaki işlem hızı ve çıkarımsama becerilerinde görülen düşüşte, HERV'lerin rolü olabilir.

Çalışmamızda LINE-1, SYN1 ve IL-6 mRNA ekspresyonunun 12 aylık farelerde diğer gruplara göre arttığı TRIM28 geninin azaldığı gösterildi. Bu artışlar bahsedilen mekanizmalar ile 30'lu yaşlardaki bilişsel gerileme ve ak madde bütünlüğündeki kaybı endojen retrovirüslerin yaşlanma açısından öneme sahip olduğu ve epigenetik değişimlerin yaşlanmada etkili olduğunu kanıtlar nitreliktedir.

Çalışmamızda DNA hasarı, senescence ve beyin ak madde bütünlüğü ilişkili biyomarkırlar kullanılmadığı için yaşlanma sürecinin 12 aylık farede başladığına dair net kanıtlar oluşturulamamıştır. Başka yöntemler ile ak madde bütünlüğündeki bozulma inflamasyon ile korele bir şekilde gösterilebilse idi hipotezin ispatı açısından daha net kanıtlar oluşturulabilirdi. İleride bu duruma dair daha büyük gruplarda daha kapsamlı çalışmalar yapılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanların frontal korteksinde yaptığımız gen analizlerinde yaşla birlikte Syn-B geninin ekspresyonunun anlamlı derecede arttığını, 1 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında 4 aylık sıçanlarda 1.5 katlık bir değişim varken 12 aylık sıçanlarda 2 katlık bir değişimin olduğunu kaydettik. LINE-1 gen ekspresyonunun 4 aylık sıçanlarda artmamasına rağmen 12 aylık sıçanlarda sinsitin-B gibi genç hayvanlara oranla 2 kat arttığını gösterdik. 12 aylık sıçanlarda hem TRIM28 hem de SETDB1'in 1 aylık sıçanlara oranla 12 aylık sıçanlarda azaldığı görülmeye rağmen bu azalmanın sadece TRIM28'de anlamlı olduğunu gözlemledik. IL-6 gen ekspresyonunun hem 4 aylık hem de 12 aylık sıçan beyinlerinde anlamlı derecede arttığını gözlemledik. 4 aylık sıçanlardaki GFAP ekspresyonunda bir değişim görülmezken yapılan çalışmalara benzer şekilde 12 aylık sıçanların frontal korteksinde GFAP ekspresyonunun yaklaşık 2 kat azaldığını tespit ettik. COX-2 miktarında 12 aylık sıçanlarda bir artış görülmeye rağmen bu artışın 1 aylık sıçanlara oranla anlamlılık seviyesine ulaşmadığını tespit ettik. Sistemik inflamasyonda yer alan hücre sinyal proteini olan TNF- α 'nın da COX-2 ile benzer şekilde gruplar arasında anlamlı bir değişiminin olmadığını gözlemledik. Son olarak yaşlılıkla ilişkisi bilinen klotho geninin ekspresyonunun beyinde nasıl değiştiğini inceledik ve yaşla birlikte gen ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemledik. Çalışmamızda yapılan Morris su labirenti testinde gruplar arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir.

Syn-B ve LINE-1 artışı diğer ERV'lerin aktiflendiğine de işaret edebilir. İnsanda 30'lu yaşlara denk gelen 12 aylık farelerde endojen retrovirüslerin aktifliğinin gösterilmesi bu yaşlarda görülen bilişsel fonksiyonlardaki gerilemeye endojen retrovirüslerin sebep olabileceğine dair kanıt oluşturur. Çalışmamız sonucunda beyin yaşlanmasının ertelenmesi için gerekli müdahalelerin 30'lu yaşlarda yapılabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Schubert CR, Fischer ME, Pinto AA, Chen Y, Klein BEK, Klein R, et al. Brain Aging in Midlife: The Beaver Dam Offspring Study. *J Am Geriatr Soc.* 2019;67(8).
2. Salthouse TA. Trajectories of normal cognitive aging. *Psychol Aging.* 2019;34(1).
3. Salthouse TA. When does age-related cognitive decline begin? Vol. 30, *Neurobiology of Aging.* 2009.
4. Yoon B, Shim YS, Lee KS, Shon YM, Yang DW. Region-specific changes of cerebral white matter during normal aging: A diffusion-tensor analysis. *Arch Gerontol Geriatr.* 2008;47(1).
5. Salat DH, Tuch DS, Hevelone ND, Fischl B, Corkin S, Rosas HD, et al. Age-related changes in prefrontal white matter measured by diffusion tensor imaging. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005.
6. Salami A, Eriksson J, Nilsson LG, Nyberg L. Age-related white matter microstructural differences partly mediate age-related decline in processing speed but not cognition. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2012;1822(3).
7. Mao J, Zhang Q, Cong YS. Human endogenous retroviruses in development and disease. Vol. 19, *Computational and Structural Biotechnology Journal.* 2021.
8. Grandi N, Tramontano E. Human endogenous retroviruses are ancient acquired elements still shaping innate immune responses. Vol. 9, *Frontiers in Immunology.* 2018.
9. Maksakova IA, Mager DL, Reiss D. Endogenous retroviruses - Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: The epigenetic perspective. Vol. 65, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2008.
10. Kassiotis G. The Immunological Conundrum of Endogenous Retroelements. Vol. 41, *Annual Review of Immunology.* 2023.
11. Ndhlovu LC, Bendall ML, Dwaraka V, Pang AP, Dopkins N, Carreras N, et al. Retroelement-Age Clocks: Epigenetic Age Captured by Human Endogenous Retrovirus and LINE-1 DNA methylation states. *bioRxiv.* 2023;
12. Peze-Heidsieck E, Bonnifet T, Znaidi R, Ravel-Godreuil C, Massiani-Beaudoin O, Joshi RL, et al. Retrotransposons as a Source of DNA Damage in Neurodegeneration. Vol. 13, *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2022.
13. Gruchot J, Herrero F, Weber-Stadlbauer U, Meyer U, Küry P. Interplay between activation of endogenous retroviruses and inflammation as common pathogenic mechanism in neurological and psychiatric disorders. Vol. 107, *Brain, Behavior, and Immunity.* 2023.
14. Tam OH, Ostrow LW, Gale Hammell M. Diseases of the nERVous system: Retrotransposon activity in neurodegenerative disease. Vol. 10, *Mobile DNA.* 2019.
15. Buttler CA, Chuong EB. Emerging roles for endogenous retroviruses in immune epigenetic regulation*. Vol. 305, *Immunological Reviews.* 2022.
16. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822).
17. Schmitt K, Richter C, Backes C, Meese E, Ruprecht K, Mayer J. Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus group HERV-W locus transcription in multiple sclerosis brain lesions by high-throughput amplicon sequencing. *J Virol.* 2013;87:13837–52.

18. Grow EJ, Flynn RA, Chavez SL, Bayless NL, Wossidlo M, Wesche DJ, et al. Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. *Nature*. 2015;522(7555).
19. Tokuyama M, Kong Y, Song E, Jayewickreme T, Kang I, Iwasaki A. ERVmap analysis reveals genome-wide transcription of human endogenous retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115:12565–72.
20. da Silva AL GBSSCGNANLBARCM. Beyond pathogens: the intriguing genetic legacy of endogenous retroviruses in host physiology. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Apr;
21. Mi S, Lee X, Li X p., Veldman GM, Finnerty H, Racie L, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 2000;403:785–9.
22. Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, et al. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet*. 2006;38(1).
23. Garcia-Montojo M, Doucet-O'Hare T, Henderson L, Nath A. Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. Vol. 44, *Critical Reviews in Microbiology*. 2018.
24. Xue B, Sechi LA, Kelvin DJ. Human endogenous retrovirus K (HML-2) in health and disease. *Front Microbiol*. 2020;11:1690.
25. Moran J V., Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD, Kazazian HH. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*. 1996;87(5).
26. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet*. 2003;35(1).
27. Hancks DC, Goodier JL, Mandal PK, Cheung LE, Kazazian HH. Retrotransposition of marked SVA elements by human L1s in cultured cells. *Hum Mol Genet*. 2011;20(17).
28. Raiz J, Damert A, Chira S, Held U, Klawitter S, Hamdorf M, et al. The non-autonomous retrotransposon SVA is trans-mobilized by the human LINE-1 protein machinery. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:1666–83.
29. Luqman-Fatah A, Miyoshi T. Human LINE-1 retrotransposons: impacts on the genome and regulation by host factors. Vol. 98, *Genes and Genetic Systems*. Genetics Society of Japan; 2023. p. 121–54.
30. Sassaman DM, Dombroski BA, Moran J V, Kimberland ML, Naas TP, DeBerardinis RJ, et al. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet*. 1997;16:37–43.
31. Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Morant J V., et al. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9).
32. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran J V. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*. 2002;110(3).
33. Symer DE, Connelly C, Szak ST, Caputo EM, Cost GJ, Parmigiani G, et al. Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell*. 2002;110:327–38.
34. Beck CR, Garcia-Perez JL, Badge RM, Moran J V. LINE-1 elements in structural variation and disease. Vol. 12, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2011.
35. Richardson SR, Doucet AJ, Kopera HC, Moldovan JB, Garcia-Perez JL, Moran J V. The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2).
36. Tolosa JM, Schjenken JE, Clifton VL, Vargas A, Barbeau B, Lowry P, et al. The endogenous retroviral envelope protein syncytin-1 inhibits LPS/PHA-stimulated cytokine responses in human blood and is sorted into placental exosomes. *Placenta*. 2012;33(11).
37. Toudic C, Elisseeff X, Lokossou AG, Barbeau B. Roles of endogenous retrovirus-encoded syncytins in human placentation. In: *Human Retrotransposons in Health and Disease*. 2017.

38. Blaise S, De Parseval N, Bénit L, Heidmann T. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22).
39. Schlesinger S, Goff SP. Retroviral Transcriptional Regulation and Embryonic Stem Cells: War and Peace. *Mol Cell Biol*. 2015;35(5).
40. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007;448(7153).
41. Day DS, Luquette LJ, Park PJ, Kharchenko P V. Estimating enrichment of repetitive elements from high-throughput sequence data. *Genome Biol*. 2010;11(6).
42. Zhu Y, Wang GZ, Cingöz O, Goff SP. NP220 mediates silencing of unintegrated retroviral DNA. *Nature*. 2018;564(7735).
43. Geis FK, Goff SP. Unintegrated HIV-1 DNAs are loaded with core and linker histones and transcriptionally silenced. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(47).
44. Fukuda K, Shinkai Y. SETDB1-mediated silencing of retroelements. Vol. 12, *Viruses*. 2020.
45. Jansz N. DNA methylation dynamics at transposable elements in mammals. Vol. 63, *Essays in Biochemistry*. 2019.
46. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. Vol. 431, *Nature*. 2004.
47. Groh S, Schotta G. Silencing of endogenous retroviruses by heterochromatin. Vol. 74, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017.
48. Sharif J, Endo TA, Nakayama M, Karimi MM, Shimada M, Katsuyama K, et al. Activation of Endogenous Retroviruses in Dnmt1^{-/-} ESCs Involves Disruption of SETDB1-Mediated Repression by NP95 Binding to Hemimethylated DNA. *Cell Stem Cell*. 2016;19(1).
49. Min B, Park JS, Jeong YS, Jeon K, Kang YK. Dnmt1 binds and represses genomic retroelements via DNA methylation in mouse early embryos. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(15).
50. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3).
51. Cammas F, Mark M, Dollé P, Dierich A, Chambon P, Losson R. Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1 β are defective in early postimplantation development. *Development*. 2000;127(13).
52. Rowe HM, Jakobsson J, Mesnard D, Rougemont J, Reynard S, Aktas T, et al. KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature*. 2010;463(7278).
53. Brattås PL, Jönsson ME, Fasching L, Nelander Wahlestedt J, Shahsavani M, Falk R, et al. TRIM28 Controls a Gene Regulatory Network Based on Endogenous Retroviruses in Human Neural Progenitor Cells. *Cell Rep*. 2017;18(1).
54. Fasching L, Kapopoulou A, Sachdeva R, Petri R, Jönsson ME, Männe C, et al. TRIM28 represses transcription of endogenous retroviruses in neural progenitor cells. *Cell Rep*. 2015;10(1).
55. Jakobsson J, Cordero MI, Bisaz R, Groner AC, Busskamp V, Bensadoun JC, et al. KAP1-Mediated Epigenetic Repression in the Forebrain Modulates Behavioral Vulnerability to Stress. *Neuron*. 2008;60(5).
56. Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ. SETDB1: A novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev*. 2002;16(8).
57. Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: The PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes Dev*. 2001;15(4).

58. Ryan RF, Schultz DC, Ayyanathan K, Singh PB, Friedman JR, Fredericks WJ, et al. KAP-1 Corepressor Protein Interacts and Colocalizes with Heterochromatic and Euchromatic HP1 Proteins: a Potential Role for Krüppel-Associated Box–Zinc Finger Proteins in Heterochromatin-Mediated Gene Silencing. *Mol Cell Biol.* 1999;19(6).
59. Groner AC, Meylan S, Ciuffi A, Zangger N, Ambrosini G, Dénervaud N, et al. KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet.* 2010;6(3).
60. Wiznerowicz M, Jakobsson J, Szulc J, Liao S, Quazzola A, Beermann F, et al. The Krüppel-associated box repressor domain can trigger de novo promoter methylation during mouse early embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282(47).
61. Chen C, Nott TJ, Jin J, Pawson T. Deciphering arginine methylation: Tudor tells the tale. Vol. 12, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2011.
62. Lu R, Wang GG. Tudor: A versatile family of histone methylation “readers.” Vol. 38, *Trends in Biochemical Sciences.* 2013.
63. Rea S, Eisenhaber F, O’Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* 2000;406(6796).
64. Durnaoglu S, Lee SK, Ahnn J. Human Endogenous Retroviruses as Gene Expression Regulators: Insights from Animal Models into Human Diseases. Vol. 44, *Molecules and Cells.* 2021.
65. Liu S, Brind’Amour J, Karimi MM, Shirane K, Bogutz A, Lefebvre L, et al. Setdb1 is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. *Genes Dev.* 2014;28(18).
66. Dodge JE, Kang YK, Beppu H, Lei H, Li E. Histone H3-K9 Methyltransferase ESET Is Essential for Early Development. *Mol Cell Biol.* 2004;24(6).
67. Robbez-Masson L, Tie CHC, Conde L, Tunbak H, Husovsky C, Tchasovnikarova IA, et al. The hush complex cooperates with trim28 to repress young retrotransposons and new genes. *Genome Res.* 2018;28(6).
68. Collins PL, Kyle KE, Egawa T, Shinkai Y, Oltz EM, Moran J V. The histone methyltransferase SETDB1 represses endogenous and exogenous retroviruses in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(27).
69. Takikita S, Muro R, Takai T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, et al. A Histone Methyltransferase ESET Is Critical for T Cell Development. *The Journal of Immunology.* 2016;197(6).
70. Tan SL, Nishi M, Ohtsuka T, Matsui T, Takemoto K, Kamio-Miura A, et al. Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. *Development (Cambridge).* 2012;139(20).
71. Schanab O, Humer J, Gleiss A, Mikula M, Sturlan S, Grunt S, et al. Expression of human endogenous retrovirus K is stimulated by ultraviolet radiation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(4).
72. Bollati V, Favero C, Albetti B, Tarantini L, Moroni A, Byun HM, et al. Nutrients intake is associated with DNA methylation of candidate inflammatory genes in a population of obese subjects. *Nutrients.* 2014;6(10).
73. Diem O, Schäffner M, Seifarth W, Leib-Mösch C. Influence of antipsychotic drugs on human endogenous retrovirus (HERV) transcription in brain cells. *PLoS One.* 2012;7(1).
74. Römer C. Viruses and Endogenous Retroviruses as Roots for Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. Vol. 15, *Frontiers in Neuroscience.* 2021.
75. Li F, Nellåker C, Sabunciyan S, Yolken RH, Jones-Brando L, Johansson AS, et al. Transcriptional Derepression of the ERVWE1 Locus following Influenza A Virus Infection . *J Virol.* 2014;88(8).

76. Young GR, Eksmond U, Salcedo R, Alexopoulou L, Stoye JP, Kassiotis G. Resurrection of endogenous retroviruses in antibody-deficient mice. *Nature*. 2012;491(7426).
77. Yu P, Lübben W, Slomka H, Gebler J, Konert M, Cai C, et al. Nucleic Acid-Sensing Toll-like Receptors Are Essential for the Control of Endogenous Retrovirus Viremia and ERV-Induced Tumors. *Immunity*. 2012;37(5).
78. Dai L, Huang Q, Boeke JD. Effect of reverse transcriptase inhibitors on LINE-1 and Ty1 reverse transcriptase activities and on LINE-1 retrotransposition. *BMC Biochem*. 2011;12(1).
79. Beck-Engeser GB, Eilat D, Wabl M. An autoimmune disease prevented by anti-retroviral drugs. *Retrovirology*. 2011;8.
80. Sinibaldi-Vallebona P, Lavia P, Garaci E, Spadafora C. A role for endogenous reverse transcriptase in tumorigenesis and as a target in differentiating cancer therapy. Vol. 45, *Genes Chromosomes and Cancer*. 2006.
81. Gorbunova V, Seluanov A, Mita P, McKerrow W, Fenyö D, Boeke JD, et al. The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. Vol. 596, *Nature*. 2021.
82. Chiappinelli KB, Strissel PL, Desrichard A, Li H, Henke C, Akman B, et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell*. 2015;162(5).
83. Roulois D, Loo Yau H, Singhanian R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, et al. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015;162(5).
84. Jönsson ME, Garza R, Sharma Y, Petri R, Södersten E, Johansson JG, et al. Activation of endogenous retroviruses during brain development causes an inflammatory response. *EMBO J*. 2021;40(9).
85. Pasquarella A, Ebert A, de Almeida GP, Hinterberger M, Kazerani M, Nuber A, et al. Retrotransposon derepression leads to activation of the unfolded protein response and apoptosis in pro-B cells. *Development (Cambridge)*. 2016;143(10).
86. Kazazian HH, Moran J V. Mobile DNA in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(4).
87. De Cecco M, Ito T, Petrashen AP, Elias AE, Skvir NJ, Criscione SW, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*. 2019;566(7742).
88. Simon M, Van Meter M, Ablueva J, Ke Z, Gonzalez RS, Taguchi T, et al. LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. *Cell Metab*. 2019;29(4).
89. Kines KJ, Sokolowski M, De Haro DL, Christian CM, Belancio VP. Potential for genomic instability associated with retrotranspositionally-incompetent L1 loci. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(16).
90. Li T, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. Vol. 215, *Journal of Experimental Medicine*. 2018.
91. Acha-Orbea H, Robson MacDonald H. Superantigens of mouse mammary tumor virus. Vol. 13, *Annual Review of Immunology*. 1995.
92. Myers L, Joedicke JJ, Carmody AB, Messer RJ, Kassiotis G, Dudley JP, et al. IL-2–Independent and TNF- α –Dependent Expansion of V β 5+ Natural Regulatory T Cells during Retrovirus Infection. *The Journal of Immunology*. 2013;190(11).
93. Punkosdy GA, Blain M, Glass DD, Lozano MM, O'Mara L, Dudley JP, et al. Regulatory T-cell expansion during chronic viral infection is dependent on endogenous retroviral superantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9).

94. Di Giorgio E, Xodo LE. Endogenous Retroviruses (ERVs): Does RLR (RIG-I-Like Receptors)-MAVS Pathway Directly Control Senescence and Aging as a Consequence of ERV De-Repression? Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. 2022.
95. Durnaoglu S, Lee SK, Ahnn J. Syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus (HERV): no longer 'fossil' in human genome. Vol. 25, *Animal Cells and Systems*. 2021.
96. Kassiotis G. Endogenous Retroviruses and the Development of Cancer. *The Journal of Immunology*. 2014;192(4).
97. Kalter SS, Helmke RJ, Heberling RL, Panigel M, Fowler K, Strickland JE, et al. Brief communication: C-type particles in normal human placentas 12. *J Natl Cancer Inst*. 1973;50(4).
98. Dirksen ER, Levy JA. Virus-like particles in placentas from normal individuals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Natl Cancer Inst*. 1977;59(4).
99. Nelson J, Leong JA, Levy JA. Normal human placentas contain RNA-directed DNA polymerase activity like that in viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(12).
100. Simpson GR, Patience C, Löwer R, Tönjes RR, Moore HDM, Weiss RA, et al. Endogenous D-type (HERV-K) related sequences are packaged into retroviral particles in the placenta and possess open reading frames for reverse transcriptase. *Virology*. 1996;222(2).
101. Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, et al. Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(10).
102. Larouche JD, Trofimov A, Hesnard L, Ehx G, Zhao Q, Vincent K, et al. Widespread and tissue-specific expression of endogenous retroelements in human somatic tissues. *Genome Med*. 2020;12(1).
103. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN. The Envelope Protein of a Human Endogenous Retrovirus-W Family Activates Innate Immunity through CD14/TLR4 and Promotes Th1-Like Responses. *The Journal of Immunology*. 2006;176(12).
104. Ko EJ, Cha HJ. The Roles of Human Endogenous Retroviruses (HERVs) in Inflammation. *Kosin Medical Journal*. 2021;36(2).
105. Kremer D, Gruchot J, Weyers V, Oldemeier L, Göttle P, Healy L, et al. PHERV-W envelope protein fuels microglial cell-dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(30).
106. Kremer D, Schichel T, Förster M, Tzekova N, Bernard C, Van Der Valk P, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation. *Ann Neurol*. 2013;74(5).
107. Kremer D, Förster M, Schichel T, Göttle P, Hartung HP, Perron H, et al. The neutralizing antibody GNBAC1 abrogates HERV-W envelope protein-mediated oligodendroglial maturation blockade. *Multiple Sclerosis*. 2015;21(9).
108. Göttle P, Schichel K, Reiche L, Werner L, Zink A, Prigione A, et al. TLR4 Associated Signaling Disrupters as a New Means to Overcome HERV-W Envelope-Mediated Myelination Deficits. *Front Cell Neurosci*. 2021;15.
109. Göttle P, Förster M, Gruchot J, Kremer D, Hartung HP, Perron H, et al. Rescuing the negative impact of human endogenous retrovirus envelope protein on oligodendroglial differentiation and myelination. *Glia*. 2019;67(1).
110. Hartung HP, Derfuss T, Cree BAC, Sormani MP, Selmaj K, Stutters J, et al. Efficacy and safety of temelimab in multiple sclerosis: Results of a randomized phase 2b and extension study. *Multiple Sclerosis Journal*. 2022;28(3).

111. Perron H, Dougier-Reynaud HL, Lomparski C, Popa I, Firouzi R, Bertrand JB, et al. Human endogenous retrovirus protein activates innate immunity and promotes Experimental Allergic Encephalomyelitis in mice. *PLoS One*. 2013;8(12).
112. Niu Y, Liu Y, Ma X, Liu L, Li S, Li R, et al. Disrupting endogenous retroelements with a reverse transcriptase inhibitor alleviates DSS-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol*. 2024;17(1).
113. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. Vol. 26, *European Journal of Neurology*. 2019.
114. Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(14).
115. Sotgiu S, Mameli G, Serra C, Zarbo I, Arru G, Dolei A. Multiple sclerosis-associated retrovirus and progressive disability of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2010;16(10).
116. Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H. Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis [1]. *Lancet*. 1998;351(9095).
117. Perron H, Germe R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Multiple Sclerosis Journal*. 2012;18(12).
118. Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C, et al. Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology*. 1999;260(1).
119. Brudek T, Christensen T, Aagaard L, Petersen T, Hansen HJ, Møller-Larsen A. B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology*. 2009;6.
120. Antony JM, Zhu Y, Izad M, Warren KG, Vodjigani M, Mallet F, et al. Comparative expression of human endogenous retrovirus-W genes in multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23(10).
121. Mameli G, Poddighe L, Astone V, Delogu G, Arru G, Sotgiu S, et al. Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis. *J Virol Methods*. 2009;161(1).
122. Sotgiu S, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Arru G, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: An observational study. *Neurology*. 2002;59(7).
123. Do Olival GS, Faria TS, Nali LHS, de Oliveira ACP, Casseb J, Vidal JE, et al. Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: Absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. *Front Microbiol*. 2013;4(JUN).
124. Le Breton A, Bettencourt MP, Gendrel AV. Navigating the brain and aging: exploring the impact of transposable elements from health to disease. Vol. 12, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2024.
125. Grassi DA, Jönsson ME, Brattås PL, Jakobsson J. TRIM28 and the control of transposable elements in the brain. Vol. 1705, *Brain Research*. 2019.
126. Ochoa Thomas E, Zuniga G, Sun W, Frost B. Awakening the dark side: retrotransposon activation in neurodegenerative disorders. Vol. 61, *Current Opinion in Neurobiology*. 2020.
127. Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, et al. Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not human herpesvirus 6. *Journal of General Virology*. 2007;88(1).

128. Zhang Q, Pan J, Cong Y, Mao J. Transcriptional Regulation of Endogenous Retroviruses and Their Misregulation in Human Diseases. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. 2022.
129. Schmitt K, Richter C, Backes C, Meese E, Ruprecht K, Mayer J. Comprehensive Analysis of Human Endogenous Retrovirus Group HERV-W Locus Transcription in Multiple Sclerosis Brain Lesions by High-Throughput Amplicon Sequencing. J Virol. 2013;87(24).
130. Ramasamy R, Joseph B, Whittall T. Potential molecular mimicry between the human endogenous retrovirus W family envelope proteins and myelin proteins in multiple sclerosis. Immunol Lett. 2017;183.
131. Li H, Chen Y, Li Y, Yin B, Tang W, Yu X, et al. Altered cortical activation during action observation in amyotrophic lateral sclerosis patients: a parametric functional MRI study. Eur Radiol. 2015;25(9).
132. Mathis S, Couratier P, Julian A, Corcia P, Le Masson G. Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 12, Neural Regeneration Research. 2017.
133. Liu J, Wang F. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Cellular mechanisms and therapeutic implications. Vol. 8, Frontiers in Immunology. 2017.
134. MacGowan DJL, Scelsa SN, Imperato TE, Liu KN, Baron P, Polsky B. A controlled study of reverse transcriptase in serum and CSF of HIV-negative patients with ALS. Neurology. 2007;68(22).
135. McCormick AL, Brown RH, Cudkowicz ME, Al-Chalabi A, Garson JA. Quantification of reverse transcriptase in ALS and elimination of a novel retroviral candidate. Neurology. 2008;70(4).
136. Andrews WD, Tuke PW, Al-Chalabi A, Gaudin P, Ijaz S, Parton MJ, et al. Detection of reverse transcriptase activity in the serum of patients with motor neurone disease. J Med Virol. 2000;61(4).
137. Chen-Plotkin AS, Lee VMY, Trojanowski JQ. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. Vol. 6, Nature Reviews Neurology. 2010.
138. Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: From genes to mechanism. Vol. 539, Nature. 2016.
139. Bess Frost 1 JD 2. The Role of Retrotransposons and Endogenous Retroviruses in Age-Dependent Neurodegenerative Disorders. Annu Rev Neurosci. 2024 Aug;
140. Li W, Lee MH, Henderson L, Tyagi R, Bachani M, Steiner J, et al. Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. Sci Transl Med. 2015;7(307).
141. Garcia-Montojo M, Fathi S, Norato G, Smith BR, Rowe DB, Kiernan MC, et al. Inhibition of HERV-K (HML-2) in amyotrophic lateral sclerosis patients on antiretroviral therapy. J Neurol Sci. 2021;423.
142. Krug L, Chatterjee N, Borges-Monroy R, Hearn S, Liao WW, Morrill K, et al. Retrotransposon activation contributes to neurodegeneration in a Drosophila TDP-43 model of ALS. PLoS Genet. 2017;13(3).
143. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. Vol. 130, Cell. 2007.
144. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Vol. 90, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993.
145. Kujoth CC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. Science (1979). 2005;309(5733).
146. Hoeijmakers JHJ. DNA Damage, Aging, and Cancer. New England Journal of Medicine. 2009;361(15).

147. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. Vol. 272, *Journal of Biological Chemistry*. 1997.
148. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Vol. 408, *Nature*. 2000.
149. Schmauck-Medina T, Molière A, Lautrup S, Zhang J, Chlopicki S, Madsen HB, et al. New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging*. 2022;14(16).
150. Kirkwood TBL, Boys RJ, Gillespie CS, Proctor CJ, Shanley DP, Wilkinson DJ. Towards an e-biology of ageing: Integrating theory and data. Vol. 4, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003.
151. Harman D. Free radical theory of aging: An update - Increasing the functional life span. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006.
152. Barstow DG. Handbook of Theories of Aging. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*. 2000;38(3).
153. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: Basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. Vol. 292, *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2007.
154. Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. Vol. 120, *Cell*. 2005.
155. Kirkwood TBL, Austad SN. Why do we age? Vol. 408, *Nature*. 2000.
156. Kirkwood TBL. Understanding the odd science of aging. Vol. 120, *Cell*. 2005.
157. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. Vol. 39, *Annual Review of Genetics*. 2005.
158. Martin GM, Austad SN, Johnson TE. Genetic analysis of ageing: Role of oxidative damage and environmental stresses. Vol. 13, *Nature Genetics*. 1996.
159. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(9).
160. Fries JF. Aging, natural death, and the compression of morbidity. Vol. 80, *Bulletin of the World Health Organization*. 2002.
161. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. Vol. 269, *European Journal of Biochemistry*. 2002.
162. Gröger V, Emmer A, Staeger MS, Cynis H. Endogenous retroviruses in nervous system disorders. Vol. 14, *Pharmaceuticals*. 2021.
163. Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. Vol. 51, *Annual Review of Medicine*. 2000.
164. Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, French M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining “clean” cells. Vol. 1, *Autophagy*. 2005.
165. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. Vol. 69, *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2014.
166. Yushkova E, Moskalev A. Transposable elements and their role in aging. Vol. 86, *Ageing Research Reviews*. 2023.
167. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. Vol. 186, *Cell*. 2023.
168. Fraser HC, Kuan V, Johnen R, Zwierzyna M, Hingorani AD, Beyer A, et al. Biological mechanisms of aging predict age-related disease co-occurrence in patients. *Aging Cell*. 2022;21(4).

169. Yanai S, Endo S. Functional Aging in Male C57BL/6J Mice Across the Life-Span: A Systematic Behavioral Analysis of Motor, Emotional, and Memory Function to Define an Aging Phenotype. *Front Aging Neurosci.* 2021;13.
170. Keshavarz M, Xie K, Bano D, Ehninger D. Aging – What it is and how to measure it. *Mech Ageing Dev.* 2023;213.
171. Adler P, Chiang CK, Mayne J, Ning Z, Zhang X, Xu B, et al. Aging Disrupts the Circadian Patterns of Protein Expression in the Murine Hippocampus. *Front Aging Neurosci.* 2020;11.
172. Kadar T, Silbermann M, Brandeis R, Levy A. Age-related structural changes in the rat hippocampus: correlation with working memory deficiency. *Brain Res.* 1990;512(1).
173. Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol Brain.* 2016;9(1).
174. Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23).
175. Mazzio EA, Soliman KFA. Basic concepts of epigenetics impact of environmental signals on gene expression. Vol. 7, *Epigenetics.* 2012.
176. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. Vol. 2, *Science Advances.* 2016.
177. Hu Z, Chen K, Xia Z, Chavez M, Pal S, Seol JH, et al. Nucleosome loss leads to global transcriptional up-regulation and genomic instability during yeast aging. *Genes Dev.* 2014;28(4).
178. Moskalev AA, Aliper AM, Smit-McBride Z, Buzdin A, Zhavoronkov A. Genetics and epigenetics of aging and longevity. Vol. 13, *Cell Cycle.* 2014.
179. Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* (1979). 1983;220(4601).
180. Yang AS, Estécio MRH, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JPJ. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(3).
181. Luo Y, Lu X, Xie H. Dynamic Alu Methylation during Normal Development, Aging, and Tumorigenesis. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
182. Rollins RA, Haghighi F, Edwards JR, Das R, Zhang MQ, Ju J, et al. Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res.* 2006;16(2).
183. Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, et al. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev.* 2009;130(4).
184. Jintaridth P, Mutirangura A. Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. *Physiol Genomics.* 2010;41(2).
185. Cho YH, Woo HD, Jang Y, Porter V, Christensen S, Hamilton RF, et al. The association of LINE-1 hypomethylation with age and centromere positive micronuclei in human lymphocytes. *PLoS One.* 2015;10(7).
186. Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, et al. Epigenetic variation during the adult lifespan: Cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell.* 2012;11(4).
187. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997;390(6655).
188. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-O M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and klotho: Physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. Vol. 75, *Annual Review of Physiology.* 2013.

189. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(4).
190. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-O M, Nabeshima YI. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(3).
191. Zou D, Wu W, He Y, Ma S, Gao J. The role of klotho in chronic kidney disease. Vol. 19, *BMC Nephrology*. 2018.
192. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V., Nandi A, Gurnani P, et al. Physiology: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* (1979). 2005;309(5742).
193. Hu MC, Shi M, Gillings N, Flores B, Takahashi M, Kuro-o M, et al. Recombinant α -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney Int*. 2017;91(5).
194. Semba RD, Moghekar AR, Hu J, Sun K, Turner R, Ferrucci L, et al. Klotho in the cerebrospinal fluid of adults with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2014;558.
195. Akimoto T, Yoshizawa H, Watanabe Y, Numata A, Yamazaki T, Takeshima E, et al. Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2012;13.
196. Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, et al. Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett*. 2004;565(1–3).
197. Lindberg K, Amin R, Moe OW, Hu MC, Erben RG, Wernerson AÖ, et al. The kidney is the principal organ mediating Klotho effects. *Historic Environment: Policy and Practice*. 2014;5(2).
198. Shi M, Flores B, Gillings N, Bian A, Cho HJ, Yan S, et al. α klotho mitigates progression of aki to ckd through activation of autophagy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2016;27(8).
199. Neyra JA, Hu MC. Potential application of klotho in human chronic kidney disease. Vol. 100, *Bone*. 2017.
200. Zhu L, Stein LR, Kim D, Ho K, Yu GQ, Zhan L, et al. Klotho controls the brain–immune system interface in the choroid plexus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(48).
201. Quarles LD. Fibroblast growth factor 23 and α -Klotho co-dependent and independent functions. Vol. 28, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2019.
202. Kuro-o M. The Klotho proteins in health and disease. Vol. 15, *Nature Reviews Nephrology*. 2019.
203. Iurciuc S, Cimpean AM, Mitu F, Heredeia R, Iurciuc M. Vascular aging and subclinical atherosclerosis: Why such a “never ending” and challenging story in cardiology? *Clin Interv Aging*. 2017;12.
204. Cararo-Lopes MM, Mazucanti CHY, Scavone C, Kawamoto EM, Berwick DC. The relevance of α -KLOTHO to the central nervous system: Some key questions. Vol. 36, *Ageing Research Reviews*. 2017.
205. Abraham CR, Chen C, Cuny GD, Glicksman MA, Zeldich E. Small-molecule Klotho enhancers as novel treatment of neurodegeneration. *Future Med Chem*. 2012;4(13).
206. Clinton SM, Glover ME, Maltare A, Laszczyk AM, Mehi SJ, Simmons RK, et al. Expression of klotho mRNA and protein in rat brain parenchyma from early postnatal development into adulthood. *Brain Res*. 2013;1527.
207. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, et al. Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice with a Defect of klotho Gene Expression. *Circulation*. 2004;109(14).

208. Duce JA, Podvin S, Hollander W, Kipling D, Rosene DL, Abraham CR. Gene profile analysis implicates Klotho as an important contributor to aging changes in brain white matter of the rhesus monkey. *Glia*. 2008;56(1).
209. Uchida A, Komiya Y, Tashiro T, Yorifuji H, Kishimoto T, Nabeshima Y, et al. Neurofilaments of Klotho, the mutant mouse prematurely displaying symptoms resembling human aging. *J Neurosci Res*. 2001;64(4).
210. Nagai T, Yamada K, Kim HC, Kim YS, Noda Y, Imura A, et al. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(1).
211. Laszczyk AM, Fox-Quick S, Vo HT, Nettles D, Pugh PC, Overstreet-Wadiche L, et al. Klotho regulates postnatal neurogenesis and protects against age-related spatial memory loss. *Neurobiol Aging*. 2017;59.
212. Chen C Di, Sloane JA, Li H, Aytan N, Giannaris EL, Zeldich E, et al. The antiaging protein klotho enhances oligodendrocyte maturation and myelination of the CNS. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(5).
213. Singh S, Singh AK, Garg G, Rizvi SI. Fisetin as a caloric restriction mimetic protects rat brain against aging induced oxidative stress, apoptosis and neurodegeneration. *Life Sci*. 2018;193.
214. Garg G, Singh S, Singh AK, Rizvi SI. Whey protein concentrate supplementation protects rat brain against aging-induced oxidative stress and neurodegeneration. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. 2018;43(5).
215. Giorgi G, Virgili M, Monti B, Del Re B. Long Interspersed nuclear Elements (LINEs) in brain and non-brain tissues of the rat. *Cell Tissue Res*. 2018;374(1).
216. Bustin SA. Analysis of mRNA Expression by Real-time PCR. In: *Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology*. 2019.
217. Foley KP, Leonard MW, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends in Genetics*. 1993;9(11).
218. Antony JM, DesLauriers AM, Bhat RK, Ellestad KK, Power C. Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: Innocent bystanders or disease determinants? Vol. 1812, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011.
219. Nissen KK, Laska MJ, Hansen B, Terkelsen T, Villesen P, Bahrami S, et al. Endogenous retroviruses and multiple sclerosis-new pieces to the puzzle. Vol. 13, *BMC Neurology*. 2013.
220. Shen J, Wen X, Xing X, Fozza C, Sechi LA. Endogenous retroviruses Suppressyn and Syncytin-2 as innovative prognostic biomarkers in Acute Myeloid Leukemia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13.
221. Tovo PA, Galliano I, Parodi E, Calvi C, Gambarino S, Licciardi F, et al. Children with Chronic Immune Thrombocytopenia Exhibit High Expression of Human Endogenous Retroviruses TRIM28 and SETDB1. *Genes (Basel)*. 2023;14(8).
222. Tovo PA, Davico C, Marcotulli D, Vitiello B, Daprà V, Calvi C, et al. Enhanced Expression of Human Endogenous Retroviruses, TRIM28 and SETDB1 in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11).
223. Martinez-Molledo M, Nji E, Reyes N. Structural insights into the lysophospholipid brain uptake mechanism and its inhibition by syncytin-2. *Nat Struct Mol Biol*. 2022;29(6).
224. McNamara RK, Schurdak JD, Asch RH, Peters BD, Lindquist DM. Deficits in Docosahexaenoic Acid Accrual during Adolescence Reduce Rat Forebrain White Matter Microstructural Integrity: An in vivo Diffusion Tensor Imaging Study. *Dev Neurosci*. 2018;40(1).

225. Leyrolle Q, Decoeur F, Dejean C, Brière G, Leon S, Bakoyiannis I, et al. N-3 PUFA deficiency disrupts oligodendrocyte maturation and myelin integrity during brain development. *Glia*. 2022;70(1).
226. Misiak B, Ricceri L, Sasiadek MM. Transposable elements and their epigenetic regulation in mental disorders: Current evidence in the field. *Front Genet*. 2019;10(JUN).
227. Johansson EM, Bouchet D, Tamouza R, Ellul P, Morr AS, Avignone E, et al. Human endogenous retroviral protein triggers deficit in glutamate synapse maturation and behaviors associated with psychosis. *Sci Adv*. 2020;6(29).
228. Xiang Y, Liang H. The Regulation and Functions of Endogenous Retrovirus in Embryo Development and Stem Cell Differentiation. Vol. 2021, *Stem Cells International*. 2021.
229. Antony JM, Van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci*. 2004;7(10).
230. Gruchot J, Lewen I, Dietrich M, Reiche L, Sindi M, Hecker C, et al. Transgenic expression of the HERV-W envelope protein leads to polarized glial cell populations and a neurodegenerative environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(38).
231. Nevalainen T, Autio-Kimura A, Hurme M. Human endogenous retrovirus W in multiple sclerosis: transcriptional activity is associated with decline in oligodendrocyte proportions in the white matter of the brain. *J Neurovirol [Internet]*. 2024;30(4):393–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-024-01208-9>
232. Guo C, Jeong HH, Hsieh YC, Klein HU, Bennett DA, De Jager PL, et al. Tau Activates Transposable Elements in Alzheimer’s Disease. *Cell Rep*. 2018;23(10).
233. Pereira GC, Sanchez L, Schaughency PM, Rubio-Roldán A, Choi JA, Planet E, et al. Properties of LINE-1 proteins and repeat element expression in the context of amyotrophic lateral sclerosis. *Mob DNA*. 2018;9(1).
234. Sun W, Samimi H, Gamez M, Zare H, Frost B. Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies. *Nat Neurosci*. 2018;21(8).
235. Savage AL, Schumann GG, Breen G, Bubb VJ, Al-Chalabi A, Quinn JP. Retrotransposons in the development and progression of amyotrophic lateral sclerosis. Vol. 90, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2019.
236. Sur D, Kustwar RK, Budania S, Mahadevan A, Hancks DC, Yadav V, et al. Detection of the LINE-1 retrotransposon RNA-binding protein ORF1p in different anatomical regions of the human brain. *Mob DNA*. 2017;8(1).
237. Maxwell PH, Burhans WC, Curcio MJ. Retrotransposition is associated with genome instability during chronological aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(51).
238. Dennis S, Sheth U, Feldman JL, English KA, Priess JR. *C. elegans* germ cells show temperature and age-dependent expression of Cer1, a Gypsy/Ty3-related retrotransposon. *PLoS Pathog*. 2012;8(3).
239. De Cecco M, Criscione SW, Peterson AL, Neretti N, Sedivy JM, Kreiling JA. Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues. *Aging*. 2013;5(12).
240. Van Meter M, Kashyap M, Rezazadeh S, Geneva AJ, Morello TD, Seluanov A, et al. SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat Commun*. 2014;5.
241. Misteli T. Higher-order genome organization in human disease. Vol. 2, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010.

242. Lee JH, Kim EW, Croteau DL, Bohr VA. Heterochromatin: an epigenetic point of view in aging. Vol. 52, *Experimental and Molecular Medicine*. 2020.
243. Rockwood LD, Felix K, Janz S. Elevated presence of retrotransposons at sites of DNA double strand break repair in mouse models of metabolic oxidative stress and MYC-induced lymphoma. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004;548(1–2).
244. Blaudin de Thé F, Rekaik H, Peze-Heidsieck E, Massiani-Beaudoin O, Joshi RL, Fuchs J, et al. Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression. *EMBO J*. 2018;37(15).
245. Toda T, Bedrosian TA, Schafer ST, Cuoco MS, Linker SB, Ghassemzadeh S, et al. Long interspersed nuclear elements safeguard neural progenitors from precocious differentiation. *Cell Rep*. 2024;43(2).
246. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2).
247. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*. 2012;483(7388).
248. Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, Yeo GW, Mu Y, Lovci MT, et al. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*. 2009;460(7259).
249. Baillie JK, Barnett MW, Upton KR, Gerhardt DJ, Richmond TA, De Sapio F, et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature*. 2011;479(7374).
250. Jakovcevski M, Akbarian S. Epigenetic mechanisms in neurological disease. Vol. 18, *Nature Medicine*. 2012.
251. Tang M, Tang H, Tu B, Zhu WG. SIRT7: A sentinel of genome stability. Vol. 11, *Open Biology*. 2021.
252. Zuo Z, Rocha PP. Repetitive Elements: Different Subtypes Hint at Distinct Functions. Vol. 36, *Trends in Genetics*. 2020.
253. Vazquez BN, Thackray JK, Simonet NG, Chahar S, Kane-Goldsmith N, Newkirk SJ, et al. SIRT7 mediates L1 elements transcriptional repression and their association with the nuclear lamina. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(15).
254. Mohrin M, Shin J, Liu Y, Brown K, Luo H, Xi Y, et al. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science* (1979). 2015;347(6228).
255. Mahmood W, Erichsen L, Ott P, Schulz WA, Fischer JC, Arauzo-Bravo MJ, et al. Aging-associated distinctive DNA methylation changes of LINE-1 retrotransposons in pure cell-free DNA from human blood. Vol. 10, *Scientific Reports*. 2020.
256. De Cecco M, Criscione SW, Peckham EJ, Hillenmeyer S, Hamm EA, Manivannan J, et al. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*. 2013;12(2).
257. St. Laurent G, Hammell N, McCaffrey TA. A LINE-1 component to human aging: Do LINE elements exact a longevity cost for evolutionary advantage? *Mech Ageing Dev*. 2010;131(5).
258. Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, Olton DS, Price DL. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol Aging*. 1995;16(2).
259. Tovo PA, Ribaldone DG, Galliano I, Caviglia GP, Dini M, Veglio V, et al. Enhanced Transcription of Human Endogenous Retroviruses and TRIM28 Downregulation in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Viruses*. 2024 Oct;16(10).
260. Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, et al. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*. 2010;464:927–31.

261. Liang Q, Deng H, Li X, Wu X, Tang Q, Chang TH, et al. Tripartite Motif-Containing Protein 28 Is a Small Ubiquitin-Related Modifier E3 Ligase and Negative Regulator of IFN Regulatory Factor 7. *The Journal of Immunology*. 2011;187(9).
262. Jiang Y, Liu Y, Lu H, Sun SC, Jin W, Wang X, et al. Epigenetic activation during T helper 17 cell differentiation is mediated by Tripartite motif containing 28. *Nat Commun*. 2018;9(1).
263. Zhou XF, Yu J, Chang M, Zhang M, Zhou D, Cammas F, et al. TRIM28 mediates chromatin modifications at the TCR α enhancer and regulates the development of T and natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(49).
264. Rousseaux MWC, Revelli JP, Vázquez-Velez GE, Kim JY, Craigen E, Gonzales K, et al. Depleting trim28 in adult mice is well tolerated and reduces levels of α -synuclein and tau. *Elife*. 2018;7.
265. Santos J, Gil J. TRIM28/KAP1 regulates senescence. *Immunol Lett*. 2014;162(1).
266. Bialuk I, Cieślińska M, Kowalczyk O, Bonda TA, Nikliński J, Winnicka MM. IL-6 deficiency attenuates p53 protein accumulation in aged male mouse hippocampus. *Biogerontology*. 2020;21(1).
267. Lyra e Silva NM, Gonçalves RA, Pascoal TA, Lima-Filho RAS, Resende E de PF, Vieira ELM, et al. Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 2021;11(1).
268. Bialuk I, Taranta A, Winnicka MM. IL-6 deficiency alters spatial memory in 4- and 24-month-old mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2018;155.
269. Dugan LL, Ali SS, Shekhtman G, Roberts AJ, Lucero J, Quick KL, et al. IL-6 mediated degeneration of forebrain GABAergic interneurons and cognitive impairment in aged mice through activation of neuronal NADPH oxidase. *PLoS One*. 2009;4(5).
270. Ye SM, Johnson RW. Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *J Neuroimmunol*. 1999;93(1–2).
271. Wei J, Xu H, Davies JL, Hemmings GP. Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci*. 1992;51(25).
272. Weaver JD, Huang MH, Albert M, Harris T, Rowe JW, Seeman TE. Interleukin-6 and risk of cognitive decline: MacArthur studies of successful aging. *Neurology*. 2002;59(3).
273. Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *The Journal of Immunology*. 1993;150(12).
274. Beharka AA, Meydani M, Wu D, Leka LS, Meydani A, Meydani SN. Interleukin-6 production does not increase with age. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2001;56(2).
275. Prechel MM, Halbur L, Devata S, Vaidya AM, Young MRI. Increased interleukin-6 production by cerebral cortical tissue of adult versus young mice. *Mech Ageing Dev*. 1996;92(2–3).
276. Reyes TM, Fabry Z, Coe CL. Brain endothelial cell production of a neuroprotective cytokine, interleukin-6, in response to noxious stimuli. *Brain Res*. 1999;851(1–2).
277. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. In: *Annals of Internal Medicine*. 1998.
278. Kálmán J, Juhász A, Laird G, Dickens P, Járdánházy T, Rimanóczy Á, et al. Serum interleukin-6 levels correlate with the severity of dementia in down syndrome and in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 1997;96(4).
279. Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Alonzi T, Ciliberto G. IL-6 Expression in Neurons of Transgenic Mice Causes Reactive Astrocytosis and Increase in Ramified Microglial Cells but no Neuronal Damage. *European Journal of Neuroscience*. 1995;7(12).

280. Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MBA, et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(21).
281. Heyser CJ, Masliah E, Samimi A, Campbell IL, Gold LH. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(4).
282. Li AJ, Katafuchi T, Oda S, Hori T, Oomura Y. Interleukin-6 inhibits long-term potentiation in rat hippocampus slices. *Brain Res*. 1997;748(1–2).
283. Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(2).
284. Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, et al. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* (1979). 1997;278(5337).
285. Kovalskaya E, Buzdin A, Gogvadze E, Vinogradova T, Sverdlov E. Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology*. 2006;346(2).
286. Thompson PJ, Macfarlan TS, Lorincz MC. Long Terminal Repeats: From Parasitic Elements to Building Blocks of the Transcriptional Regulatory Repertoire. Vol. 62, *Molecular Cell*. 2016.
287. Manghera M, Douville RN. Endogenous retrovirus-K promoter: A landing strip for inflammatory transcription factors? Vol. 10, *Retrovirology*. 2013.
288. Lindsey JD, Landfield PW, Lynch G. Early onset and topographical distribution of hypertrophied astrocytes in hippocampus of aging rats: A quantitative study. *Journals of Gerontology*. 1979;34(5).
289. Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging*. 1993;14(5).
290. Krekoski CA, Parhad IM, Fung TS, Clark AW. Aging is associated with divergent effects on Nf-L and GFAP transcription in rat brain. *Neurobiol Aging*. 1996;17(6).
291. Sabbatini M, Barili P, Bronzetti E, Zaccheo D, Amenta F. Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex. *Mech Ageing Dev*. 1999;108(2).
292. Morel GR, Andersen T, Pardo J, Zuccolilli GO, Cambiaggi VL, Hereñú CB, et al. Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats. *Neuroscience*. 2015;303.
293. Rodríguez JJ, Yeh CY, Terzieva S, Olabarria M, Kulijewicz-Nawrot M, Verkhatsky A. Complex and region-specific changes in astroglial markers in the aging brain. *Neurobiol Aging*. 2014;35(1).
294. Goss JR, Finch CE, Morgan DG. Age-related changes in glial fibrillary acidic protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiol Aging*. 1991;12(2).
295. Yang Z, Wang KKW. Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. Vol. 38, *Trends in Neurosciences*. 2015.
296. Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochem Res*. 2000;25(9–10).
297. Machnik G, Bułdak Ł, Zapletal-Pudęłko K, Grabarek BO, Staszkiwicz R, Sobański D, et al. The impact of wound-healing assay, phorbol myristate acetate (PMA) stimulation and siRNA-mediated FURIN gene silencing on endogenous retroviral ERVW-1 expression level in U87-MG astrocytoma cells. *Adv Med Sci*. 2024;69(1).
298. Wilson KM, He JJ. HIV Nef Expression Down-modulated GFAP Expression and Altered Glutamate Uptake and Release and Proliferation in Astrocytes. *Aging Dis*. 2023;14(1).

299. Akter S, Sharma RK, Sharma S, Rastogi S, Fiebich BL, Akundi RS. Exogenous ATP modulates PGE2 release in macrophages through sustained phosphorylation of CDK9 and p38 MAPK. *J Leukoc Biol.* 2021;110(4).
300. Lee CK, Weindruch R, Prolla TA. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet.* 2000;25(3).
301. Chandra PK, Cikic S, Rutkai I, Guidry JJ, Katakam PVG, Mostany R, et al. Effects of aging on protein expression in mice brain microvessels: ROS scavengers, mRNA/protein stability, glycolytic enzymes, mitochondrial complexes, and basement membrane components. *Geroscience.* 2022;44(1).
302. Jung HY, Yoo DY, Kim JW, Kwon HJ, Lee KY, Choi JH, et al. Age-associated alterations in constitutively expressed cyclooxygenase-2 immunoreactivity and protein levels in the hippocampus. *Mol Med Rep.* 2017;15(6).
303. Aïd S, Bosetti F. Gene expression of cyclooxygenase-1 and Ca²⁺-independent phospholipase A2 is altered in rat hippocampus during normal aging. *Brain Res Bull.* 2007;73(1–3).
304. Lee CH, Yoo KY, Choi JH, Park OK, Hwang IK, Kang IJ, et al. Cyclooxygenase-2 Immunoreactivity and protein level in the gerbil hippocampus during normal aging. *Neurochem Res.* 2010;35(1).
305. Baek BS, Kim JW, Lee JH, Kwon HJ, Chung HY, Kang HS, et al. Age-related increase of brain cyclooxygenase activity and dietary modulation of oxidative status. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences.* 2001;56(10).
306. Cho K, Lee YK, Chew A, Greenhalgh DG. Tropism, cytotoxicity, and inflammatory properties of two envelope genes of murine leukemia virus type-endogenous retroviruses of C57BL/6J mice. *Mediators Inflamm.* 2011;2011.
307. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. Vol. 104, *Cell.* 2001.
308. Yan H, Zhao H, Kang Y, Ji X, Zhang T, Wang Y, et al. Parecoxib alleviates the motor behavioral decline of aged rats by ameliorating mitochondrial dysfunction in the substantia nigra via COX-2/PGE2 pathway inhibition. *Neuropharmacology.* 2021;194.
309. Bu C, Wang Z, Ren Y, Chen D, Jiang SW. Syncytin-1 nonfusogenic activities modulate inflammation and contribute to preeclampsia pathogenesis. Vol. 79, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2022.
310. Chen Y, Yin M, Cao X, Hu G, Xiao M. Pro- and anti-inflammatory effects of high cholesterol diet on aged brain. *Aging Dis.* 2018;9(3).
311. Campuzano O, Castillo-Ruiz MM, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *J Neurosci Res.* 2009;87(11).
312. Letiembre M, Hao W, Liu Y, Walter S, Mihaljevic I, Rivest S, et al. Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience.* 2007;146(1).
313. Asl NA, Sheikhzade F, Torchi M, Roshangar L, Khamnei S. Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. *Pathophysiology.* 2008;15(1).
314. Stewart J, Mitchell J, Kalant N. The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged Fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the Morris water mazes. *Neurobiol Aging.* 1989;10(6).
315. Pitsikas N, Carli M, Fidecka S, Algeri S. Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. *Neurobiol Aging.* 1990;11(4).
316. Shukitt-Hale B, Mouzakis G, Joseph JA. Psychomotor and spatial memory performance in aging male fischer 344 rats. *Exp Gerontol.* 1998;33(6).

317. Aitken DH, Meaney MJ. Temporally graded, age-related impairments in spatial memory in the rat. *Neurobiol Aging*. 1989;10(3).
318. Massó A, Sánchez A, Gimenez-Llort L, Lizcano JM, Cañete M, García B, et al. Secreted and transmembrane α klotho isoforms have different spatio-temporal profiles in the brain during aging and Alzheimer's disease progression. *PLoS One*. 2015;10(11).
319. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. Vol. 389, *Biological Chemistry*. 2008.
320. Aczel D, Torma F, Jokai M, McGreevy K, Boros A, Seki Y, et al. The Circulating Level of Klotho Is Not Dependent upon Physical Fitness and Age-Associated Methylation Increases at the Promoter Region of the Klotho Gene. *Genes (Basel)*. 2023;14(2).
321. Espuch-Oliver A, Vázquez-Lorente H, Jurado-Fasoli L, de Haro-Muñoz T, Díaz-Alberola I, López-Velez MDS, et al. Reference Values of Soluble α -Klotho Serum Levels Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Healthy Adults Aged 18–85 Years. *J Clin Med*. 2022;11(9).
322. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398(3).

EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI

Evrak Tarih ve Sayısı: 01.01.2025-34744



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 18.12.2024

Toplantı Sayısı : 2024/9

Karar Sayısı : 9/3

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz 24-5 kayıt numaralı "Beyin Yaşlanmasında Endojen Retrovirüslerin Olası Rolü" başlıklı proje önerisi kurulumuzun 18.12.2024 tarihli toplantısında uygun görülmüş olup, karar örneği ekte sunulmuştur.

Doç. Dr. Salime Pelin ERGÜVEN
HADYEK Başkanı

30.12.2024 Sekreter

Soner ÜNAL

Evrakı Doğrulamak İçin : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSP6N8Z56T&eS=34744>

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

BEYİN YAŞLANMASINDA ENDOJEN RETROVİRÜSLERİN OLASI ROLÜ

Yazar Abdullah Özdemir

Gönderim Tarihi: 21-Oca-2025 02:44PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2568234475

Dosya adı: BEYİN_YAŞLANMASINDA_ENDOJEN_RETROVİRÜSLERİN_OLASI_ROLÜ.docx (5.18M)

Kelime sayısı: 19554

Karakter sayısı: 132455

BEYİN YAŞLANMASINDA ENDOJEN RETROVİRÜSLERİN OLASI ROLÜ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 1	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	www.genome.jp İnternet Kaynağı	% 1
3	openaccess.bezmialem.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to University of Sydney Öğrenci Ödevi	<% 1
6	www.quantabio.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	genome.crg.es İnternet Kaynağı	<% 1
8	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1